

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОНА У КРЫС ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ
МЕДНО-ЦИНКОВОЙ КОЛЧЕДАННОЙ РУДОЙ

© 2019 г. К. Р. Зиякаева^{1, *}, А. Ф. Каюмова¹

¹Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

*E-mail: claraz@ufanet.ru

Поступила в редакцию 26.03.2019 г.

После доработки 12.04.2019 г.

Принята к публикации 19.04.2019 г.

В костном мозге 3–4 месячных здоровых крыс и крыс с экспериментальной хронической интоксикацией медно-цинковой колчеданной рудой гематологическими и микроскопическими методами определяли экспрессию эритробластических островков и эритропоэтина. Экспериментальная модель хронической интоксикации рудой была создана путем перорального введения водной суспензии руды в дозе 600 мг/кг массы тела крысы в течение 10–60 дней. На 30-е сутки интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой наблюдалось уменьшение в периферической крови количества эритроцитов и гемоглобина в 1.2 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$). Количество ретикулоцитов к концу эксперимента увеличилось в опытной группе в 1.9 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$). Содержание сывороточного эритропоэтина статистически значимо уменьшилось в 1.3 раза на 10-е, 30-е сутки и в 1.6 раза на 45-е сутки эксперимента по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Установлено, что под воздействием руды изменялся состав клеток костного мозга крыс, наблюдалось уменьшение количества юных клеточных форм эритроидного ряда. Эритробластические островки первого класса отсутствовали во всех сроках наблюдения. На 20-е сутки исследования в костном мозге отсутствовали эритробластические островки второго класса, в то же время количество инволюцирующих островков увеличилось в 2.1 раза по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Показатель процесса повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз после введения руды уменьшился в 2.5 раза на 20-е сутки исследования по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$). Наблюдаемые сдвиги эритропоэза обусловлены присутствием в составе руды тяжелых металлов, которые накапливаясь в организме, влияют на процессы эритропоэза.

Ключевые слова: крыса, костный мозг, эритропоэз, эритробластический островок, макрофаг, эритропоэтин, руда

DOI: 10.1134/S0869813919060128

Проблема загрязнения окружающей среды соединениями тяжелых металлов является актуальной и требует углубленного исследования процессов воздействия этих соединений на организм человека и животных. Изучение металлиндуцированной анемии и возможных путей ее коррекции является чрезвычайно важным для Республики Башкортостан, которая занимает второе место в Уральском регионе по промышленному потенциалу и является крупнейшим индустриальным центром России. В рудах медно-цинково-колчеданных месторождений обнаружено более 80 минералов, представленных пиритом, халькопиритом, сфарелитом, хлоритом, серицитом и другими. Кроме основных компонентов (медь, цинк, сера и добываемые попутно золото и серебро), руда содержит свинец, селен, теллур, кадмий, никель,

кобальт, мышьяк, сурьму, таллий и барий. Известно, что такие металлы, как железо, медь, цинк, молибден, кобальт, марганец необходимы для жизнедеятельности организма. Однако тяжелые металлы и их соединения, оседая на коже, ногтях и волосах, проникая в организм через воздух, воду, пищу, накапливаются в нем и оказывают токсическое воздействие на устойчивость мембран клеток крови, иммунной, эндокринной и центральной нервной систем [1–4]. По данным ранее проведенных исследований, кадмию и свинцу отводится одно из лидирующих мест среди наиболее опасных металлов-загрязнителей [5]. В патогенезе свинец-индуцированной анемии наблюдается снижение образования эритропоэтина в почках, повреждение стволовых клеток красного костного мозга, нарушение синтеза гемоглобина, снижение осмотической резистентности эритроцитов [6]. Кадмий накапливается в почках (30–60%) и печени (20–25%), что приводит к нарушению клеточной адгезии и активации перекисного окисления липидов (ПОЛ), этот элемент связывает карбоксильные, amino- и сульфгидрильные группы, вызывая некроз и апоптоз клеток [7].

Изучение количественного и качественного состава эритробластических островков (ЭО) костного мозга – клеточных ассоциаций, состоящих из центрально расположенного макрофага с “коронай” эритроидных клеток разной степени зрелости, позволяет изучить особенности взаимодействия между клетками и охарактеризовать результаты воздействия различных токсических веществ на эритропоэз. Морфологический анализ ЭО дает возможность определить в единице объема костного мозга количество колониеобразующих единиц эритроцитарных (КОЕэ), вступивших в дифференцировку, оценить синхронность волн амплификации, а также изучить характер межклеточных взаимодействий в ЭО при различной экспериментальной патологии [8–10].

Целью данного исследования было определение особенностей воздействия соединений тяжелых металлов в составе медно-цинковой колчеданной руды на центральное и периферическое звено эритрона в условиях *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 70 белых беспородных крысах-самцах возраста 3–4 мес. массой 200.8 ± 10.5 г. Данное исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями о соблюдении биоэтических норм биоэтического совета ФГБОУ ВО “Башкирский государственный медицинский университет” Минздрава России. Животные содержались в стандартных клетках ($n = 6$) в условиях свободного доступа к питью и еде при температуре воздуха в виварии $24 \pm 2^\circ\text{C}$ в соответствии с правилами СП 2.2.1.3218 [11] и с Директивой 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях [12]. Все болезненные манипуляции с животными при взятии периферической крови и эвтаназию путем декапитации проводили под эфирным наркозом в отдельном от вивария помещении.

Образец исследуемой руды был предоставлен ОАО “Учалинский горно-обогатительный комбинат” (г. Учалы, Республика Башкортостан). Руду дробили и измельчали до порошкообразного состояния. Для создания экспериментальной модели хронической интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой опытной группе животных ($n = 50$) ежедневно за час до стандартного кормления перорально в течение двух месяцев вводили водную суспензию порошка медно-цинковой колчеданной руды [13]. Компонентный анализ образца руды определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (табл. 1). Вводимую дозу руды для опытной группы крыс рассчитывали по минимальной предельно допустимой концентрации (ПДК) свинца и кадмия в медно-цинковой колчеданной руде – 300 мкг/кг и 600 мг/кг соответственно [14].

Пересчет дозы руды корректировали после очередного взвешивания животного (через каждые 14–15 дней). В контрольную группу вошли 20 крыс, которые не подвергались воздействию руды.

Таблица 1. Компонентный состав медно-цинковой колчеданной руды ОАО “Учалинский горно-обогатительный комбинат”

Элементный состав медно-цинковой колчеданной руды	Доля вещества в пробе, %	ПДК вещества в хлебе, мг/кг	Доля вещества во вводимой дозе руды, мг/кг
Медь	2.258	25.0	0.60
Цинк	0.098	5.0	13.56
Мышьяк	0.063	0.1	0.38
Свинец	0.060	0.3	0.36
Кадмий	0.009	0.05	0.06

В качестве материала исследования брали периферическую кровь, костный мозг и почки контрольных и подопытных крыс. Забор крови и костного мозга осуществляли на 10-е, 20-е, 30-е, 45-е и 60-е сутки эксперимента. Кровь из хвостовой вены собирали в микропробирки с ЭДТА, далее на ветеринарном полуавтоматическом гематологическом анализаторе Vet Exigo 19 (Швеция) определяли количество эритроцитов и концентрацию гемоглобина. Кровь для подсчета ретикулоцитов окрашивали в пробирке готовым раствором бриллиантового крезилового синего (ЗАО “ЭКОлаб”, Россия). Подсчет ретикулоцитов осуществляли с помощью комплекса автоматической микроскопии МЕКОС-Ц2 Софт (Россия) на микроскопе AXIO Lab.A1 (ZEISS, Германия) при увеличении $\times 900$, используя масляную иммерсию. Содержание эритропоэтина в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов “Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ” (АО “Вектор-БЕСТ”, Россия) на биохимическом анализаторе Stat Fax 2100 (США). Для морфологического исследования на 60-е сутки эксперимента у контрольных и подопытных крыс были взяты кусочки почек размером 0.5×0.5 см. Ткани фиксировали в 10%-ном забуференном растворе формалина и после стандартной гистологической проводки готовили срезы толщиной 7 мкм, после чего окрашивали их гематоксилином-эозином.

Костный мозг для исследования получали из бедренных костей. Общее количество ЭО подсчитывали в камере Горяева, предварительно окрасив клетки 0.1%-ным раствором красителя нейтрального красного. Полученные препараты ЭО фиксировали по Май-Грюнвальду красителем-фиксатором “эозин–метиленовый синий” (ООО “МиниМед”, Россия), затем окрашивали по Паппенгейму красителем Гимза (ООО НПП “ПанЭко”, Россия). Подсчет ЭО производился методом световой микроскопии при увеличении $\times 900$ с использованием масляной иммерсии. ЭО разделяли на 5 классов зрелости [15]. “Корона” ЭО 1-го класса была представлена проэритробластами и базофильными эритробластами с числом клеток от 2 до 8; “корона” ЭО 2-го класса – базофильными и ранними полихроматофильными эритробластами с числом клеток от 9 до 16. В “короне” ЭО 3-го класса зрелости содержались полихроматофильные эритробласты, оксифильные нормобласты и ретикулоциты с числом клеток от 17 до 32; “корона” инволюцирующих островков (ЭОинв) была представлена поздними полихроматофильными эритробластами, оксифильными нормобластами и ретикулоцитами с числом ядросодержащих клеток менее 16. К реконструирующимся островкам (ЭОрек) относили инволюцирующие ЭО, имевшие в составе “короны” молодые эритроидные клетки (проэритробласты и/или базофильные эритробласты), т.е. формирование данных островков являлось результатом дифференцировки присоединившегося к макрофагу инволюцирующего островка колониеобразующей единицы эритроцитарной (КОЕэ). Кроме того, в этих же препаратах подсчитывали на 100 ЭО количество свободных отдельно лежа-

Таблица 2. Показатели периферического звена эритрона при хроническом введении в организм медно-цинковой колчеданной руды

Серии опытов	Количество эритроцитов ($\times 10^{12}/л$)	Количество гемоглобина (г/л)	Количество ретикулоцитов ($\times 10^9/л$)	Содержание эритропоэтина в сыворотке (мМЕ/мл)
Контроль ($n = 20$)	7.7 ± 0.1	142.5 ± 1.5	1.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2
10 суток ($n = 10$)	7.2 ± 0.2	131.0 ± 3.7	$2.8 \pm 0.3^*$	$1.8 \pm 0.2^*$
20 суток ($n = 10$)	7.2 ± 0.1	135.9 ± 1.8	$1.6 \pm 0.1 \blacksquare$	$2.8 \pm 0.5 \blacksquare$
30 суток ($n = 10$)	$6.3 \pm 0.3^* \blacksquare$	$119.2 \pm 4.2^* \blacksquare$	$2.2 \pm 0.8^* \blacksquare$	$1.8 \pm 0.2^* \blacksquare$
45 суток ($n = 10$)	$6.9 \pm 0.6^*$	$128.2 \pm 9.1^*$	$2.0 \pm 0.3^*$	$1.5 \pm 0.1^*$
60 суток ($n = 10$)	$6.7 \pm 0.5^*$	133.8 ± 9.1	$2.7 \pm 0.1^*$	2.3 ± 0.3

* Статистически значимые отличия по отношению к значениям контрольной группы ($p < 0.05$); \blacksquare статистически значимые отличия значения опытной группы от аналогичного показателя, зарегистрированного в опытной группе в предыдущий срок наблюдения ($p < 0.05$).

щих макрофагов и число ЭО, “корона” которых состояла только из ретикулоцитов. Для оценки темпа развития ЭО рассчитывали следующие показатели:

A1 – общее количество КОЕэ, вступивших в дифференцировку (число ЭО всех классов зрелости + ЭОрек);

A2 – показатель интенсивности вовлечения КОЕэ в эритропоэз в ЭО (ЭО1 + ЭОрек), при этом количество ЭО1 характеризовало эритропоэз *de novo*, число ЭОрек – эритропоэз *de repeto*;

A3 – показатель созревания эритробластов ((ЭО3 + ЭОинв.)/(ЭО1 + ЭО2 + ЭОрек));

A4 – показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз (ЭОрек/ЭОинв) [15].

Статистическую обработку полученных данных проводили в русифицированной лицензионной программе Statistica 10 (StatSoft, США). Для каждого показателя рассчитывали среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего значения (m), результаты представлены в виде $M \pm m$. В качестве критерия оценки статистически значимых различий между контрольной и опытными группами животных использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании показателей периферической крови крыс опытной группы было установлено, что к 30-ым суткам количество эритроцитов и гемоглобина в сравнении с группой контроля уменьшилось в 1.2 раза (табл. 2). На 45-е сутки наблюдения эти показатели также были достоверно снижены, на 60-е сутки достоверных различий выявлено не было, хотя в среднем и число эритроцитов, и количество гемоглобина были существенно меньше показателей интактных животных.

Костный мозг крыс опытной группы начал реагировать на экспериментальное токсическое воздействие гораздо раньше – уже на 10-е сутки количество ретикулоцитов в периферической крови превысило контрольные значения в 2 раза. Достоверное увеличение элементов ретикулоцитарного звена эритрона наблюдалось и в последующие сроки наблюдения: на 30-е, 45-е и 60-е сутки этот показатель превышал контрольные значения в 1.6–1.9 раза.

Важно отметить, что ретикулоцитарная реакция, возникшая в ответ на введение в организм медно-цинковой колчеданной руды, протекала на фоне волнообразного изменения концентрации эритропоэтина в сыворотке крови. На 10-е сутки содержание эритропоэтина у крыс, подвергающихся хроническому токсическому воз-

действию солей тяжелых металлов, было снижено в 1.3 раза, на 20-е сутки оно не отличалось от контрольных значений, на 30-е и 45-е – вновь снизилось в 1.3 и 1.6 раза соответственно, а к 60-ым суткам эксперимента продукция эритропоэтина почками снова восстановилась до нормального уровня.

Отсутствие усиления продукции эритропоэтина, вероятнее всего, было связано с негативным действием предельно допустимых концентраций солей тяжелых металлов на почки. Их перитубулярные клетки не могли продуцировать то количество эритропоэтина, которое смогло бы обеспечить полноценный компенсационный эритропоэз, в ходе которого содержание эритропоэтина в сыворотке крови возрастает в 2 и более раз [10]. Морфологическое исследование тканей почек, проведенное на 60-е сутки эксперимента, подтвердило наше предположение о токсическом повреждении тубулярного аппарата. На гистологических срезах были выявлены изменения микроциркуляторного русла: венозная гиперемия с последующим увеличением проницаемости стенок капилляров, усиленная экссудация плазмы крови, миграция лейкоцитов в периваскулярную зону. Очаговая инфильтрация ткани почечных канальцев указывала на тубуло-интерстициальный нефрит и тубулопатию с признаками хронического пиелонефрита [16].

Ранее в наших работах [1, 3, 16] было показано, что хроническая интоксикация предельно допустимой концентрацией элементов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, сопровождается выраженными изменениями осмотической и кислотной устойчивости эритроцитов у подопытных животных, что, несомненно, связано с нарушениями структуры мембран клеток. Однако в данном исследовании нами были получены данные о том, что эта мембранная дисфункция была обусловлена не только прямым токсическим действием солей тяжелых металлов, но и изменениями самого процесса образования красных клеток крови в ходе их дифференцировки и созревания в костном мозге.

При изучении состояния костномозгового эритропоэза дважды было обнаружено возрастание количества ЭО в костном мозге подопытных животных: на 20-е сутки эксперимента общее число ЭО в 1.3 раза превышало контрольные значения, на 45-е сутки – в 1.2 раза (табл. 3). При этом в костном мозге крыс опытных групп стало нарастать число ЭО, “корона” которых состояла из одних ретикулоцитов (и не включала никакие другие клетки эритроидного ряда). На 10-е сутки эксперимента количество таких “ретикулоцитарных” островков превышало контрольные значения в 11.9 раза, на 20-е – в 14.2 раза, на 30-е – в 13.5 раза, на 45-е – в 15.9 раза, на 60-е – в 10.4 раза.

При физиологическом эритропоэзе такое увеличение в костном мозге числа ЭО с ретикулоцитарной “коронай” сопровождалось бы выраженным ретикулоцитарным ответом периферической крови, но в нашем случае нами было зарегистрировано весьма незначительное увеличение количества ретикулоцитов в периферической крови. Одной из причин такого дисбаланса между содержанием ретикулоцитов в костном мозге и в периферической крови могла явиться обнаруженная нами ранее слабая осмотическая и кислотная устойчивость мембран молодых эритроидных клеток, вследствие чего большая часть ретикулоцитов ввиду нестойкости своих мембран быстро подвергалась гемолизу. Кроме того, этот феномен мог быть обусловлен изменением функциональных свойств как самих эритроидных клеток на этапе “оксифильные эритробласты–ретикулоциты”, так и клеток гемопоэтического микроокружения. Возможно, что из-за недостаточной способности к деформации многие ретикулоциты не могли пройти через стенки синусоидных костномозговых капилляров в кровяное русло. В то же время изменение эластических свойств мембран ретикулоцитов могло отразиться и на их способности образовывать экзосомы, содержащие интегрины $\alpha 4\beta 1$ (основные молекулы адгезии эритроидных клеток, способствующие формированию межклеточных контактов). Известно, что перед

Таблица 3. Общая характеристика эритропоэза в костном мозге при хроническом введении в организм медно-цинковой колчеданной руды

Серии опытов	Абсолютное количество ЭО ($\times 10^3$ /бедр. кость)	Количество ЭО с ретикулоцитарной “коронай” ($\times 10^3$ /бедр. кость)	Количество свободных макрофагов ($\times 10^3$ /бедр. кость)
Контроль ($n = 20$)	327.0 \pm 20.4	2.5 \pm 1.1	10.0 \pm 1.5
10 сут ($n = 10$)	381.0 \pm 46.5	29.8 \pm 5.0*	39.1 \pm 4.8*
20 сут ($n = 10$)	428.2 \pm 44.5*	35.6 \pm 4.8*	58.0 \pm 8.7*
30 сут ($n = 10$)	362.5 \pm 22.8	33.8 \pm 3.5*	44.7 \pm 3.4*
45 сут ($n = 10$)	407.0 \pm 23.8*	39.8 \pm 3.0*	46.0 \pm 4.3*
60 сут ($n = 10$)	266.5 \pm 18.9■	26.1 \pm 2.3*■	31.7 \pm 2.7*■

* Статистически значимые отличия по отношению к значениям контрольной группы ($p < 0.05$); ■ статистически значимые отличия значения опытной группы от аналогичного показателя, зарегистрированного в опытной группе в предыдущий срок наблюдения ($p < 0.05$).

выходом в сосудистое русло ретикулоциты посредством экзосомального транспорта освобождаются от молекул, связывающих их с макрофагами и компонентами внеклеточного матрикса [17]. Кроме того, задержка выхода ретикулоцитов из костного мозга также могла быть связана с недостаточным синтезом в костномозговых Т-лимфоцитах ангиогенных соединений – сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и плацентарного фактора роста (PlGF), необходимых для изменения подвижности эндотелиальных клеток синусоидных капилляров [18].

При детальном анализе распределения ЭО по классам зрелости (табл. 4) было установлено, что уже с 10-ых суток интоксикации прекратился процесс образования островков путем первичного присоединения КОЕэ к свободным костномозговым макрофагам (эритропоэз *de novo*): ЭО 1-го класса зрелости в костном мозге подопытных животных не обнаруживались на всем протяжении эксперимента, а ЭО 2-го класса практически были единичными случайными находками. Об угнетении эритропоэза *de novo* свидетельствовал и значительный рост числа свободных (резидентных) макрофагов (табл. 3): начиная с 10-ых суток, этот показатель превышал контрольное значение в 3.2–5.8 раза ($p < 0.05$).

Эритропоэз в костном мозге животных, получавших природные соли тяжелых металлов, поддерживался исключительно за счет реконструкции (эритропоэз *de repeto*), т.е. новые ЭО формировались только на основе костномозговых макрофагов, уже имевших эритроидную “корону” (ЭОрек), хотя и этот процесс периодически тормозился. На 30-е и 60-е сутки эксперимента число ЭОрек в костном мозге подопытных крыс было снижено в 1.5 и 1.6 раза соответственно по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$).

С увеличением длительности интоксикации неуклонно снижалось количество зрелых ЭО 3-го класса, и это вполне объяснимо, поскольку у подопытных животных их пул не пополнялся за счет комплексации КОЕэ со свободными макрофагами (ЭО1 и ЭО2) так, как это происходит при физиологическом эритропоэзе. К 60-ым суткам число ЭО3 уменьшилось в 2.4 раза по сравнению с контрольными значениями ($p < 0.05$).

Очевидно, что в костном мозге животных, подвергавшихся хроническому воздействию предельно допустимых концентраций тяжелых элементов природной руды, наибольшую долю среди всех ЭО составляли инволюционирующие островки: их количество превышало контрольные значения в 1.5–2.1 раза ($p < 0.05$). Доля ЭОинв при физиологическом эритропоэзе обычно не превышает 40% от общего количества ЭО всех классов зрелости [19], а в нашем эксперименте в опытных группах животных доля ЭОинв достигала 72%. Поскольку “корона” инволюционирующих ост-

Таблица 4. Динамика количества ЭО различных классов зрелости ($\times 10^3$ /бедр. кость) при хроническом введении в организм медно-цинковой колчеданной руды

Серии опытов	ЭО1	ЭО2	ЭО3	ЭОинв	ЭОрек
Контроль ($n = 20$)	18.1 \pm 2.9	29.1 \pm 3.1	93.8 \pm 4.3	127.8 \pm 7.6	58.4 \pm 5.6
10 сут ($n = 10$)	0	1.0 \pm 0.7*	117.1 \pm 18.5	185.9 \pm 19.9	77.0 \pm 9.8
20 сут ($n = 10$)	0	0	100.2 \pm 9.8	271.4 \pm 28.9*	56.6 \pm 7.2
30 сут ($n = 10$)	0	2.1 \pm 0.9*	70.4 \pm 6.1*■	250.6 \pm 15.7*	39.4 \pm 2.7*■
45 сут ($n = 10$)	0	1.6 \pm 1.0*	72.5 \pm 8.4	274.0 \pm 14.4*	58.9 \pm 3.7■
60 сут ($n = 10$)	0	0	39.2 \pm 5.1*■	190.98 \pm 12.9*■	36.3 \pm 3.7*■

* Статистически значимые отличия по отношению к значениям контрольной группы ($p < 0.05$); ■ статистически значимые отличия значения опытной группы от аналогичного показателя, зарегистрированного в опытной группе в предыдущий срок наблюдения ($p < 0.05$).

Таблица 5. Показатели, характеризующие активность эритропоэза в костном мозге, при хроническом введении в организм медно-цинковой колчеданной руды

Серии опытов	A1 ($\times 10^3$ /бедр. кость)	A2 ($\times 10^3$ /бедр. кость)	A3 (отн. ед.)	A4 (отн. ед.)
Контроль ($n = 20$)	385.4 \pm 24.7	76.4 \pm 8.0	2.2 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1
10 суток ($n = 10$)	458.0 \pm 55.7	77.0 \pm 9.8	4.0 \pm 0.3*	0.4 \pm 0.0
20 суток ($n = 10$)	484.7 \pm 51.2	56.6 \pm 7.2	6.7 \pm 0.5*■	0.2 \pm 0.1*■
30 суток ($n = 10$)	401.9 \pm 25.1	39.4 \pm 2.7*■	8.0 \pm 0.4*	0.2 \pm 0.1*■
45 суток ($n = 10$)	465.9 \pm 27.2	58.9 \pm 3.7■	5.8 \pm 0.2*■	0.2 \pm 0.1*■
60 суток ($n = 10$)	302.8 \pm 22.2■	36.3 \pm 3.7*■	6.5 \pm 0.3*	0.2 \pm 0.1*

* Статистически значимые отличия по отношению к значениям контрольной группы ($p < 0.05$); ■ статистически значимые отличия значения опытной группы от аналогичного показателя, зарегистрированного в опытной группе в предыдущий срок наблюдения ($p < 0.05$).

ровков состоит преимущественно из оксифильных эритробластов и ретикулоцитов, то стало очевидно, что хроническое введение в организм минеральных компонентов медно-цинковой колчеданной руды явно замедляло процесс созревания эритроидных клеток на этапе “оксифильные эритробласты–ретикулоциты”.

Наши предположения о негативном характере влияния исследуемых веществ на эритроидную ткань нашли свое подтверждение при анализе расчетных показателей активности эритропоэза (табл. 5). К 60-ым суткам хронической интоксикации общее количество КОЕэ, вступивших в дифференцировку (A1), снизилось в 1.3 раза. Показатель интенсивности вовлечения КОЕэ в эритропоэз (A2) на 30-е сутки снизился в 1.9 раза, а на 60 – в 2.1 раза, что свидетельствует о значительном угнетении как эритропоэза *de novo*, так и эритропоэза *de repeto*. Показатель созревания эритробластов (A3), напротив, у подопытных животных по сравнению с контрольными крысами заметно увеличился: на 10-е сутки – в 2 раза, на 20 – в 3 раза, а на 30-е – в 3.7 раза. Рост данного показателя доказывает, что действительно одной из особенностей токсического действия медно-цинковой колчеданной руды является замедление процесса созревания эритроидных клеток в костном мозге животных. Показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз (A4) под влиянием компонентов природной руды снизился в 2.5 раза, что дополнительно свидетельствует о слабой активности эритропоэза *de repeto*, и главное – об отсутствии выраженной компенсаторной реакции эритрона на хроническую интоксикацию.

Известно, что большая часть минеральных компонентов медно-цинковой колчеданной руды жизненно необходима для нормального развития эритроидной ткани: медь способствует всасыванию ионов железа в кишечнике и мобилизации его резерва из печени и макрофагов; никель и кобальт поддерживают синтез гемоглобина в эритроидных клетках, цинк предупреждает развитие железодефицитной

анемии, улучшает усвоение фолиевой кислоты, а также входит в состав транскрипционных факторов, регулирующих активность генома гемопоэтических клеток. Однако при достижении предельно допустимых концентраций этих и других микроэлементов в воде или пище ход физиологического эритропоэза нарушается.

В нашей работе мы впервые описали особенности ответа эритроидной ткани на введение в организм природных солей тяжелых металлов, связанные с нарушением межклеточных взаимодействий в морфофункциональных единицах эритропоэза — эритробластических островках. Подобные изменения в экспериментах *in vivo* и *in vitro* были зарегистрированы ранее при изучении влияния на эритропоэз наночастиц углерода и серебра, бензола, острого гамма-облучения [10, 20–22].

ВЫВОДЫ

1. Предельно допустимые концентрации тяжелых металлов, входящих в состав медно-цинковой колчеданной руды, полностью тормозят процесс первичного присоединения КОЕэ к свободным костномозговым макрофагам (эритропоэз *de novo*).

2. При хроническом введении в организм компонентов медно-цинковой колчеданной руды эритропоэз поддерживается исключительно за счет реконструкции ЭО, т.е. путем формирования островков на основе комплексации КОЕэ с костномозговыми макрофагами, уже имеющими эритроидную “корону”.

3. Слабый ретикулоцитарный ответ костного мозга на токсическое воздействие солей тяжелых металлов обусловлен замедлением созревания эритроидных клеток на этапе “оксифильные эритробласты—ретикулоциты”, а также задержкой выхода ретикулоцитов в сосудистое русло.

4. Хроническая интоксикация природными солями тяжелых металлов не сопровождается полноценной компенсаторной реакцией эритрона, что связано с нарушением межклеточных взаимодействий в эритроидном ростке кроветворения и снижением продукции почечного эритропоэтина.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБОУ ВО “Башкирский государственный медицинский университет” МИНЗДРАВА России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зиякаева К.Р., Габдулхакова И.Р., Зайнетдинова А.Т., Шамратова В.Г., Каюмова А.Ф., Фазлыахметова М.Я. Динамика количественных и морфофункциональных показателей красной крови при длительном воздействии медно-цинковой колчеданной руды в эксперименте. *Совр. пробл. науки и образования*. 6: 31. 2017. [Ziyakaeva K.R., Gabdulkhakova I.R., Zainetdinova A.T., Shamratova V.G., Kayumova A.F., Fazlyakhmetova M.Y. Dynamics of quantitative and morphofunctional indicators of red blood by prolonged exposure of copper-zinc pyrite ore in experiment. *Modern problems of science and education*. 6: 31. 2017. (In Russ.)].
2. Ильясова Р.Р., Сантаров Ю.Н., Князева О.А., Сантарова Л.М., Когина Э.Н. Определение ионов тяжелых металлов методом атомно-абсорбционной спектроскопии в плазме крови при интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой. *Вестник Башкирского университета*. 23(2): 316–322. 2018. [Ilyasova R.R., Saptarov Yu.N., Knyazeva O.A., Saptarova L.M., Kogina E.N. Identification of heavy metal ions in blood plasma intoxicated by copper-zinc ore, using the method of atomic absorption spectrometry. *Vestnik Bashkirskogo univer.* [Bull. Bashkir. Univer.]. 23(2): 316–322. 2018. (In Russ.)].
3. Зиякаева К.Р., Габдулхакова И.Р., Зайнетдинова А.Т., Муллаянова А.Н., Шамратова В.Г., Каюмова А.Ф. Влияние медно-цинковой колчеданной руды на некоторые гематологические показатели крови и кислотно-резистентность эритроцитов в эксперименте. *Соврем. пробл. науки и образования*. 3: 28. 2018. [Ziyakaeva K.R., Gabdulkhakova I.R., Zainetdinova A.T., Mullayanova A.N., Shamratova V.G., Kayumova A.F. The influence of copper-zinc pyrite ore on some haematological indices and acid resistance of erythrocytes in experiment. *Modern problems of science and education* 3: 28. 2018. (In Russ.)].
4. Сантарова Л.М., Камилев Ф.Х., Князева О.А., Когина Э.Н. Накопление тяжелых металлов в печени крыс в процессе хронической интоксикации медно-цинковой колчеданной

- рудой. Вестник Башкирского универ. 22(1): 90–92. 2017. [*Saptarova L.M., Kamilov F.Kh., Knyazeva O.A., Kogina E.N.* Accumulation of heavy metals in liver of rats in the process of chronic intoxication by copper-zinc sulfide ore. Vestnik Bashkirskogo universiteta [Bull Bashkir University]. 22(1): 90–92. 2017. (In Russ.)].
5. *Островская С.С., Шаторная В.Ф., Бельская Ю.А.* Влияние тяжелых металлов и радиации на кроветворение у крыс. Мир медицины и биологии. 47(4): 177–179. 2014. [*Ostrovskaya S.S., Shatornaya V.F., Belskaya Yu.A.* Effects of heavy metals and radiation on rat's hemotosis. World Med. Biol. 47(4): 177–179. 2014.
 6. *Nabil M Ibrahim, Esam A Eweis, Hossam Saad El-Betagi, Yasmina E Abdel-Mobdy.* The effect of lead toxicity on experimental male albino rat. Biol. Trace Elementary Res. 144(1–3): 1120–1132. 2011.
 7. *Рыспекова Н.Н., Нурмухамбетов А.Н., Аскарова А.Е., Аканов А.А.* Роль тяжелых металлов в развитии анемий (обзор литературы). Вестник Казахского Национал. Мед. универ. 3(2): 46–51. 2013. [*Ryspekova N.N., Nurmukhambetov A.N., Askarova A.E., Akanov A.A.* Role of heavy metals in anemia (Review). Vestnik KazNMU 3(2): 46–51. 2013. (In Russ.)].
 8. *Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Захаров Ю.М.* Коррекция постлучевых нарушений эритропоэза суммарной РНК клеток костного мозга и тимуса. Радиационная биология. Радиоэкология. 57(4): 384–390. 2017. [*Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zakharov Yu. M.* Correction of radiation damage of erythropoiesis using bone marrow and thymus total RNA. Radiation biology. Radioecology. 57(4): 384–390. 2017. (In Russ.)].
 9. *Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Бабаева А.Г., Захаров Ю.М., Козлова Н.И., Болотов А.А.* Влияние суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз при экспериментальной полицитемии. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 101(4): 451–461. 2015. [*Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Babaeva A.G., Zakharov Yu., Kozlova N.I., Bolotov A.A.* Influence of total RNA splenic lymphoid cells on erythropoiesis in experimental polycythemia. Russ. J. Physiol. 101(4): 451–461. 2015. (In Russ.)].
 10. *Тишевская Н.В., Голуботовский Е.В., Фаризова К.О., Омарова Д.М.* Влияние фуллеренола C₆₀(OH)₂₄ на физиологический и компенсационный эритропоэз. Российские нанотехнологии. 10(7–8): 109–114. 2015. [*Tishevskaya N.V., Golubotovskiy E.V., Farizova K.O., Omarova D.M.* Effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on physiological and compensatory erythropoiesis. Nanotechnologies in Russia. 10(7–8): 109–114. 2015. (In Russ.)].
 11. Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. No 51) [SP 2.2.1.3218-14 Sanitary and epidemiological requirements to arrangement, equipment and maintenance of biological clinics (vivariums) (In Russ.)].
 12. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. [Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official J. Eur. Union. 20.10.2010. I. 276/33–276/79].
 13. *Фаршатовая Е.Р., Меньшикова И.А., Камиллов Ф.К.* Влияние металлов, содержащихся в медно-цинковых колчеданных рудах, на метаболизм костной ткани. Медицинский вестник Башкортостана. 4: 57–59. 2014. [*Farshatova E.R., Menshikova I.A., Kamilov F.Kh.* Effect of metals in copper-zinc sulphide ores on bone metabolism. Bashkortostan Med. J. 4: 57–59. 2014. (In Russ.)].
 14. *Сулдына Т.И.* Содержание тяжелых металлов в продуктах питания и их влияние на организм. Рациональное питание, пищевые добавки и биостимуляторы. 1: 136–140. 2016. [*Suldina T.I.* The content of heavy metals in food and their effects on the body. Balanced diet, nutritional supplements and biostimulants. 1: 136–140. 2016. (In Russ.)].
 15. *Тишевская Н.В., Захаров Ю.М., Головнева Е.С.* Эритропоэз и его регуляция, методы исследования эритропоэза в эксперименте: учебн. пособие. Челябинск. 2016. [*Tishevskaya N.V., Zakharov Yu.M., Golovneva E.S.* Eritropoez i ego regulyatsiya, metody issledovaniya eritropoeza v eksperimente [Erythropoiesis and its regulation, research methods of erythropoiesis in the experiment] Chelyabinsk. 2016. (In Russ.)].
 16. *Зиякаева К.Р., Габдулхакова И.Р., Каюмова А.Ф., Каюмов Ф.А., Киселева О.С., Самоходова О.В., Шамратова А.Р.* Ответ некоторых внутренних органов и периферической крови на действие медно-цинковой колчеданной руды. Адаптация биолог. систем к естественным и экстремальным факторам среды: материалы VII Междунар. научно-практ. конференции. Челябинск. Изд-во ЮУрГГПУ. 172–175. 2018. [*Ziyakaeva K.R., Gabdulkhakova I.R., Kayumova A.F., Kayumov F.A., Kiseleva O.S., Samokhodova O.V., Shamratova A.R.* Response of some internal organs and peripheral blood by the action of copper-zinc pyrite ore. Adaptation to natural biological systems and extreme factors of environment: Proc. VII Internat. scientific-practical conference. Tschelyabinsk. 172–178. 2018 (In Russ.)].
 17. *Rieu S., Géminard C., Rabesandratana H.* Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1. Eur. J. Biochem. 267(2): 583–590. 2000.
 18. *Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И.* Современный взгляд на роль Т-лимфоцитов в регуляции эритропоэза. Успехи соврем. биологии. 136(1): 83–96. 2016. [*Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I.* A modern view of the role of T-lymphocytes in regulation of erythropoiesis. Biol. Bull. Rev. 136(1): 83–96. 2016. (In Russ.)].

19. Захаров Ю.М. Регуляция эритропоэза в эритробластических островках костного мозга. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 97(9): 980–994. 2011. [Zakharov Yu.M. Regulation of erythropoiesis in erythroblastic islands of bone marrow. Russ. J. Physiol. 97(9): 980–994. 2011. (In Russ.)].
20. Тишевская Н.В., Болотов А.А., Лебедева Я.Е. Динамика эритропоэза в эритробластических островках костного мозга при экспериментальной бензолной анемии. Бюлл. экпер. биологии и медицины. 161(3): 362–365. 2016. [Tishevskaya N.V., Bolotov A.A., Lebedeva Y.E. Dynamics of erythropoiesis in erythroblastic islands in the bone marrow in experimental benzene-induced anemia. Bull. Exp. Biology Medicine. 161(3): 384–387. 2016.].
21. Тишевская Н.В., Захаров Ю.М., Болотов А.А., Архипенко Ю.В., Сазонтова Т.Г. Максимальная разовая доза препарата коллоидного серебра негативно влияет на эритропоэз *in vitro*. Эксперим. клин. фармакол. 78(7): 32–35. 2015. [Tishevskaya N.V., Zakharov Yu.M., Bolotov A.A., Arkhipenko Yu.V., Sazontova T.G. Maximum single dose of colloidal silver negatively affects erythropoiesis *in vitro*. Exp. Klin. Farmakol. 78(7): 32–35. 2015. (In Russ.)].
22. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Болотов А.А. Влияние предварительного введения суммарной РНК клеток костного мозга на динамику восстановления эритропоэза у крыс после острого гамма-облучения. Бюлл. экпер. биологии и медицины. 161(5): 670–673. 2016. [Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Bolotov A.A. Effect of preliminary injection of bone marrow cell total RNA on erythropoiesis recovery dynamics in rats exposed to an acute γ -irradiation. Bull. Exp. Biology Medicine. 161(5): 723–726. 2016. (In Russ.)].

Copper-Zinc Pyrite Ore Intoxication Affects Erythron of Rats

K. R. Ziyakaeva^a, *, A. F. Kayumova^a

^a Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

*e-mail: claraz@ufanet.ru

Abstract—In the bone marrow of 3–4-month-old control rats and rats with chronic intoxication of copper-zinc pyritic ore, expression of erythropoietin and erythroblastic islands by hematological and microscopic methods were determined. The experimental model of chronic intoxication was employed in rats by giving them water suspension of ore in a dose of 600 mg/kg within 10–60 days. On the day 30 of intoxication by copper-zinc pyrite ore, there was a decrease in the number of erythrocytes and hemoglobin in 1.2 times in peripheral blood compared with the control group. At the end of the experiment, the number of reticulocytes was increased in the experimental group in 1.9 times compared to the control group. The concentration of erythropoietin in the serum of experimental rats was 1.3 times less on days 10 and 30, and 1.6 times less on day 45 compared with the control animals. We found that intoxication by ore affects the structure of cells in the marrow, we observed a reduction in the quantity of young cellular forms of erythroid row. Erythroblastic islands of the first class were absent in all terms of observation. On day 20 of the research, there were no erythroblastic islands of the second class in the marrow, at the same time, the number of the involutionary islands was increased by 2.1 times in comparison with control. The indicator of the process of repeated involvement of macrophages in erythropoiesis under the influence of ore was decreased by 2.5 times in comparison with the control group. The observed shifts of erythropoiesis are caused by the presence of heavy metals in the composition of the ore, which can influence on processes of erythropoiesis.

Keywords: rat, bone marrow, erythropoiesis, erythroblastic island, macrophage, erythropoietin, ore

ЦИТИРОВАТЬ:

Зиякаева К.Р., Каюмова А.Ф. Состояние эритрона у крыс при интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(6): 780–789.
DOI: 10.1134/S0869813919060128

TO CITE THIS ARTICLE:

Ziyakaeva K.R., Kayumova A.F. Copper-Zinc Pyrite Ore Intoxication Affects Erythron of Rats. Russian Journal of Physiology. 105(6): 780–789.
DOI: 10.1134/S0869813919060128