

УДК 615.9:614.7

**ПРИМЕНЕНИЕ АНАЛИЗА ЦИТОАРХИТЕКТониКИ ЭРИТРОЦИТОВ
И КЛЕТОК ЭРИТРОИДНОГО РЯДА КОСТНОГО МОЗГА КРЫС
ДЛЯ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИТЬЕВЫХ ВОД
НА ПРИМЕРЕ ВОДЫ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ**

¹Михайлова Р.И., ²Беляева Н.Н., ¹Алексеева А.В., ¹Каменецкая Д.Б.,

¹Савостикова О.Н., ¹Рыжова И.Н., ¹Кочеткова М.Г.

¹ФГБУ «ЦСП» Минздрава России, Москва, e-mail: info@sysin.ru;

²ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, Мытищи, e-mail: pesticidi@yandex.ru

В статье представлены результаты апробации метода анализа цитоархитектоники эритроцитов и клеток эритроидного ряда костного мозга для оценки безопасности и биологической эффективности функциональных питьевых вод на примере воды с различным содержанием дейтерия. Исследования проводили на нелинейных белых крысах (самцах) в течение шести месяцев. Животные получали питьевую воду с содержанием дейтерия на уровне 10, 145, 1000 ppm. В качестве контроля использовали воду соответствующую содержанию дейтерия в московской водопроводной воде – 145 ppm. В результате проведенных исследований показано, что через 6 месяцев воздействия вода с повышенной концентрацией дейтерия (1000 ppm) достоверно ухудшала показатели цитоархитектоники эритроцитов крыс: наблюдалось снижение процентного содержания нормоцитов, увеличилась в 1,4 раза суммарная доля дегенеративных эритроцитов, в основном за счет эритроцитов с множественными изменениями поверхностной структуры, возрастала доля трансформации дискоцитов в стоматоцит. Выявлено компенсаторное увеличение числа оксифильных нормоцитов в костном мозге. Рассчитанный индекс созревания эритроидных клеток был выше, чем в контроле. Действие воды с пониженным содержанием дейтерия (10 ppm) интерпретируется неоднозначно: с одной стороны, суммарная доля дегенеративных эритроцитов достоверно уменьшилась по сравнению с контролем в основном за счет эритроцитов с одним боковым выростом, с другой стороны, достоверно увеличена доля трансформации эритроцитов в их необратимую форму – стоматоцит. Процент нормальных эритроцитов (нормоцитов) в этой группе достоверно не отличался от контроля.

Ключевые слова: эритроциты, хроническое воздействие на организм, легкая вода, дейтерий, беспородные крысы

**APPLICATION OF THE ANALYSIS OF CYTOARCHITECTONICS
OF ERYTHROCYTES AND CELLS OF THE ERYTHROID RANGE OF RATS
FOR EVALUATION OF SAFETY AND BIOLOGICAL EFFICIENCY
OF FUNCTIONAL DRINKING WATER ON THE EXAMPLE
OF WATER WITH DIFFERENT CONTENT OF DEUTERIE**

¹Mikhaylova R.I., ²Belyaeva N.N., ¹Alekseeva A.V., ¹Kamenetskaya D.B.,

¹Savostikova O.N., ¹Ryzhova I.N., ¹Kochetkova M.G.

¹Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, e-mail: info@sysin.ru;

²FSCH named after F.F. Erisman of the Rosпотребнадзор, Mytishi, e-mail: pesticidi@yandex.ru

The article presents the results of approbation of the method for analyzing cytoarchitecture of erythrocytes and cells of the erythroid series of the bone marrow to assess the safety and biological effectiveness of functional drinking waters using water with different deuterium contents as an example. Studies were performed on non-linear white rats (males) for six months. Animals received drinking water with a deuterium content of 10 ppm, 145 ppm, 1000 ppm. As control, we used water corresponding to the content of deuterium in Moscow tap water – 145 ppm. As a result of the research, it was shown that after 6 months of exposure, water with an increased deuterium concentration (1000 ppm) significantly worsened the cytoarchitecture parameters of rat erythrocytes: a decrease in the percentage of normocytes was observed, the total share of degenerative erythrocytes increased 1.4 times, mainly due to erythrocytes multiple changes in the surface structure, increased the proportion of transformation of discocytes into stomatocytes. A compensatory increase in the number of oxyphilic normocytes in the bone marrow was revealed. The calculated index of maturation of erythroid cells was higher than in the control. The action of water with a low deuterium content (10 ppm) is interpreted unequivocally: on the one hand, the total proportion of degenerative erythrocytes significantly decreased compared to control mainly due to erythrocytes with one lateral outgrowth; stomatocyte The percentage of normal red blood cells (normocytes) in this group was not significantly different from the control.

Keywords: erythrocytes, chronic effect on the body, deuterium depleted water, deuterium, outbred rats

Эритроциты представляют собой клетки крови, изменение формы которых приводит к нарушению их основной функции, а именно способности переносить кислород,

свободно перемещаясь по гемокapиллярам. Особенность эритроцитов заключается в их форме клетки – двояковогнутой форме диска. Данная форма обеспечивает наибольшее

соотношение площади поверхности к объему клетки и гарантирует максимальную эластичность для свободного прохождения через капиллярные сосуды. При патологических состояниях под воздействием каких либо причин эритроциты изменяют свою форму и размер. Эритроциты с измененной формой (сфероциты, стоматоциты и др.), не обладая высокой эластичностью, уже не могут проходить в узкие капилляры, общая площадь их поверхности становится меньше как минимум на 20% от нормального соотношения.

Изменение структуры эритроцитов может происходить под действием как внутренних (эндогенных) факторов, так и под воздействием факторов окружающей среды [1, 2]. Мембраны эритроцитов очень чувствительны к внешним воздействиям. Изменение формы эритроцитов – процесс энергетически-зависимый и связан с концентрацией АТФ. Ее снижение вызывает повышение чувствительности эритроцитов к факторам окружающей среды.

Метод анализа цитоархитектоники эритроцитов может быть использован как один из методов токсикологических исследований для оценки функциональных питьевых вод, рекомендуемых с целью оздоровления организма, в соответствии с современными требованиями как гигиенической оценки безопасности, так и биологической эффективности [3]. Электронномикроскопически в сканирующем режиме может быть получена информация о поверхностной геометрии эритроцитов, что позволит оценить структурно-функциональные свойства их мембран, а так как существует корреляция между изменением структуры мембран эритроцитов и других клеток организма [4], то и процессов повреждения клеточных мембран всего организма в целом.

В гигиене питьевых вод продолжают развиваться исследования, связанные с проблемой оценки качества питьевой воды при изменении ее структурного и изотопного водородно-кислородного состава [5]. Вода, являясь практически протиевой водой, имеет в своем составе другие изотопные модификации, содержание которых составляет 0,23%, что сопоставимо с содержанием солей и микроэлементов в питьевой воде.

В основе механизма действия различных концентраций дейтерия на животных лежит влияние реакций изотопного обмена (D/H) на скорость биологических процессов в клетке (К. Райхардт, 1991). На молекулярном уровне этот механизм доказан, вода с пониженной концентрацией дейтерия увеличивает скорость биологических реакций (термодинамическое состояние

нуклеиновых кислот, скорость процессов транскрипции и трансляции, репарационные процессы ДНК, каскадные реакции дыхательной цепи митохондрий, аппарат биосинтеза, т.е. именно те клеточные системы, которые используют высокую подвижность протонов и высокую скорость разрыва водородных связей [6], а повышенное содержание дейтерия в воде, наоборот, стабилизирует клеточные структуры. В связи с этим целью настоящего исследования являлась оценка действия повышенного и пониженного содержания дейтерия в питьевой воде на показатели цитоархитектоники эритроцитов и клеток эритроидного ряда костного мозга крыс в хроническом эксперименте.

Материалы и методы исследования

Изучение влияния питьевых вод с различным содержанием дейтерия (10 ppm и 1000 ppm) на показатели состояния животных проводилось в хроническом эксперименте. В качестве контроля использовали воду с содержанием дейтерия 145 ppm, соответствующей концентрации дейтерия в московской водопроводной воде.

Общее состояние животных оценивали по показателям изменения массы тела, уровня водопотребления и поведению животных.

Исследования проводили на крысах-самцах массой в начале эксперимента 270 г. Животных содержали в условиях искусственного освещения (12 ч в сутки), постоянного доступа к стандартному комбинированному корму в клетках по 6 животных. Животные находились на свободном водопотреблении.

Электронномикроскопически в сканирующем режиме на «Hitachi-3010» анализировали цитоархитектонику эритроцитов, полученных из венозной крови после префиксации глутаральдегидом с дофиксацией OsO₄ по стандартной методике (Б.В. Втюрин, А.А. Пальцын, 1996 г.) Затем проводилось обезвоживание в ацетоне и высушенные образцы покрывали слоем золота (толщиной в 200 Å) в вакуумном испарителе. Для каждого животного просматривали на экране электронного микроскопа 250–280 эритроцитов и высчитывали процентное соотношение различных эритроцитов, классифицировав их по 12 типам (Г. Козинец, 1984). Статистические различия между показателями по отношению к контрольной группе определялись по непараметрическому критерию (U-критерий) Манна – Уитни. Достоверными считались изменения при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В течение хронического шестимесячного периода наблюдения животные имели внешний вид и поведение, соответствующие хорошему общему состоянию. Общее состояние и поведение животных в контрольной группе заметно не отличалось от состояния в опытных группах, в течение всего времени эксперимента животные всех групп равномерно прибавляли в массу тела. Статистически значимых различий по по-

казателю прироста массы в течение шести месяцев эксперимента выявлено не было. Водопотребление возросло соответственно набору массы тела. Наблюдение за динамикой изменения показателей крови, таких как содержание эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов и гематокритной величины, не выявило существенных гематологических сдвигов, все величины находились в пределах физиологической нормы.

В соответствии с программой исследований на шестой месяц эксперимента проводился забой (по 6 животных из каждой группы) для изучения гистоморфологических показателей и цитоархитектоники эритроцитов.

Результаты проведенного сравнительного анализа формы, поверхности и размеров эритроцитов показали (табл. 1), что шестимесячное потребление воды с повышенной концентрацией дейтерия (1000 ppm) существенно ухудшало показатели цитоархитектоники эритроцитов крыс: наблюдалось достоверное снижение процентного содержания нормоцитов по сравнению с контролем до $61 \pm 2,4\%$ за счет достоверного снижения числа дискоцитов до $55 \pm 2\%$. Суммарная доля дегенеративных эритроцитов достоверно увеличилась в 1,4 раза, достигая $21,9 \pm 2,7\%$, в основном за счет эритроцитов с множественными изменени-

ями поверхностной структуры. При этом установлено, что если в целом доля эритроцитов с необратимо измененной формой достоверно не изменилась, то достоверно возросла доля трансформации эритроцитов в стоматоцит. Процентное содержание микро- и макроцитов значимо не отличалось от контрольной группы.

Потребление питьевой воды с пониженной концентрацией дейтерия (10 ppm) достоверно увеличивало процентное содержание нормоцитов в этой группе крыс по сравнению с группой, получающей повышенную концентрацию дейтерия, с контрольной группой, где крысы потребляли воду с концентрацией 145 ppm дейтерия, достоверных изменений не наблюдалось. Суммарная доля дегенеративных эритроцитов достоверно уменьшилась по сравнению с контролем в 1,6 раза и в 2,5 раза по сравнению с группой, потребляющей 1000 ppm дейтерия, достигая $8,7 \pm 0,85\%$, в основном за счет эритроцитов с одним боковым выростом. Общее содержание эритроцитов с необратимо измененной формой в эксперименте достоверно не изменилось, но при этом достоверно увеличена доля трансформации эритроцитов в стоматоцит. Процентное содержание микро- и макроцитов значимо не отличалось от контрольной группы.

Таблица 1

Сравнительный анализ формы, поверхности и размеров эритроцитов при потреблении вод с различной концентрацией дейтерия, Ме [Q1;Q3]

Показатели/ исследованные концентрации дейтерия	10 ppm дейтерия	145 ppm дейтерия	1000 ppm дейтерия
Нормоциты, всего (%)	78,8 [77,2; 79,5]	71,8 [70,8; 78,3]	62,6 [58,4; 64,9]*
Дискоцит, (%)	69,2 [67,2; 71,8]	64,5 [60; 67,4]	56,3 [54,3; 58,3]*
Плоскоцит, (%)	8,65 [7,7; 12]	10,4 [8,5; 11,9]	4,8 [4,7; 7,3]
Эритроциты с необратимо измененной формой, всего, (%)	10,6 [8,6; 12,4]	10,8 [6,7; 12,3]	13,7 [11,1; 16,5]
конусообразный выступ, (%)	2,7 [1,6; 3,2]	2,4 [2,3; 4]	3,3 [2,7; 3,5]
спущенный мяч, (%)	1,7 [0; 2,0]	0,55 [0,4; 1,1]	0,8 [0,4; 1,6]
стоматоцит, парашют, (%)	3,2 [2,8; 3,7]*	2,0 [1,2; 2,7]	3,7 [3,2; 4,4]*
с гребнем, (%)	2 [1,8; 3,6]	2,85 [1,6; 3,6]	3,6 [2,7; 5,2]
сфероцит, (%)	1,35 [0,8; 2,4]	1,6 [1,1; 2,9]	0,9 [0,3; 2,4]
Дегенеративные, всего, (%)	8,65 [7,6; 9,7]*	14,9 [12; 17,2]	21,0 [17,2; 24,7]*
с одним боковым выростом, (%)	2,4 [2,0; 3,6]*	4,9 [3,5; 6,6]	5,7 [4,2; 6,9]
Множественные выросты, (%)	3,5 [2,4; 4,5]	6,6 [5,7; 6,9]	9,3 [6,7; 14,2]
Множественные изменения поверхностной структуры, (%)	1,6 [1,2; 2,7]	1,95 [1,2; 3]	5,5 [4,0; 6,6]*
Микроцит, (%)	0,8 [0,8; 1,7]	1,8 [1,2; 2,9]	3,7 [1,2; 5,3]
Макроцит, (%)	0	0	0

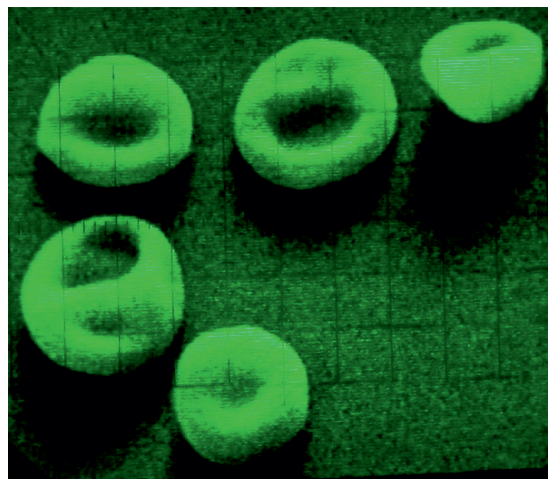
Примечание. * – достоверность по отношению к контрольной группе, $P < 0,05$. Данные представлены медианой и квартилями. Анализ различий проведен по критерию Манна – Уитни.

Функциональная активность эритроцитов обеспечивает адаптацию всего организма к внешним воздействиям. Известно, что от формы эритроцитов частично зависит их стойкость к осмотическому гемолизу, аутогемолизу и, в меньшей степени, к механической травме. Наиболее ускоренный газообмен происходит в эритроцитах в форме двояковогнутого диска, так как дискоциты характеризуются высоким отношением площади поверхности к объему. Поэтому любая молекула гемоглобина, благодаря которой эритроциты осуществляют свою основную функцию – транспорт кислорода и углекислоты, находится близко к поверхности. В стареющих и дегенеративных формах эритроцитов происходит уменьшение энергетического потенциала клетки и, как, например, показано для сфероцитов, нарушается их способность поддерживать градиент натрия и калия, существующий в норме на их мембране [6]. В ряде исследований показано, что вода с повышенной концентрацией дейтерия замедляет скорость биологических реакций, в том числе каскадные реакции дыхательной цепи митохондрий, а изменение формы эритроцитов происходит на фоне истощения АТФ и изменения ионного равновесия за счет накопления Са благодаря угнетению Са АТФ-азы.

Таким образом, в ходе проведения сканирующей электронной микроскопии образцов крови экспериментальных животных, потреблявших воды с концентрацией дейтерия 10 и 1000 ppm, отмечалось, что морфологическая картина эритроцитов в крови животных, получавших воду с содержанием дейтерия 10 ppm, практически не отличалась от контрольной группы по проценту нормальных эритроцитов (нормоцитов), отмечалось снижение числа обратимых форм эритроцитов и рост их дегенеративных форм. Наименьший процент нормальных эритроцитов (нормоцитов) отмечался у животных, получавших воду с содержанием дейтерия, равным 1000 ppm, при этом достоверно увеличивалась доля эритроцитов с измененной формой и дегенеративными изменениями, что, прежде всего, указывает на снижение кислородтранспортной функции крови.

Оценка клеток костного мозга эритроидного ряда (табл. 2) показала, что в группе крыс, потреблявших питьевую воду с повышенным содержанием дейтерия, достоверно увеличен процент оксифильных нормоцитов и достоверно снижено число базофильных нормоцитов в костном мозге. В группе крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия (10 ppm), процент-

ное содержание клеток эритроидного ряда значимо не отличалось от контроля. Увеличение числа оксифильных нормоцитов в костном мозге можно рассматривать как компенсаторную реакцию, вызванную повреждением эритроцитов, как это показано при исследовании поверхностной архитектоники эритроцитов, при потреблении воды с наивысшим содержанием дейтерия. Это подтверждается и расчетом индекса созревания эритроидных клеток, рассчитываемым по формуле: (полихроматофильные + оксифильные нормоциты) / (проэритробласты + базофильные + оксифильные + полихроматофильные нормоциты). Данный индекс составляет 0,7 для группы, потреблявшей воду с пониженным содержанием дейтерия, 0,78 для контрольной группы и 0,84 для группы животных, потреблявших воду с повышенным содержанием дейтерия.



Измененные эритроциты крови крыс при воздействии воды с содержанием дейтерия 1000 ppm

Заключение

На основании сравнительного анализа результатов исследований сканирующей электронной микроскопии форм, поверхности и размеров эритроцитов и цитологического анализа эритроидного ряда клеток костного мозга нелинейных белых крыс в шестимесячном эксперименте выявлено негативное воздействие при длительном потреблении воды с повышенным содержанием дейтерия (1000 ppm). Содержание дейтерия в питьевой воде на уровне 10 ppm оказывало менее выраженное неоднозначное воздействие на показатели цитоархитектоники эритроцитов. Для интерпретации данных результатов требуется проведение дополнительных исследований.

Таблица 2

Цитологический анализ эритроидного ряда клеток костного мозга, Me [Q1;Q3]

Показатели / исследованные концентрации дейтерия	10ppm	145 ppm	1000 ppm
Эритробласты, (%)	0,2 [0,12; 0,26]	0,1 [0,7; 0,11]	0,25 [0,14; 0,36]
Проэритробласты, (%)	2,1 [1,8; 3,6]	2,0 [1,6; 3,2]	1,5 [0,7; 5,4]
Базофильный нормоцит, (%)	5,3 [3,5; 6,6]	5,3 [3,0; 6,9]	2,9 [1,6; 3,2]*
Полихроматофильный нормоцит, (%)	13 [11,2; 16,3]	14,8 [12,1; 17,2]	12,8 [10,7; 15,3]
Оксифильный нормоцит, (%)	4,7 [3,4; 5,7]	5,4 [3,9; 7,1]	9,8 [6,7; 14,3] *

Примечание.* – достоверность по отношению к контрольной группе, $P < 0,05$. Данные представлены медианой и квантилями. Анализ различий проведен по критерию Манна – Уитни.

Применение метода анализа цитоархитектоники эритроцитов и клеток эритроидного ряда костного мозга оправдано для оценки биологической безопасности и эффективности функциональных питьевых вод. Однако нужно заметить что, по мере увеличения возраста лабораторных животных, снижается процентное содержание нормоцитов при увеличении обратимо и необратимо измененных форм [7, 8], а сами эритроциты достаточно быстро реагируют на изменение факторов внешней среды [1, 2], поэтому сроки проведения экспериментальных исследований на животных можно сократить до 30–90 дней.

Список литературы

1. Момот Т.В., Кушнерова Н.Ф., Рахманин Ю.А. Модификация жирнокислотного состава мембран эритроцитов при интоксикации ацетоном // Гигиена и санитария. 2016. Т. 95. № 8. С. 782–785.
 2. Кушнерова Н.Ф., Рахманин Ю.А., Кушнерова Т.В., Другова Е.С. Профилактика нарушений физиологических и биохимических характеристик эритроцитов при интоксикации сероуглеродом. // Гигиена и санитария. 2010. № 4. С. 17–21.

3. Медведев И.Н., Завалишина С.Ю., Краснова Е.Г., Куцафина Н.В. Методические подходы к оценке агрегации и поверхностных свойств тромбоцитов и эритроцитов // Фундаментальные исследования. 2014. № 10–1. С. 117–120.

4. Heckers H., Platt D., Brosche T., Summa J.D. The effect of different fat supplemented diets on the erythrocyte ghosts and plasma lipid composition of geriatric subjects. Arch. Gerontol. Geriatr. 1986. v. 5. № 2. P. 83–95.

5. Михайлова Р.И., Рыжова И.Н., Алексеева А.В., Каменецкая Д.Б., Кочеткова М.Г., Иксанова Т.И. Актуальные проблемы водообеспечения населения РФ // Российская гигиена – развивая традиции, устремляемся в будущее: материалы XII Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей. 2017. С. 294–297.

6. Текуцкая Е.Е., Барышева Е.В., Каде А.Х. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на состояние ДНК лимфоцитов человека в норме и патологии // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 6. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=15441> (дата обращения: 24.10.2018).

7. Макурина О.Н. Агрегация и цитоархитектоника эритроцитов у взрослых крыс // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2015. № 4. С. 57–61.

8. Завалишина С.Ю. Физиологические изменения микроциркуляторных свойств эритроцитов в модели создания дислипидемии у крыс на поздних этапах онтогенеза // Ульяновский медико-биологический журнал. 2017. № 3. С. 181–190.