

## ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ И ВЫХОД ДОМИНАНТНЫХ ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ У КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ДЕЙСТВИЮ ШЕСТИВАЛЕНТНОГО ХРОМА В МАЛЫХ ДОЗАХ

<sup>1</sup>Мамина В.П., <sup>2</sup>Шейко Л.Д., <sup>1</sup>Жигальский О.А.

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт экологии растений и животных УрО РАН», Екатеринбург,  
e-mail: [mamina@ipae.uran.ru](mailto:mamina@ipae.uran.ru);

<sup>2</sup>ФГУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества  
Федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи», Екатеринбург

Проведена оценка состояния сперматогенного эпителия, сперматозоидов, эмбриональных потерь и процессов перекисного окисления липидов в гонадах у крыс после внутрибрюшинного введения бихромата калия (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) в дозах 2.8, 0.28, 0.028 мг/кг массы тела в течение 48 дней. Хром (Cr (VI)) вызывает структурные изменения в сперматогенном эпителии, которые приводят к увеличению патологических форм сперматозоидов и росту эмбриональных потерь. При дозе 2.8 мг/кг изменения в репродуктивной функции обусловлены токсическими свойствами Cr (VI), при наименьшей дозе (0.028 мг/кг) – мутагенным эффектом. Наблюдается повышение уровня липопероксидации, которое сопровождается подавлением антиоксидантной активности гонад.

**Ключевые слова:** шестивалентный хром, сперматогенный эпителий, сперматозоид, эмбриональные потери, перекисное окисление липидов, крысы

## ASSESSMENT OF SPERMATOGENOUS EPITHELIUM AND EXIT OF DOMINANT LETHAL MUTATIONS IN THE RATS AFTER ACTIVITY OF HEXAVALENT CHROMIUM IN SMALL DOSES

<sup>1</sup>Mamina V.P., <sup>2</sup>Sheiko L.D., <sup>1</sup>Zhigalsky O.A.

<sup>1</sup>Federal state budgetary establishment of the Science «Institute of Plant and Animal Ecology, Ural  
Division of Russian Academy of sciences», Ekaterinburg, e-mail: [mamina@ipae.uran.ru](mailto:mamina@ipae.uran.ru);

<sup>2</sup>Federal official body «The Ural scientific research Institute of Protection of Mother and Infancy of  
Federal agency on highly technological medical aid», Ekaterinburg

We have done the estimate of a condition spermatogenous epithelium, spermatozoon, embryonic losses and processes lipid peroxidation in gonaads at rats after after intraperitonealy introductions in doses 2.8, 0.28 and 0.028 mg of bichromate potassium (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) /kg of mass of a body for 48 day. Chrome (Cr (VI)) causes structural changes in spermatogenous epithelium, which lead to increase of pathological forms spermatozoidov and to growth embryonic losses. At the greatest dose (2.8 mg/kg) changes in reproductive function are caused by toxic properties Cr (VI), at the least dose (0.028 mg/kg) – mutagenic effect. Observed increase of lipid peroxidation is accompanied by suppression of antioxidant activity of testis.

**Keywords:** Cr (VI), spermatogenous epithelium, spermatozoon, embryonic losses, lipid peroxidation, rats

Соединения шестивалентного хрома относятся к опасным загрязнителям окружающей среды, которые, обладая мутагенными, канцерогенными свойствами, входят в перечень потенциально опасных химических веществ по действию на репродуктивную функцию человека [6]. Высокий уровень хрома в крови, моче и других органах обнаружен у рабочих профессионально связанных с хромом. Шестивалентный хром (Cr VI) является одним из основных факторов риска в период полового созревания организма. Данные о влиянии малых доз шестивалентного хрома на мужскую половую систему единичны и противоречивы. Это, по-видимому, связано с тем, что исследования, как правило, имеют однонаправленный характер:

либо изучение гистоархитектоники семенников, либо изучение морфологических показателей сперматозоидов. Встречается незначительное число работ, когда в одном исследовании проводится сравнительный анализ морфофункционального состояния семенников с различными показателями сперматозоидов, и затем прогнозируется фертильность. Для прогнозирования возможности оплодотворения были разработаны различные так называемые индексы (показатели) плодовитости (фертильности), однако, все они носят относительный и условный характер. Следует отметить, что на сегодняшний день не существует ни одного теста, который бы предсказал с высокой точностью оплодотворяющий потенциал

эякулята *in vivo* или *in vitro*, за исключением глубоких нарушений, в частности азооспермии. Несмотря на усилия, предпринимаемые Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) для стандартизации исследований эякулята [5], все – таки сохраняется значительная вариация показателей спермограммы. Поэтому интегральным показателем состояния мужской генеративной функции служит оплодотворяющая способность сперматозоидов, а показателем генетических повреждений в половых клетках – метод учета доминантных летальных мутаций. Таким образом, при изучении действия химических соединений на репродуктивную функцию, особенно в малых дозах, необходим комплексный подход, т.е. помимо оценки морфофункционального состояния семенников, сперматозоидов учитывать частоту оплодотворения и выход доминантных летальных мутаций. Важным звеном в изучении механизмов повреждающего действия шестивалентного хрома на сперматогенный эпителий является определение функционального состояния клеточных мембран, которое зависит от процессов перекисного окисления липидов.

Цель исследования – провести количественный и морфологический анализ сперматогенного эпителия и сперматозоидов, провести оценку состояния перекисного окисления липидов в гонадах и выхода доминантных летальных мутаций у крыс, подвергнутых действию шестивалентного хрома (Cr VI) в малых дозах. На основании полученных результатов выявить механизмы действия шестивалентного хрома.

#### Материалы и методы исследования

Эксперименты были выполнены на 30 крысах-самцах с массой тела 230-260 г и 60 интактных самках линии Вистар. Моделирование хромовой интоксикации осуществлялось при субхроническом (48 дней) внутрибрюшинном введении бихромата калия ( $K_2Cr_2O_7$ ) в дозах 1/1000, 1/100 и 1/10 от  $LD_{50}$ ; ( $LD_{50}$  – 28 мг/кг массы тела), что составляет 0.028; 0.28; 2,8 мг/кг массы тела по веществу. Наибольшая из доз соответствует уровню порога острого действия по общетоксическим показателям, дозы 0.028 и 0.28 мг/кг в токсикологии считаются малыми дозами.

Животные были разделены на группы в соответствии с получаемой дозой: 1-я группа – 0.028 мг/кг, 2-я группа – 0.28 мг/кг и 3-я группа – 2.8 мг/кг. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. В конце экспозиционного периода животных умерщвляли путем цервикальной дислокации с соблюдением требований Международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным для экстирпации органов [9], затем были удалены семенники и хвостовая часть эпидидимиса. Определяли динамику изменения массы тела у кон-

трольных и опытных животных, относительную массу семенников. Для цитологической оценки состояния сперматогенеза использовали мазки клеточного гомогената семенников [1].

Учитывали процентное соотношение отдельных типов сперматогенных клеток, митотический и мейотический индекс (количество митозов и мейозов на 1000 клеток, в %), патологические митозы (оценка 300 ана-телофаз), количество округлых сперматид с микроядрами. Сперматозоиды, извлеченные из хвостовой части эпидидимиса, подвергались количественной и морфологической оценке. Подсчет числа сперматозоидов в 1мл проводили в лейкоцитарном меланжере и камере Горяева с использованием физиологического раствора [5]. Определение процента патологических форм сперматозоидов проводили на мазках, фиксированных метиловым спиртом и окрашенных азур-эозином. Уровень перекисного окисления липидов в семенниках определяли по накоплению конъюгированных диенов [3] и малонового диальдегида [7], активность антиоксидантной системы – по подавлению  $Fe^{2+}$ -зависимого окисления фосфолипидов желтка [2]. В конце экспозиционного периода самцов из каждой опытной и контрольной группы спаривали с девственными самками в стадии эструса (в соотношении 1:2). У самок на 19-20-й день беременности определяли: количество желтых тел в яичниках, число живых и мертвых эмбрионов. Учитывали процент беременных самок, общую эмбриональную смертность (желтые тела – живые эмбрионы/желтые тела  $\times 100$ ) и постимплантационную гибель эмбрионов (отношение числа мертвых эмбрионов к сумме живых и мертвых эмбрионов  $\times 100$ ) [8]. Для статистической обработки экспериментального материала использовали непараметрический тест Вилкоксона-Манна-Уитни и критерий  $\chi^2$

#### Результаты исследования и их обсуждение

Вес животных после недельного карантина во всех группах стал примерно одинаковым (рис. 1). К концу экспозиционного периода прибавление в весе тела у животных контрольной группы составило 10%, в первой группе – 6%, во второй – 2% и в третьей – 0% (рис. 1а).

Относительный вес семенников не изменялся. Цитологический анализ препаратов семенников показал достоверно значимое ( $p < 0.05$ ) снижение числа сперматоцитов во второй (0.28 мг/кг) и третьей (2.8 мг/кг) группах, сперматид- во всех группах и сперматозоидов – в третьей группе (рис. 1б). При всех исследуемых дозах наблюдалось снижение митотического и мейотического индексов (рис. 1в). При всех исследуемых дозах наблюдалось увеличение числа округлых сперматид с микроядрами ( $p < 0.05$ ) и числа патологических форм сперматозоидов ( $p < 0.05$ ), значимо возрастал процент аномальных митозов, отмечалось наличие многоядерных сперматид (рис. 1в, г; рис. 2 А, Б).

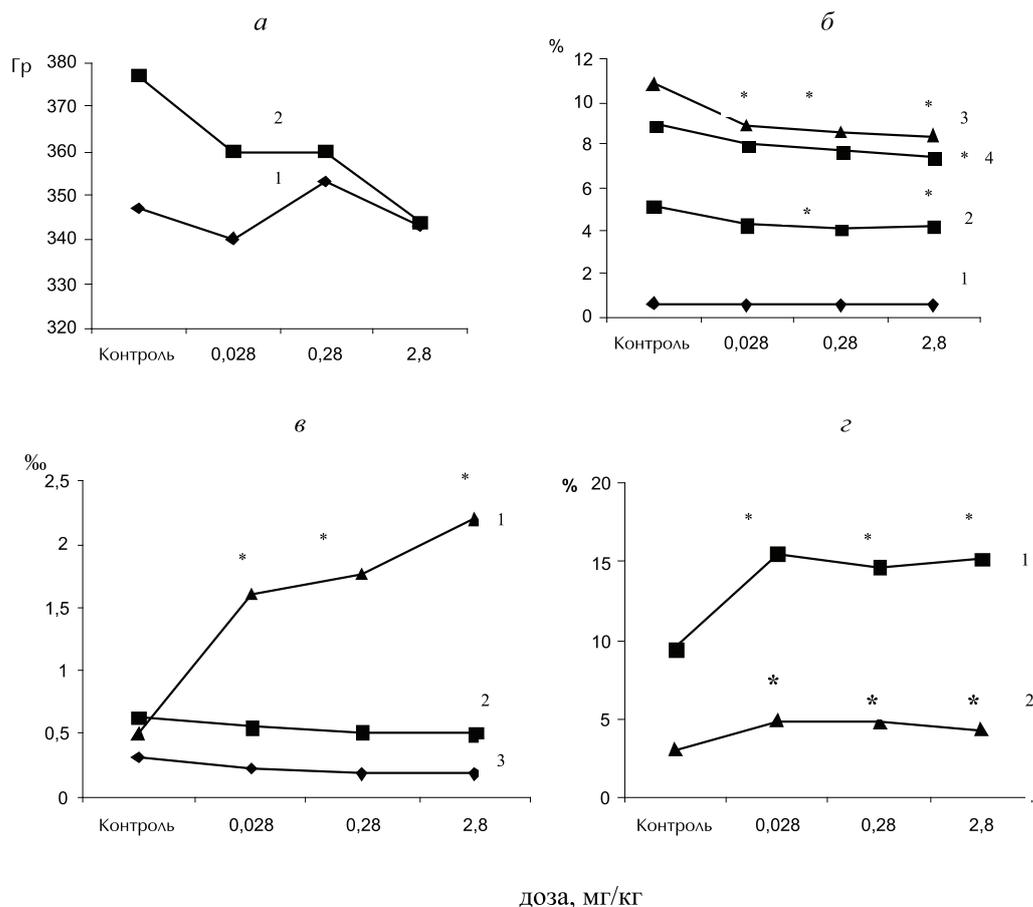


Рис 1. Изменение веса тела, количественные и морфологические изменения сперматогенного эпителия через 48 суток после внутрибрюшинного введения бихромата калия в разных дозах: а – вес тела до введения (1), после введения (2); б – число сперматогоний (1), сперматоцитов (2), сперматид (3), сперматозоидов (4); в – число округлых сперматид с микроядрами (1), число мейозов (2), число митозов (3); г – число патологических митозов (1), число патологических сперматозоидов (2). \*  $p < 0.05$  в сравнении с контролем

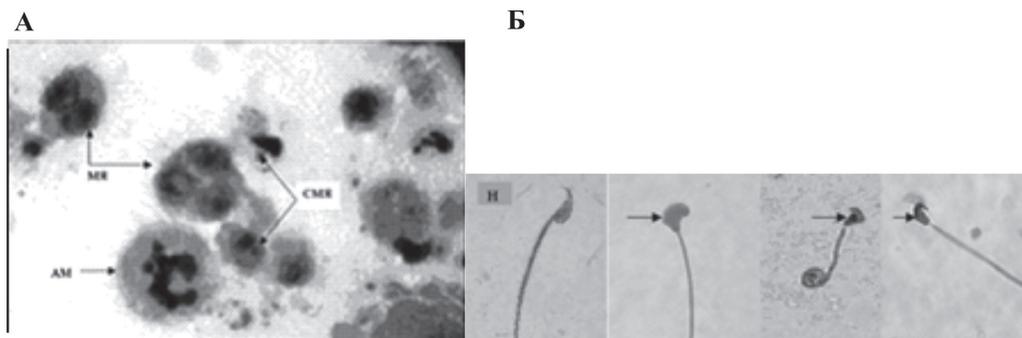


Рис 2. Морфологическая характеристика сперматогенных клеток (А) и сперматозоидов (Б) после воздействия бихромата калия. Окрашивание азур эозином,  $\times 960$  (А),  $\times 600$  (Б). А – аномальные митозы (АМ), микроядра в сперматиде (СМЯ), многоядерные сперматиды (МЯ). Б – нормальный сперматозоид (Н), сперматозоиды с аномальной головкой (обозначены стрелкой)

Количество эпидидимальных сперматозоидов составило при дозе 0.028 мг/кг – 37.9 тыс./мл, при 0.28 мг/кг – 36.1 тыс./мл, при 2.8 мг/кг – 35.5 тыс./мл против 46.9 тыс./мл в контроле, разница не значима. У животных во всех опытных группах

значимо возрастала концентрация диеновых конъюгатов (ДГ), а у крыс 3-й группы – и содержание малонового диальдегида (МДА), наблюдается тенденция к подавлению активности антиоксидантной системы (табл. 1).

**Таблица 1**

Показатели перекисного окисления липидов в семенниках крыс при воздействии бихромата калия в разных дозах ( $M \pm m$ ). \* – достоверно значимые различия при  $p < 0,05$

Показатели нмоль/г ткани	Контроль	Доза бихромата калия		
		0,028 мг/кг	0,28 мг/кг	2,8 мг/кг
ДК	6,950 ± 0,172	8,281 ± 0,868*	7,618 ± 0,324*	7,764 ± 0,280*
МДА	3,622 ± 0,136	3,942 ± 0,566	3,836 ± 0,210	3,962 ± 0,224*
АОА, усл.ед.	0,40 ± 0,06	0,28 ± 0,06	0,025 ± 0,04	0,30 ± 0,03

Анализ доминантных летальных мутаций при всех исследуемых дозах показал достоверно значимое увеличение общей

эмбриональной смертности, которая происходит в основном за счет постимплантационных потерь (табл. 2).

**Таблица 2**

Результаты доминантно-летального анализа у крыс при воздействии различных доз бихромата калия

Показатели	Группа			
	Контроль	1	2	3
Число беременных самок, %	85	72	77	75
Среднее число на самку:				
желтых тел	12.2 ± 0.41	11.0 ± 0.52	11.3 ± 0.35	11.2 ± 0.33
живых эмбрионов	± 0.52	6.5 ± 0.81*	± 0.85*	7.1 ± 0.80*
мертвых эмбрионов	± 0.02	1.8 ± 0.31*	1.4 ± 0.22*	1.2 ± 0.25*
Общая эмбриональная смертность, %	24.5	37.5*	38.1*	35.5*
Доимплантационные потери, %	20.5	24.5	25.6	25.8
постимплантационные потери, %	5.1	21.6.*	16.7*	14.5*

\*Достоверно значимые различия с контролем при  $p < 0,05$ .

Уменьшение числа герминативных клеток, возможно, обусловлено как их гибелью в результате токсического действия хрома, так и блоком митозов и мейозов. Снижение числа сперматогенных клеток в семеннике приводит к падению количества эпидидимальных сперматозоидов. Увеличение числа сперматид с микроядрами и процента аномальных митозов способствует возрастанию патологических форм сперматозоидов и как следствие – снижение оплодотворяющей способности, рост эмбриональной смертности. Эмбриональные потери могут быть как до, так и после имплантации. Основным показателем мутагенного действия химических воздействий служит постимплантационная гибель [4]. При снижении вводимой дозы бихромата калия мутагенный эффект усиливается за счет того, что половые клетки не гибнут и сохраняют способность к оплодотворению.

### Заключение

Анализ полученных данных позволяет заключить, что действие Cr VI даже в относительно невысоких дозах приводит к нарушению гаметогенеза. При наибольшей из исследуемых доз изменения в репродуктивной функции обусловлены токсическими свойствами Cr VI, а при наименьшей дозе – мутагенным эффектом. Накопление в поло-

вых клетках перекисных продуктов оказывает влияние на процессы мейоза, возможно воздействуя на ДНК клетки, тем самым вызывая в них мутационные изменения, что приводит к увеличению патологических сперматозоидов и как следствие – гибели плодов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке программы научных исследований УрО РАН (№12-С-4-1012, № 12-П-4-1068).*

### Список литературы

1. Иванов Ю.В. Ускоренные методы изучения гонадотоксического действия веществ. // Гигиена и санитария. – 1990. – № 1. – С. 72-74.
2. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкина Ю.О. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лабораторное дело. – 1988. – № 5. – С. 59-62.
3. Костюк В.А., Потапович А.И., Лунец Е.В. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов // Вопр. мед. химии. – 1983. – № 4. – С. 125-127.
4. Оценка безопасности наноматериалов. Метод. Рекомендации. – М.: 2007. № 280.
5. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию спермы человека. – Женева: 2010.
6. Хром. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. – Женева. ВОЗ. 1990.
7. Asakawa G., Matsushita S. Coloring conditios of thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides // Lipids. – 1980. – Vol. 15, № 3. – P. 137.
8. Daev E.V. Induction of Dominant Lethals in Progeny of CBA Male Mice after Pheromonal Action // Action Russian Journal of Genetics. – 2003. Vol.39, № 10. – P. 1138-1142.
9. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. – UMS. – 2002. – P. 42-46.