

Токсическое действие медно-цинковой колчеданной руды на эритропоэз в условиях хронического эксперимента

К.Р. Зиякаева, А.Ф. Каюмова

Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3

Резюме

Природные руды содержат большое количество вредных для здоровья человека компонентов. У работников горно-обогатительных предприятий, длительно контактирующих с этими природными элементами, нередко диагностируется анемия, патогенез которой изучен недостаточно. Цель исследования – детализировать механизмы нарушений эритронона при длительной интоксикации крыс природным комплексом соединений тяжелых металлов, входящих в состав медно-цинковой колчеданной руды. **Материал и методы.** Работа выполнена на 60 белых нелинейных крысах-самцах возраста 3–4 месяца, весом $220,52 \pm 15,51$ г. Животным опытной группы ($n = 40$) ежедневно за час до стандартного кормления перорально вводили водную суспензию порошка медно-цинковой колчеданной руды в хлебном мякише в течение 75–120 дней. Забор крови и костного мозга у крыс опытной группы осуществляли на 75-е, 90-е, 105-е и 120-е сутки, у крыс контрольной группы ($n = 20$) – на 75-е и 105-е сутки эксперимента. Центральное звено эритронона оценивали по количеству и составу эритробластических островков (ЭО) костного мозга, количеству свободных макрофагов, коэффициентам вовлечения в эритропоэз колониеобразующих единиц эритроцитарных (КОЕ-Э) и макрофагов. **Результаты и их обсуждение.** В периферической крови крыс опытной группы количество эритроцитов и содержание гемоглобина было достоверно меньше контрольных значений на 90-е и 120-е сутки, число ретикулоцитов – больше на 75-е, 105-е и 120-е сутки. В костном мозге животных опытной группы встречались лишь единичные ЭО 1-го и 2-го классов зрелости. На протяжении всего эксперимента содержание свободных макрофагов и ЭО с ретикулоцитарной короной в их костном мозге было повышенным, а концентрация связанного железа и сывороточного эритропоэтина в крови – напротив, пониженной. Показатель интенсивности вовлечения КОЕ-Э в эритропоэз был меньше контрольных значений в 2 раза на 105-е и 120-е сутки. **Заключение.** При длительном пероральном введении медно-цинковой колчеданной руды в костном мозге крыс угнетается процесс образования ЭО *de novo* путем дестабилизации контактов свободных костно-мозговых макрофагов с молодыми эритроидными клетками. В сыворотке крови снижается содержание эритропоэтина и связанного железа, что в совокупности с изменением характера эритропоэза приводит к уменьшению количества эритроцитов и гемоглобина в периферической крови.

Ключевые слова: эритропоэз, эритробластический островок, эритроциты, тяжелые металлы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Зиякаева К.Р., e-mail: klazia@yandex.ru

Для цитирования: Зиякаева К.Р., Каюмова А.Ф. Токсическое действие медно-цинковой колчеданной руды на эритропоэз в условиях хронического эксперимента. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40 (6): 70–79. doi: 10.15372/SSMJ20200607

Toxic effect of copper-zinc pyrite ore on erythropoiesis in chronic experiment

K.R. Ziyakaeva, A.F. Kayumova

Bashkir State Medical University of Minzdrav of Russia
450008, Ufa, Lenin str., 3

Abstract

Natural ores contain a large number of harmful components for human health. Workers of mining and processing enterprises, who have long-term contact with these natural elements, are often diagnosed with anemia, that pathogenesis is not sufficiently studied. Aim of the study was to detail the mechanisms of rats' erythron disorders in the long-term

intoxication by natural complex of heavy metal compounds of copper-zinc pyrite ore. **Material and methods.** The work was performed on 60 white non-linear male rats aged 3–4 months weighing $220,52 \pm 15,51$ g. The experimental group of animals ($n = 40$) were injected orally with water suspension of copper-zinc powder in a bread crumb an hour before standard feeding during 75–120 days. The blood and bone marrow of experimental groups of rats were carried out on the 75-th, 90-th, 105-th and 120-th days of the experiment. The blood and bone marrow of rats' control groups were studied on the 75-th and 105-th day. The central part of erythron was assessed by the number and composition of the erythroblastic islets (EI) of bone marrow, the number of free macrophages, the coefficients of involvement of colony-forming units of red blood cells (CFU-E) and macrophages into erythropoiesis. **Results.** In the peripheral blood of experimental rats the number of red blood cells and the content of hemoglobin were reliably less than the control values on the 90-th and 120-th day, the number of reticulocytes was exceeded the control group on the 75-th, 105-th and 120-th day. In the bone marrow of experimental rats there were only a single EI1 and EI2 classes of maturity. Throughout the experiment, the content of free macrophages and EI with reticulocytes «crown» in the bone marrow of rats was elevated, and the concentration of iron and erythropoietin in the blood, on the contrary, was reduced. The intensity of CFU-E involvement in the erythropoiesis was less than the control level by 2 times on 105th and 120th days of the experiment. **Conclusion.** With long-term introduction of copper-zinc pyrite ore in the bone marrow of rats the process of formation of EI de novo is suppressed by destabilizing the contact of free bone macrophages with young red blood cells. There is reduces in the content of serum erythropoietin and bound iron, that combines with the change of erythropoiesis nature, leads to decreasing of the number of mature red blood cells and content of hemoglobin in the peripheral blood.

Key words: erythropoiesis, erythroblastic islet, red blood cells, heavy metals.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Ziyakaeva K.R., e-mail: klazia@yandex.ru

Citation: Ziyakaeva K.R., Kayumova A.F. Toxic effect of copper-zinc pyrite ore on erythropoiesis in chronic experiment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020; 40 (6): 70–79. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200607

Введение

Загрязнение окружающей среды солями тяжелых металлов оказывает значительное влияние на здоровье населения и продолжает оставаться одной из наиболее актуальных проблем современности. Особую опасность для человека представляют соли ртути, свинца, кадмия, кобальта, меди, цинка, железа. В микродозах тяжелые металлы, входящие в состав биологических активных веществ, регулируют нормальные процессы жизнедеятельности, но в то же время, накапливаясь в значительных количествах, они способны вызвать структурные и функциональные нарушения в органах и тканях. В организме млекопитающих система крови – одна из самых чувствительных, так называемых «критических». Изменения в крови появляются уже при действии сравнительно малых доз токсических веществ [1] и зачастую являются единственным показателем возникающего заболевания или начала развития осложнений [2]. Сам факт влияния отдельных тяжелых металлов на систему крови описан в литературе [3, 4], однако сведения об ответных реакциях гемопоэтической ткани при сочетанной интоксикации противоречивы и недостаточны для четкого определения общих медико-экологических закономерностей токсического влияния природных соединений на организм. Изучение

патогенеза металл-индуцированных анемий и поиск возможных путей их коррекции – актуальные задачи для медицинской науки Башкортостана, который занимает второе место в Уральском регионе по промышленному потенциалу и является крупнейшим индустриальным центром России. На территории Башкортостана находятся 5 активно разрабатываемых месторождений колчеданных руд, в состав которых входят свинец, селен, теллур, кадмий, никель, кобальт, мышьяк, ртуть, сурьма, таллий и барий.

В настоящем исследовании была использована экспериментальная модель хронической интоксикации природным комплексом солей тяжелых металлов, с которым постоянно контактируют работники одного из крупнейших предприятий горно-добывающей промышленности России, расположенного в Республике Башкортостан – Учалинского горно-обогатительного комбината. У людей, подвергающихся ежедневному воздействию медно-цинковой колчеданной руды, при скрининговых исследованиях нередко диагностируется анемия, центральные и периферические механизмы возникновения которой изучены недостаточно [5].

Особенностью настоящего исследования металл-индуцированных анемий является изучение эритробластических островков (ЭО) – морфофункциональных клеточных образований, кото-

рые состоят из центрально-расположенных макрофагов, окруженных многослойной «коронай» развивающихся эритроидных клеток (от проэритробластов до ретикулоцитов) [6–8]. Количественный и качественный анализ состояния ЭО используется в экспериментальной гематологии для оценки последовательности волн амплификации и темпа созревания эритроидных клеток при стимуляции [9] или ингибировании эритропоэза [10], а также при оценке состояния эритропоэза при соматической экспериментальной патологии [11]. Детальная характеристика нарушений «островкового» эритропоэза при хронической интоксикации солями тяжелых металлов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, позволила описать механизмы повреждения эритрона с целью поиска мишени для их коррекции, что с учетом высокой вероятности возникновения заболеваний крови у работников горно-добывающей отрасли, ежедневно контактирующих с солями тяжелых металлов, даст возможность в дальнейшем включить полученные результаты в методику управления профессиональным риском у горнорабочих, направленную на сохранение их здоровья и работоспособности.

Цель исследования – изучить механизмы нарушений эритрона при длительной интоксикации крыс природным комплексом соединений тяжелых металлов, входящих в состав медно-цинковой колчеданной руды.

Материал и методы

Работа выполнена на 60 белых нелинейных крысах-самцах возраста 3–4 месяца весом $220,52 \pm 5,51$ г. Исследование проведено с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» 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 $+24 \pm 2$ °С в соответствии с правилами СП 2.2.1.3218. Все болезненные манипуляции с животными и эвтаназию путем декапитации проводили под эфирным наркозом в отдельном от вивария помещении.

Образец исследуемой руды предоставлен ОАО «Учалинский горно-обогатительный комбинат» (г. Учалы, Республика Башкортостан). Его компонентный анализ выполнен на атомно-

абсорбционном (Shimadzu AA 6200, Япония) и рентгенофлуоресцентном (Shimadzu EDX 800, Япония) спектрометрах в Управлении государственного аналитического контроля Республики Башкортостан.

Для создания экспериментальной модели хронической интоксикации опытным группам животных (4 группы по 10 крыс в каждой) ежедневно за час до стандартного кормления перорально вводили водную суспензию порошка медно-цинковой колчеданной руды в хлебном мякише. Вводимую дозу руды для опытной группы крыс рассчитывали исходя из предельно допустимой концентрации свинца (0,2–0,5 мг/кг) и кадмия (0,02–0,1 мг/кг) в зерне и хлебе [12]. Дозу руды корректировали каждый раз после очередного взвешивания животного (через каждые 14–15 дней). В контрольные группы вошли крысы, получавшие хлебный мякиш без медно-цинковой колчеданной руды. Поскольку эксперимент был длительным, и показатели исследовались на протяжении 45 дней, для адекватного сравнения результатов были сформированы две контрольные группы животных, одну из которых вывели из эксперимента на 75-е сутки (контроль 1, $n = 10$), другую – на 105-е сутки (контроль 2, $n = 10$). Крыс опытных групп выводили из эксперимента на 75-е, 90-е, 105-е и 120-е сутки эксперимента.

Перед забоем из хвостовой вены забирали кровь, помещали ее в микропробирки с ЭДТА, а затем на ветеринарном полуавтоматическом гематологическом анализаторе Exigo 19 (Boule Diagnostics AB, Швеция) определяли количество эритроцитов и концентрацию гемоглобина. Кровь для подсчета ретикулоцитов окрашивали в пробирках готовым раствором бриллиантового крезилового синего (ЗАО «ЭКОлаб», Россия), количество клеток определяли с помощью комплекса автоматической микроскопии МЕКОС-Ц2 софт (Россия) на микроскопе AXIO Lab.A1 (Zeiss AG, Германия) при увеличении $\times 900$, используя масляную иммерсию. Результат выражали в абсолютных значениях ($10^9/\text{л}$) = ретикулоциты (%) \times количество эритроцитов ($10^{12}/\text{л}$)/100 %. Содержание эритропоэтина в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа на микропланшетном фотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) с помощью набора реагентов «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-БЕСТ», Россия). Концентрацию сывороточного связанного железа измеряли колориметрическим феррозиновым методом на полуавтоматическом фотометре Stat Fax 1904+ с помощью набора реагентов «Железо-ФЗ-UTS» (ЗАО «Юнимед», Россия).

Ответную реакцию центрального звена эритрона оценивали по количественному и качественному составу ЭО костного мозга. Выделение ЭО из костного мозга и подсчет их абсолютного количества проводили методами, разработанными Ю.М. Захаровым и А.Г. Рассохиным [13]. У бедренных костей отсекали проксимальные и дистальные концы и выдували костный мозг с помощью шприца, наполненного 2 мл среды выделения, которая содержала 66 % среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), 32 % сывороточного альбумина («ПанЭко») и 1 % гепарина (ООО «МиниМед», Россия). Полученную суспензию клеток фильтровали через капроновую ткань и получали клеточную взвесь, очищенную от волокон стромы и сосудов. Для подсчета абсолютного количества ЭО на часовом стекле смешивали 0,1 мл взвеси клеток костного мозга, 0,1 мл 0,1 % раствора нейтрального красного (ЗАО «Химреактивснаб», Россия) и 0,1 мл среды выделения. ЭО с окрашенными в красный цвет центральными макрофагами подсчитывали во всех клетках камеры Горяева при увеличении микроскопа $\times 200$. Абсолютное содержание ЭО в костном мозге одной бедренной кости рассчитывали по формуле: $A = (n \times 3 \times 2000) / (0,9 \times 2)$, где A – число ЭО в одной бедренной кости; n – число ЭО в 225 больших квадратах камеры Горяева; 3 – разведение исходной взвеси; 2000 – общий объем полученной взвеси клеток костного мозга (мм^3); 0,9 – объем камеры Горяева (мм^3); 2 – две бедренные кости. Далее костно-мозговую взвесь разливали по чашкам Петри и инкубировали 30 мин в термостате при температуре $+37^\circ\text{C}$, за это время макрофаги с «коронай» из эритроидных клеток и свободные костно-мозговые макрофаги адгезировались к пластику. После инкубирования ЭО с помощью пастеровской пипетки осторожно отмывали средой RPMI-1640 от не прилипших клеток. Чашки Петри центрифугировали 3 мин при 1000 об/мин в бакет-ротаторе (Eppendorf, Германия) для равномерного распределения клеток ЭО. Препараты фиксировали 2–3 мин по Май – Грюнвальду красителем-фиксатором «эозин – метиленовый синий» (ООО «МиниМед», Россия), отмывали фосфатным буфером с pH 6,7, а затем 8–10 мин окрашивали 1%-м красителем Гимза («ПанЭко»).

ЭО различных классов зрелости подсчитывали методом световой микроскопии при увеличении $\times 900$ с использованием масляной иммерсии. ЭО разделяли на пять классов зрелости по методике, предложенной Ю.М. Захаровым и А.Г. Рассохиным [13]. «Корона» ЭО 1-го класса представлена проэритробластами и базофильными эритробластами с числом клеток от 2 до 8, ЭО 2-го класса – базофильными и ранними по-

лихроматофильными 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, в «короне» инволюцирующих островков (ЭОинв) – поздние полихроматофильные эритробласты, оксифильные нормобласты и ретикулоциты с числом ядро-содержащих клеток менее 16. К реконструирующимся островкам (ЭОрек) относили ЭОинв, 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 (КОЕ-Э). Кроме того, в этих же препаратах подсчитывали количество свободных отдельно лежащих макрофагов и количество ЭО, «корона» которых состояла только из ретикулоцитов. Для оценки эффективности костно-мозгового эритропоэза [13] рассчитывали: 1) показатель интенсивности вовлечения КОЕ-Э в эритропоэз ($\text{ЭО1} + \text{ЭОрек}$); 2) показатель созревания эритробластов ($(\text{ЭО3} + \text{ЭОинв}) / (\text{ЭО1} + \text{ЭО2} + \text{ЭОрек})$); 3) показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз ($\text{ЭОрек} / \text{ЭОинв}$).

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

При длительном воздействии компонентов медно-цинковой колчеданной руды в периферической крови подопытных животных наблюдалась волнообразная динамика количества эритроцитов и гемоглобина (табл. 1). Число эритроцитов оказалось достоверно меньше контрольных значений на 90-е и 120-е сутки, содержание – на 90-е, 105-е и 120-е сутки. В то же время динамика ретикулоцитарного ответа эритрона у крыс, получавших медно-цинковую колчеданную руду, была более сложной: первый ретикулоцитарный «всплеск» наблюдался на 75-е сутки, второй – к 120-м суткам. Концентрация эритропоэтина в сыворотке крови животных опытной группы была ниже, чем у крыс контрольной группы, на 105-е

Таблица 1. Показатели периферического звена эритрона при хроническом введении медно-цинковой колчеданной руды**Table 1.** Indicators of peripheral sector of rat's erythron with chronic injection of copper-zinc pyrite ore

Срок наблюдения	Количество эритроцитов, $\times 10^{12}/л$	Содержание гемоглобина, г/л	Количество ретикулоцитов, $\times 10^9/л$	Содержание эритропоэтина в сыворотке, мМЕ/мл	Связанное железо, мкмоль/л
Контроль 1 ($n = 10$)	7,21 \pm 0,22	140,67 \pm 1,56	1,42 \pm 0,12	2,78 \pm 0,32	46,01 \pm 3,11
75-е сутки ($n = 10$)	7,13 \pm 0,38	136,61 \pm 7,21	2,67 \pm 0,12*	2,11 \pm 0,13	31,89 \pm 1,67*
90-е сутки ($n = 10$)	6,56 \pm 0,18*	133,56 \pm 2,45*	1,56 \pm 0,21#	2,02 \pm 0,21	31,45 \pm 1,32*
Контроль 2 ($n = 10$)	7,41 \pm 0,21	144,45 \pm 2,89	1,01 \pm 0,12	2,67 \pm 0,22	46,21 \pm 1,42
105-е сутки ($n = 10$)	6,56 \pm 0,31	134,01 \pm 2,21*	1,89 \pm 0,21*	1,56 \pm 0,21*	31,01 \pm 1,89*
120-е сутки ($n = 10$)	6,42 \pm 0,12*	132,02 \pm 2,78*	2,78 \pm 0,32*	1,21 \pm 0,12*	28,41 \pm 1,32*

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: показатели, зарегистрированные на 75-е и 90-е сутки, сравнивали с контрольной группой 1, зарегистрированные на 105-е и 120-е сутки – с контрольной группой 2; обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от соответствующих показателей: * – контрольной группы, # – предыдущего срока наблюдения.

Таблица 2. Общая характеристика эритропоэза в костном мозге при хроническом введении медно-цинковой колчеданной руды**Table 2.** The general characteristic of erythropoiesis in the bone marrow with chronic injection of copper-zinc pyrite ore

Срок наблюдения	Абсолютное количество ЭО, $\times 10^3$ на бедренную кость	Количество ЭО с ретикулоцитарной «коронай», $\times 10^3$ на бедренную кость	Количество свободных макрофагов, $\times 10^3$ на бедренную кость
Контроль 1 ($n = 10$)	323,41 \pm 20,12	1,22 \pm 0,67	6,43 \pm 1,42
75-е сутки ($n = 10$)	437,01 \pm 30,12*	48,31 \pm 10,67*	54,01 \pm 7,02*
90-е сутки ($n = 10$)	361,56 \pm 10,78#	19,81 \pm 1,63*#	27,21 \pm 2,53*#
Контроль 2 ($n = 10$)	368,01 \pm 6,12	2,21 \pm 0,89	6,67 \pm 0,78
105-е сутки ($n = 10$)	290,67 \pm 21,71*	20,41 \pm 1,89*	26,01 \pm 1,82*
120-е сутки ($n = 10$)	254,78 \pm 22,01*	11,51 \pm 1,92*#	17,61 \pm 1,22*#

сутки, а содержание сывороточного железа – на протяжении всего эксперимента.

Изучение количественного и качественного состава ЭО костного мозга – клеточных ассоциаций, состоящих из центрально расположенного макрофага с «коронай» эритроидных клеток разной степени зрелости, позволило нам изучить особенности взаимодействия между клетками двух гемопоэтических линий и охарактеризовать результаты длительного токсического влияния медно-цинковой колчеданной руды на эритропоэз. Посредством морфологического анализа разных классов ЭО мы смогли косвенно оценить количество КОЕ-Э, вступивших в дифференцировку, охарактеризовали синхронность волн амплификации, а также скорость дифференцировки и созревания эритроидных клеток в ЭО.

На 75-е сутки воздействия введения медно-цинковой колчеданной руды в костном мозге животных наблюдалось увеличение абсолютного количества ЭО (табл. 2), что было связано с су-

щественным приростом в костном мозге числа островков, содержащих в своей «короне» только ретикулоцитарные клетки. На 90-е сутки общее количество ЭО не отличалось от контрольного значения, а на 105-е и 120-е сутки стало достоверно меньше, чем у контрольных животных. Число свободных макрофагов и ЭО с ретикулоцитарной «коронай» в эти сроки наблюдения по-прежнему превышало контрольные значения.

При морфологической классификации ЭО (табл. 3) установлено, что к 75-м суткам введения медно-цинковой колчеданной руды в костном мозге животных опытной группы встречались лишь единичные ЭО 1-го и 2-го классов зрелости, число ЭО 3-го класса зрелости не отличалось от контрольных значений, количество ЭОинв и ЭОрек было больше по сравнению с контролем. На 90-е сутки эксперимента среди ЭО костного мозга по-прежнему встречались лишь единичные ЭО 1-го и 2-го классов зрелости, количество ЭО3 и ЭОрек соответствовало показателям кон-

Таблица 3. Динамика количества ЭО различных классов зрелости ($\times 10^3$ на бедренную кость) при хроническом введении медно-цинковой колчеданной руды**Table 3.** Dynamics of the amount of EI of different classes of maturity ($\times 10^3$ /femur) with chronic injection of copper-zinc pyrite ore

Срок наблюдения	ЭО1	ЭО2	ЭО3	ЭОинв	ЭОрек
Контроль 1 ($n = 10$)	15,89 \pm 2,11	23,67 \pm 2,51	97,52 \pm 6,21	143,12 \pm 13,11	43,21 \pm 3,67
75-е сутки ($n = 10$)	1,22 \pm 0,78*	3,72 \pm 2,31*	92,42 \pm 6,11	276,78 \pm 32,31*	63,01 \pm 3,92*
90-е сутки ($n = 10$)	3,31 \pm 0,92*	6,82 \pm 1,91*	93,11 \pm 4,12	212,31 \pm 11,89*	46,23 \pm 3,91 [#]
Контроль 2 ($n = 10$)	23,61 \pm 1,89	33,11 \pm 0,89	119,42 \pm 5,21	132,41 \pm 3,13	59,52 \pm 3,31
105-е сутки ($n = 10$)	0,91 \pm 0,56*	5,41 \pm 1,11*	80,78 \pm 7,22*	167,82 \pm 6,23*	35,62 \pm 2,56*
120-е сутки ($n = 10$)	4,01 \pm 1,02* [#]	12,11 \pm 2,11* [#]	72,21 \pm 6,51*	126,01 \pm 12,12 [#]	40,52 \pm 3,53*

Таблица 4. Показатели, характеризующие активность эритропоэза в костном мозге, при хроническом введении медно-цинковой колчеданной руды**Table 4.** Indicators of the activity of erythropoiesis in the bone marrow, with chronic injection of copper-zinc pyrite ore

Срок наблюдения	Показатель интенсивности вовлечения КОЕ-Э в эритропоэз, $\times 10^3$ на бедренную кость)	Показатель созревания эритробластов, отн. ед.	Показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз, отн. ед.
Контроль 1 ($n = 10$)	59,11 \pm 5,42	3,01 \pm 0,32	0,32 \pm 0,01
75-е сутки ($n = 10$)	64,21 \pm 3,33	5,52 \pm 0,43*	0,2 \pm 0,01*
90-е сутки ($n = 10$)	49,42 \pm 4,61	5,89 \pm 0,56*	0,2 \pm 0,01*
Контроль ($n = 10$)	83,12 \pm 2,61	2,21 \pm 0,13	0,5 \pm 0,03
105-е сутки ($n = 10$)	36,56 \pm 2,78*	5,89 \pm 0,31*	0,2 \pm 0,01*
120-е сутки ($n = 10$)	44,56 \pm 3,42*	3,51 \pm 0,21* [#]	0,3 \pm 0,01* [#]

трольной группы, число ЭОинв превышало контрольные значения. Аналогичный качественный состав ЭО был зарегистрирован и на 105-е сутки. К 120-м суткам количество ЭО1 и ЭО2 увеличилось по сравнению с предыдущим этапом, но не достигло контрольного уровня, количество ЭОинв приблизилось к контрольным значениям, в остальном динамика эритропоэза в ЭО осталась прежней.

Углубленный анализ состояния эритропоэза в группах животных, получавших медно-цинковую колчеданную руду, выявил ряд изменений функциональных показателей (табл. 4): показатель интенсивности вовлечения КОЕ-Э в эритропоэз уменьшился к 105-м суткам, показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз был достоверно меньше, а показатель созревания эритробластов – достоверно больше контрольных значений на протяжении всего эксперимента.

Обсуждение результатов

В ранее проведенном исследовании нами получены данные о том, что на протяжении 60 дней непрерывной интоксикации животных компонентами медно-цинковой колчеданной руды первич-

ное присоединение КОЕ-Э к свободным костно-мозговым макрофагам (эритропоэз *de novo*) полностью прекратилось [14, 15]. В настоящем исследовании, в ходе которого интоксикация солями тяжелых металлов продолжалась в течение четырех месяцев, установлено, что нарушения процесса образования красных клеток крови в организме при воздействии компонентов медно-цинковой колчеданной руды являются очень глубокими, поскольку и по прошествии 120 дней функциональная активность центрального звена эритрона характеризовалась отсутствием адаптации к повреждающему фактору. В костном мозге животных опытной группы отмечался значительный рост числа свободных (резидентных) макрофагов (см. табл. 2), а новые ЭО могли формироваться только на основе костно-мозговых макрофагов, уже имеющих эритроидную «корону» (ЭОрек). Поскольку в костном мозге в должном объеме не происходило образования новых молодых ЭО, то по мере нарастания интоксикации уменьшалось количество созревающих островков (ЭО 2-го и 3-го классов), и в целом в гемопозитической ткани преобладали процессы инволюции, о чем свидетельствовало большое количество ЭОинв (см. табл. 3).

Мы полагаем, что нарушения в центральном звене эритрона при хронической интоксикации организма компонентами медно-цинковой колчеданной руды возникли при реализации нескольких патофизиологических механизмов. Изменения, обнаруженные нами в количественном и качественном составе ЭО, несомненно, связаны с дисфункцией костно-мозговых макрофагов, вокруг которых должна образовываться эритроидная «корона». Явное торможение процесса формирования ЭО *de novo* могло развиваться вследствие снижения способности макрофагов к миграции в гемопозитической ткани. Тяжелые металлы, в частности кобальт, подавляют эту функцию путем активации в макрофагальных клетках матриксной металлопротеиназы-9 [16], а мышьяк тормозит экспрессию генов макрофагальных хемокинов MMP9, MMP12, CCL22, SPON2 и CXCL2 [17]. Кроме того, тяжелые металлы вызывают в макрофагах усиление продукции тормозящего эритропоэза цитокина – фактора некроза опухоли альфа [18]. Негативное влияние тяжелых металлов могло отразиться и на фагоцитарной функции макрофагов, необходимой для завершения созревания эритроидных клеток – поглощения ядер, вытолкнутых оксифильными эритробластами. Показано, что, например, мышьяк начинает угнетать фагоцитарную способность макрофагов уже через 18 ч после воздействия [19]. Накопление в костном мозге ЭОинв, «корона» которых преимущественно состоит из оксифильных эритробластов (см. табл. 3), и увеличение показателя созревания эритробластов (см. табл. 4) свидетельствуют о том, что задержка созревания эритроидных клеток происходила именно на этапе «оксифильный эритробласт – ретикулоцит» и, скорее всего, была вызвана угнетением фагоцитарной способности макрофагов ЭО.

Нарушение межклеточных взаимодействий в эритроидной ткани костного мозга, развивающееся под влиянием компонентов медно-цинковой колчеданной руды, могло быть связано и с изменением функционального состояния костно-мозговых лимфоидных клеток, которые, как известно, также входят в состав ЭО и активно регулируют «островковый» эритропоэз [20, 21]. Соли тяжелых металлов в высоких концентрациях (120-е сутки) снижают жизнеспособность этих клеток, нарушают целостность мембран, повышают в них продукцию активных форм кислорода, подавляют пролиферацию и способность к миграции [22, 23].

Еще одной причиной неэффективного функционирования центрального звена эритрона явилось снижение продукции почечного эритропо-

этина у животных, подвергшихся воздействию медно-цинковой колчеданной руды (см. табл. 1). Показано, что такие тяжелые металлы, как кадмий и кобальт, даже в условиях гипоксии подавляют экспрессию мРНК эритропоэтина и продукцию самого гормона путем угнетения активности транскрипционного фактора NIF-1 [24].

В ходе работы нами также установлено, что хроническая интоксикация компонентами медно-цинковой колчеданной руды сопровождается нарушением обмена железа в организме животных. Достоверное снижение количества сывороточного железа, регистрируемое на протяжении всего эксперимента, вероятно, связано с усиленной продукцией железосодержащих детоксикационных ферментов в печени, за счет чего сывороточное железо потреблялось гепатоцитами активнее, чем в норме, а также с уменьшением всасывания его в тонком кишечнике вследствие конкурентной повышенной абсорбции меди и цинка.

Периферическое звено эритрона при длительной интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой характеризовалось качественной неполноценностью вновь образованных клеток красной крови, поскольку на фоне активной ретикулоцитарной реакции костного мозга количество эритроцитов и гемоглобина в крови было снижено. Ранее нами показано, что уже на 10-е сутки введения медно-цинковой колчеданной руды снижается осмотическая устойчивость эритроцитов при одновременном увеличении их объема, что свидетельствует об иницированном компонентами руды нарушении трансмембранного переноса воды, которое вызывало гемолиз эритроцитов. При анализе кислотной резистентности эритроцитов в том же эксперименте получены данные об уменьшении общего времени гемолиза и значительном снижении доли высокоустойчивых к действию кислотного гемолитика эритроцитов у крыс, получавших медно-цинковую колчеданную руду [25].

Таким образом, в исследуемые нами сроки ответной реакции эритрона на хроническое воздействие солей тяжелых металлов, содержащихся в медно-цинковой колчеданной руде, в течение 75–90 суток изменения в периферическом звене могли быть компенсированы центральными механизмами эритропоэза. После 105-х суток из-за значительного снижения продукции эритропоэтина в почках произошло уменьшение количества ЭО в костном мозге как вследствие снижения интенсивности вовлечения КОЕ-Э в эритропоэз, так и, вероятно, в связи с развивающимся эриптозом, определяющим преждевременную гибель эритроцитов [26].

Заключение

Хроническая интоксикация компонентами медно-цинковой колчеданной руды вызывает дисфункцию красного ростка кроветворения, проявляющуюся в подавлении процесса новообразования ЭО в костном мозге и торможении созревания эритроидных клеток на этапе «оксифильные эритробласты – ретикулоциты». Длительное токсическое действие солей тяжелых металлов, содержащихся в руде, приводит к нарушению синтеза эритропоэтина в почках и снижению количества сывороточного железа у экспериментальных животных.

Список литературы / References

1. Островская С.С., Шаторная В.Ф., Бельская Ю.А. Влияния тяжелых металлов и радиации на кроветворение у крыс. *Світ мед. та біол.* 2014; 47 (4): 177–179.
2. Ostrovskaya S.S., Shatornaya V.F., Belskaya Yu.A. Effects of heavy metals and radiation on rat's hemotosis. *Svit meditsini ta biologii = World of Medicine and Biology.* 2014; 47 (4): 177–179. [In Russian].
3. Рыспекова Н.Н., Нурмухамбетов А.Н., Аскарва А.Е., Аканов А.А. Роль тяжелых металлов в развитии анемий (обзор литературы). *Вестн. КазНМУ.* 2013; (3-2): 46–51.
4. Ryspekova N.N., Nurmukhambetov A.N., Askarova A.E., Akanov A.A. Role of heavy metals in anemia (Review). *Vestnik Kazakhskogo Natsional'nogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of the Kazakh National Medical University.* 2013; 3 (2): 46–51. [In Russian].
5. Medina S., Xu H., Wang S.C., Lauer F.T., Liu K.J., Burchiel S.W. Low level arsenite exposures suppress the development of bone marrow erythroid progenitors and result in anemia in adult male mice. *Toxicol. Lett.* 2017; 273: 106–111. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.03.021
6. Zhang Y., Wang S., Chen C., Wu X., Zhang Q., Jiang F. Arsenic primes human bone marrow CD34+ cells for erythroid differentiation. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2015; 2015: 751013. doi: 10.1155/2015/751013
7. Бакиров А.Б., Сулейманов Р.А., Валеев Т.К. Опыт оценки риска здоровью населения горнорудных территорий, обусловленного водным фактором. *Мед. труда и экол. человека.* 2016; 2: 5–13.
8. Bakirov A.B., Suleimanov R.A., Valeev T.K. Experience of assessing water-related health risks to the population of the surrounding areas of mining. *Meditsina truda i ekologiya cheloveka = Occupational Medicine and Human Ecology.* 2016; 2: 5–13. [In Russian].
9. Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние эритропоэтина и макрофагального колониестимулирующего фактора на пролиферативную активность эритроидных клеток в культурах эритробластических островков. *Мед. академ. журн.* 2003; 3 (3): 67–72.
10. Tishevskaya N.V., Shevyakov S.A., Zakharov Yu.M. The effect of erythropoietin and macrophage colony stimulating factor on the proliferative activity of erythroid cells in cultures of erythroblastic islets. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal.* 2003; 3 (3): 67–72. [In Russian].
11. Yeo J.H., Cosgriff M.P., Fraser S.T. Analyzing the formation, morphology, and integrity of erythroblastic islands. *Methods Mol. Biol.* 2018; 1698: 133–152. doi: 10.1007/978-1-4939-7428-3_8
12. Hom J., Dulmovits B.M., Mohandas N., Blanc L. The erythroblastic island as an emerging paradigm in the anemia of inflammation. *Immunol. Res.* 2015; 63 (1-3): 75–89. doi: 10.1007/s12026-015-8697-2
13. Захаров Ю.М., Тишевская Н.В., Шевяков С.А. Влияние гуморальных факторов на фагоцитарную активность центральных макрофагов в культуре эритробластических островков. *Рос. физиол. журн.* 2002; 88 (9): 1191–1198.
14. Zakharov Yu.M., Tishevskaya N.V., Shevyakov S.A. The effect of humoral factors on phagocytic activity of central macrophages in the erythroblast islet culture. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal imeni Ivana Mikhaylovicha Sechenova = Russian Journal of Physiology.* 2002; 88 (9): 1191–1198. [In Russian].
15. Tishevskaya N.V., Zakharov Yu.M., Golubotovskii E.V., Kolesnikov O.L., Trofimova N.V., Arkhipenko Yu.V., Sazontova T.G. Effects of fullerene C₆₀(OH)₂₄ on erythropoiesis *in vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014; 157 (1): 49–51. doi: 10.1007/s10517-014-2489-x
16. Волчегорский И.А., Тишевская Н.В., Деметьева Е.В. Антианемическое действие реамберина в остром периоде аллоксанового диабета у крыс. *Эксперим. и клин. фармакология.* 2008; 71 (6): 23–27. doi: 10.30906/0869-2092-2008-71-6-23-27
17. Volchegorskii I.A., Tishevskaya N.V., Dement'eva E.V. Antianemic effect of reamberin in rats with acute alloxan-induced diabetes. *Ekspieriment'naya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology.* 2008; 71 (6): 23–27. [In Russian]. doi: 10.30906/0869-2092-2008-71-6-23-27
18. Сульдина Т.И. Содержание тяжелых металлов в продуктах питания и их влияние на организм. *Рац. питание, пищ. добавки и биостимуляторы.* 2016; 1: 136–140.
19. Suldina T.I. The content of heavy metals in food and their effects on the body. *Ratsional'noye pitaniye, pishchevyye dobavki i biostimulyatory = Rational Nutrition, Nutritional Supplements and Biostimulants.* 2016; 1: 136–140. [In Russian].
20. Захаров Ю.М., Рассохин А.Г. Эритробластический островок. М.: Медицина, 2002. 280 с.
21. Zakharov Yu.M., Rassokhin A.G. Erythroblastic Island. Moscow: Meditsina, 2002. 280 p. [In Russian].

14. Зиякаева К.Р., Каюмова А.Ф. Состояние эритрона у крыс при интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой. *Рос. физиол. журн.* 2019; 105 (6): 780–789. doi: 10.1134/S0869813919 0 60128
Ziyakaeva K.R., Kayumova A.F. Copper-Zinc pyrite ore intoxication affects erythron of rats. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal imeni Ivana Mikhaylovicha Sechenova = Russian Journal of Physiology.* 2019; 105 (6): 780–789. [In Russian]. doi: 10.1134/S0869813919 0 60128
15. Ziyakaeva K.R., Kayumova A.F. Changes in erythron of experimental rats under influence of pyrite ore. «Agritech-II-2019: Agribusiness, environmental engineering and biotechnologies»: coll. thes. rep. 2nd international scientific conf., Krasnoyarsk, November 13–14, 2019. Krasnoyarsk; 2020. 052026. doi:10.1088/1755-1315/421/5/052026
16. Xu J., Yang J., Nyga A., Ehteramyan M., Moraga A., Wu Y., Zeng L., Knight M.M., Shelton J.C. Cobalt (II) ions and nanoparticles induce macrophage retention by ROS-mediated down-regulation of RhoA expression. *Acta Biomater.* 2018; 72: 434–446. doi: 10.1016/j.actbio.2018.03.054
17. Bourdonnay E., Morzadec C., Sparfel L., Galibert M.D., Jouneau S., Martin-Chouly C., Fardel O., Vernhet L. Global effects of inorganic arsenic on gene expression profile in human macrophages. *Mol. Immunol.* 2009; 46 (4): 649–656. doi: 10.1016/j.molimm.2008.08.268
18. Gardner R.M., Nyland J.F., Evans S.L., Wang S.B., Doyle K.M., Crainiceanu C.M., Silbergeld E.K. Mercury induces an unopposed inflammatory response in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Environmental Health Perspectives.* 2009; 117 (12): 1932–1938. doi: 10.1289/ehp.0900855
19. Xu H., Wang X., Wang W. Functional suppression of macrophages derived from THP-1 cells by environmentally-relevant concentrations of arsenite. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2018; 214: 36–42. doi: 10.1016/j.cbpc.2018.08.010
20. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Современный взгляд на роль Т-лимфоцитов в регуляции эритропоза. *Успехи соврем. биологии.* 2016; 136 (1): 83–96.
Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. A modern view of the role of T-lymphocytes in regulation of erythropoiesis. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews.* 2016; 136 (1): 83–96. [In Russian].
21. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Роль Т-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов. *Успехи соврем. биологии.* 2015; 135 (2): 189–202.
Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. The role of T-lymphocytes in hormonal regulation of morphogenetic processes. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews.* 2015; 135 (2): 189–202. [In Russian].
22. Kim S.H., Sharma R.P. Cytotoxicity of inorganic mercury in murine T and B lymphoma cell lines: involvement of reactive oxygen species, Ca(2+) homeostasis, and cytokine gene expression. *Toxicol. In Vitro.* 2003; 17 (4): 385–395. doi: 10.1016/S0887-2333(03)00040-7
23. Baskey S.J., Lehoux E.A., Catelas I. Effects of cobalt and chromium ions on lymphocyte migration. *J. Orthop. Res.* 2017; 35 (4): 916–924. doi: 10.1002/jor.23336
24. Horiguchi H., Kayama F., Oguma E., Willmore W.G., Hradecky P., Bunn H.F. Cadmium and platinum suppression of erythropoietin production in cell culture: clinical implications. *Blood.* 2000; 96 (12): 3743–3747.
25. 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 кислотную резистентность эритроцитов в эксперименте. *Соврем. пробл. науки и образования.* 2018; 3: 28.
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. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education.* 2018; 3: 28. [In Russian].
26. Чумакова С.П., Уразова О.И., Зима А.П., Новицкий В.В. Особенности физиологии эритроцитов. Гемолиз и эриптоз. *Гематология и трансфузиология.* 2018; 63 (4): 343–351. doi: 10.25837/HAT.2019.51.80.003
Chumakova S.P., Urazova O.I., Zima A.P., Novitskiy V.V. Features of the physiology of erythrocytes. Hemolysis and eryptosis. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology.* 20182018; 63 (4): 343–351. [In Russian]. doi: 10.25837/HAT.2019.51.80.003

Сведения об авторах:

Клара Рашитовна Зиякаева, ORCID: 0000-0002-8413-5484, e-mail: klazia@yandex.ru
Алия Фаритовна Каюмова, д.м.н., проф., e-mail: annikachka@live.ru

Information about the authors:

Klara R. Ziyakaeva, ORCID: 0000-0002-8413-5484, e-mail: klazia@yandex.ru
Aliya F. Kayumova, doctor of medical sciences, professor, e-mail: annikachka@live.ru

Поступила в редакцию 09.06.2020
После доработки 09.10.2020
Принята к публикации 26.10.2020

Received 09.06.2020
Revision received 09.10.2020
Accepted 26.10.2020