

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.135.49>

ВЛИЯНИЕ СЕРПЕНТИНИТА НА КРОВЕТВОРНУЮ СИСТЕМУ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Научная статья

Будник А.Ф.^{1,*}, Борукаева И.Х.², Воронова О.В.³, Чудопал С.М.⁴, Бетуганова А.Л.⁵, Шортова А.А.⁶¹ ORCID : 0000-0002-3333-5865;² ORCID : 0000-0002-9351-315X;³ ORCID : 0000-0003-0542-6900;⁴ ORCID : 0009-0009-0546-4393;⁵ ORCID : 0000-0002-5228-870X;⁶ ORCID : 0009-0009-8539-0776;^{1, 2, 4, 5, 6} Кабардино-Балкарский государственный университет, Нальчик, Российская Федерация³ Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (budnik74[at]mail.ru)

Аннотация

Серпентинит активно применяют в сельском хозяйстве в качестве почвенного мелиоранта, что привело к необходимости изучения его влияния на живые организмы. Здоровым крысам линии *Wistar* в течение 60 дней добавляли в пищу молотый серпентинит Хабазского месторождения Кабардино-Балкарской республики. Во время исследования проведен многократный забор крови и изучение структурных изменений в органах кроветворной системы животных после выведения их из эксперимента. Результаты эксперимента показали: прием серпентинита привел к развитию мегалобластического типа кроветворения с преобладанием мегалобластов, гиперхромных эритроцитов, лейкоцитоза и лимфопении. В селезенке гипоплазия лимфоидных фолликулов, гемосидероз. Эти изменения, по нашему мнению, можно расценивать, как причину иммунодефицитного синдрома.

Ключевые слова: серпентинит, костный мозг, кроветворение, селезенка, иммунная система.

INFLUENCE OF SERPENTINITE ON THE HEMATOPOIETIC SYSTEM OF RATS IN THE EXPERIMENT

Research article

Budnik A.F.^{1,*}, Borukaeva I.K.², Voronova O.V.³, Chudopal S.M.⁴, Betuganova A.L.⁵, Shortova A.A.⁶¹ ORCID : 0000-0002-3333-5865;² ORCID : 0000-0002-9351-315X;³ ORCID : 0000-0003-0542-6900;⁴ ORCID : 0009-0009-0546-4393;⁵ ORCID : 0000-0002-5228-870X;⁶ ORCID : 0009-0009-8539-0776;^{1, 2, 4, 5, 6} Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Russian Federation³ Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

* Corresponding author (budnik74[at]mail.ru)

Abstract

Serpentine is actively used in agriculture as a soil ameliorant, which led to the necessity to study its effect on living organisms. Healthy Wistar rats were fed with ground serpentine from Khabaz deposit of the Kabardino-Balkar Republic for 60 days. During the research, multiple blood sampling and study of structural changes in organs of hematopoietic system of animals after taking them out of the experiment were carried out. The results of the experiment showed: serpentine administration led to the development of megaloblastic type of hematopoiesis with predominance of megaloblasts, hyperchromic erythrocytes, leukocytosis and lymphopenia. In the spleen, hypoplasia of lymphoid follicles, haemosiderosis are observed. These changes, in our opinion, can be regarded as the cause of immunodeficiency syndrome.

Keywords: serpentine, bone marrow, haematopoiesis, spleen, immune system.

Введение

Серпентинит (от лат. *serpens* – змея) – горная порода, основными компонентами которой является серпентин $Mg_6[Si_4O_{10}](OH)_8$, тальк $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$, пирротин FeS , энстатит $MgSiO_3$, магнетит Fe_3O_4 , гематит Fe_2O_3 . Также в состав серпентинита может входить множество различных минералов, в зависимости от месторождения серпентинита. В настоящее время появились работы по применению серпентинита в качестве почвенного мелиоранта на кислых почвах [1, С. 28]. Входящие в состав серпентинита соли кальция и магния позволяют предполагать быстрый переход этих элементов в почву с осуществлением выраженного мелиорирующего эффекта [2, С. 154]. Магний является необходимым компонентом для развития культурных растений, так как входит в состав хлорофилла и участвует в процессе фотосинтеза [3, С. 176], [6, С. 1111]. Кислая реакция почвенной среды является одной из главных причин низких урожаев сельскохозяйственных культур [4, С. 87]. Растения поглощают магний из почвенного раствора, который медленно пополняется почвенными запасами, оптимальная подача магния необходима для повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к различным стрессам, повышения урожайности и качественных показателей собранной продукции [7, С. 1219].

Однако из серпентиновых почв происходит выброс никеля и марганца, с последующим поступлением этих металлов в соседние среды, что имеет важное значение для оценки потенциальных последствий, связанных с изменением в землепользовании [8, С. 9]. Серпентиновые почвы, выделяют в окружающую среду повышенные концентрации токсичных тяжелых металлов. Следовательно, культурные растения, выращиваемые в такой почве или рядом с ней, могут накапливать токсичные тяжелые металлы в съедобных тканях [9, С. 126], [10, С. 1867].

Влияние серпентинита и на живые организмы не изучено.

Объекты и методы исследования

В работе использовались 20 подопытных здоровых лабораторных крыс линии Wistar идентичных по серии, массе и возрасту. 15 крыс получали молотый серпентинит из с. Хабаз Кабардино-Балкарской республики в дозе 200 мг на 1 кг веса и 5 крыс не получали серпентинит (контрольная группа). Содержание и использование крыс в эксперименте соответствовало правилам, принятым в ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова» и рекомендациям национального совета по исследованиям, национальным законам. Химический состав серпентинита: лизардит ($\text{H}_4\text{Mg}_3\text{O}_2\text{Si}_2$) – 86,9%, вюстит (FeO) – 8,0%, оксид кремния (SiO_2) – 2,6%, соли никеля 2,5%.

По ходу эксперимента у крыс производился забор крови с определением основных показателей. Забор крови производили под эфирным наркозом из хвостовой вены лабораторных животных. Кровь забирали в вакуумные пробирки и анализировали на автоматических анализаторах. Для общего анализа взятие крови осуществляли в одноразовые полипропиленовые пробирки с ЭДТА-К2 («Sarstedt», Германия).

Исследование количества эритроцитов ($10^{12}/\text{л}$) в периферической крови проводили с помощью проточной цитометрии, концентрацию гемоглобина (г/л) определяли натрий лаурилсульфат-гемоглобиновым методом на автоматическом гематологическом анализаторе «Sysmex XT 2000i» согласно инструкции производителя. При проведении исследования программа автоматического гематологического анализатора в каждой пробе рассчитывала НСТ (гематокрит, %) и эритроцитарные индексы (ЭИ): средний объем эритроцита (MCV, фл), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH, пг), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC, г/л). Количество тромбоцитов ($10^9/\text{л}$) в периферической крови определяли кондуктометрическим методом на автоматическом гематологическом анализаторе «Sysmex XT 2000i» («Sysmex Corporation», Япония). Исследование количества лейкоцитов ($10^9/\text{л}$) в периферической крови проводили с помощью проточной цитометрии в соответствии с инструкцией производителя, на автоматическом гематологическом анализаторе «Sysmex XT 2000i» («Sysmex Corporation», Япония). Автоматическую дифференцировку лейкоцитарной формулы осуществляли на автоматическом гематологическом анализаторе «Sysmex XT 2000i» («Sysmex Corporation», Япония) с помощью проточной цитофлуориметрии. При дифференцировке лейкоцитарной формулы определяли: абсолютное ($10^9/\text{л}$) и относительное количество нейтрофилов (%); абсолютное ($10^9/\text{л}$) и относительное количество лимфоцитов (%); абсолютное ($10^9/\text{л}$) и относительное количество моноцитов (%); количество эозинофилов абсолютное ($10^9/\text{л}$) и относительное (%); количество лимфоцитов абсолютное ($10^9/\text{л}$) и относительное (%); количество незрелых гранулоцитов абсолютное ($10^9/\text{л}$) и относительное (%).

После выведения животных из эксперимента проведена аутопсия по стандартной методике [11, С. 73-91].

Образцы ткани органов для световой микроскопии исследования фиксировали 10% забуференным нейтральным формалином и заключали в парафин по классической методике. На санном микротоме, из парафиновых блоков с образцами ткани, изготавливали серийные срезы толщиной 3-5 мкм и наносили их на предметные стекла. Полученные срезы образцов ткани окрашивали гематоксилином и эозином, по классическому протоколу. Микроскопию полученных гистологических препаратов осуществляли при 10, 20, 40-кратном увеличении с помощью светового микроскопа «LEICA DM4000 B».

При микроскопическом анализе костного мозга оценивалось: состояние всех ростков кроветворения: клеточность, полноценность клеточных элементов, «стромальный» компонент, наличие патологических изменений.

При микроскопическом анализе селезенки оценивалось состояние красной и белой пульпы, наличие патологических изменений.

Результаты исследования и их обсуждение

Через 2 месяца приема серпентинита было выявлено статистически значимое повышение гематокрита до $54,3 \pm 0,95\%$ ($p < 0,05$), содержания гемоглобина в крови до $215,5 \pm 11,5$ г/л ($p < 0,05$), среднего объема эритроцитов до $56,3 \pm 1,41$ фл. ($p < 0,05$), средней концентрации гемоглобина в эритроците до $39,6 \pm 1,41$ г/дл ($p < 0,05$), среднего содержания гемоглобина в эритроците до $22,3 \pm 1,02$ пг ($p < 0,05$). Отмечалось повышение содержания лейкоцитов в крови до $16,11 \pm 0,06$ тыс/мкл ($p < 0,05$) за счет возрастания содержания нейтрофилов до $77,7 \pm 2,62\%$ ($p < 0,05$); содержание лимфоцитов в крови было снижено до $23,3 \pm 1,03\%$ ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1 - Гематологические показатели крови у крыс-самцов линии Wistar, Клинический анализ крови

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.135.49.1>

Показатели	Контрольная группа	Основная группа	P
Гематокрит, %	$38,5 \pm 1,06$	$52,3 \pm 2,95$	$p < 0,001$
Гемоглобин, г/л	$145,6 \pm 6,37$	$215,5 \pm 11,5$	$p < 0,001$
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	$8,5 \pm 0,23$	$9,65 \pm 0,32$	$p < 0,02$
MCV (ср. объем эритр.), фл.	$48,4 \pm 1,22$	$56,3 \pm 1,41$	$p < 0,001$

МСН (ср. содержание Нб в эритроц.), пг	16,5±1,02	22,3±1,13	p<0,002
МСНС (ср. конц. Нб в эритроц.), г/дл	35,3±1,21	39,6±1,41	p<0,001
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	450,8±13,8	409,5±12,6	p<0,02
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,7±0,16	16,11±0,26	p<0,05
Базофилы, %	0,18±0,02	0,12±0,01	p>0,05
Эозинофилы, %	3,95±0,01	0,09±0,01	p>0,05
Нейтрофилы (общее число), %	65,7±1,06	77,7±2,62	p<0,001
Палочкоядерные, %	2,6±0,04	2,5±0,01	p>0,05
Лимфоциты, %	40,8±2,37	23,3±1,03	p<0,001
Моноциты, %	3,7±0,06	0,01±0,001	p>0,05
Базофилы, абс. тыс/мкл	0,01±0,001	0,01±0,001	p>0,05
Эозинофилы, абс. тыс/мкл	0,01±0,001	0,01±0,001	p>0,05
Нейтрофилы (общее число), абс. тыс/мкл	5,71±0,12	12,4±0,35	p<0,001
Лимфоциты, абс. тыс/мкл	3,55±0,03	1,41±0,02	p<0,001
Моноциты, абс. тыс/мкл	1,72±0,06	0,16±0,01	p<0,001

Выявленные изменения свидетельствовали о том, что у крыс развился мегалобластический тип кроветворения с преобладанием мегалоцитов, гиперхромных эритроцитов. По-видимому, это было связано с сохранившимся оксидом железа в серпентините, что привело к стимуляции эритропоэза, повышению синтеза гемоглобина. Также никель обладает стимулирующим действием на кроветворение за счет стимуляции экспрессии гена эритропоэтина, повышения синтеза нуклеиновых кислот, РНК, ДНК и белков.

При морфологическом исследовании костного мозга у животных, получавших серпентинит, были выявлены следующие изменения: гиперклеточность за счет гиперплазии всех ростков кроветворения, но преимущественно за счет эритроидного ростка миелоидной ткани (рис. 1) по типу мегалобластного эритропоэза.

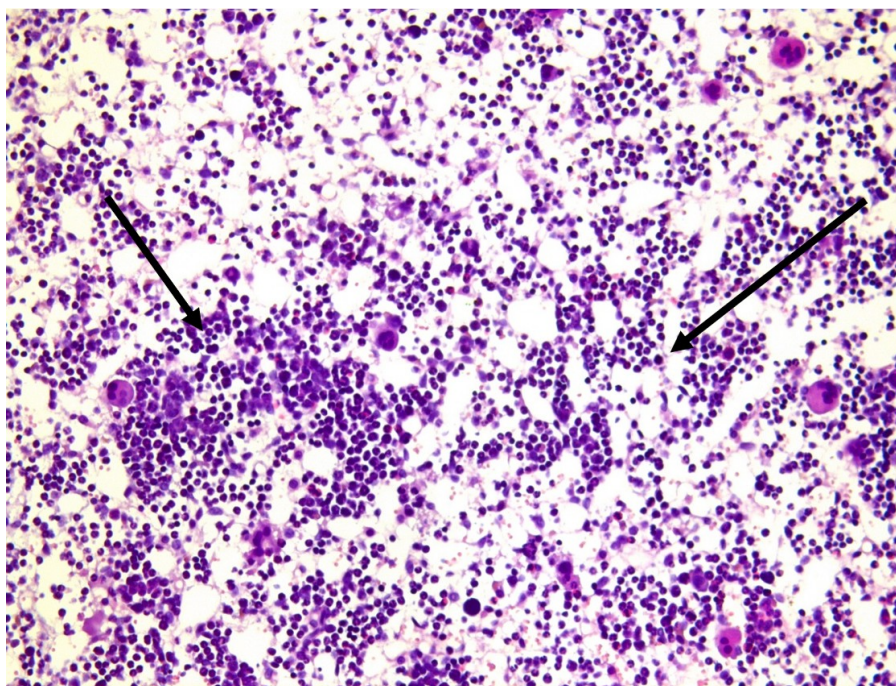


Рисунок 1 - Костный мозг крысы линии Wistar: реактивная гиперплазия ростков кроветворения, окраска гематоксилином и эозином, x100

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.135.49.2>

В гистологических препаратах костного мозга регистрировались мегалобласты, группы мегакариоцитов (многоядерные и мультилобулярные клетки), расположенные в рыхлой строме (рис. 2), периваскулярные инфильтраты из миелоидных клеток, «отечность» стромального компонента (рис. 3).

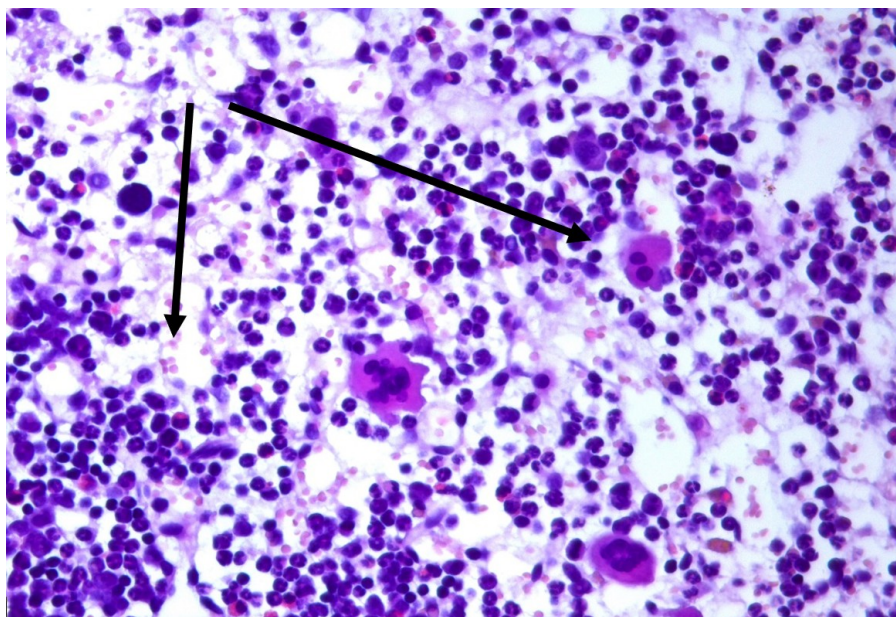


Рисунок 2 - Костный мозг крысы: реактивная гиперплазия ростков кроветворения, мегалобласты и мегакариоциты, окраска гематоксилином и эозином, x400
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.135.49.3>

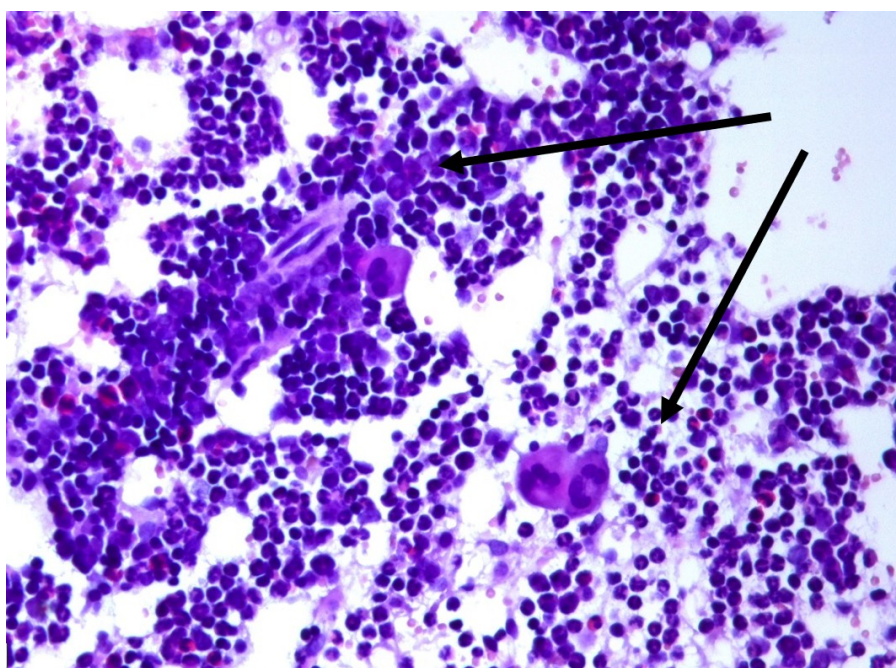


Рисунок 3 - Костный мозг крысы линии Wistar: реактивная гиперплазия ростков кроветворения, периваскулярные инфильтраты из миелоидных клеток, окраска гематоксилином и эозином, x400
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.135.49.4>

При морфологическом исследовании селезенки у животных, получавших серпентинит, были выявлены следующие изменения: множественные очаги экстрамедуллярного кроветворения, также по типу мегалобластного эритропоэза (рис. 4). Кроме того, выявлены скопления мегакариоцитов, расположенные в красной пульпе одиночно и группами, периваскулярные инфильтраты из миелоидных клеток различной степени зрелости (рис. 5), гипоплазия лимфоидных фолликулов вплоть до их редукции (рис. 6). В строме регистрировалось «оголение» ее каркаса, разрастание соединительной ткани в фолликулах, неравномерное полнокровие сосудистого русла, ригидность стенок синусов.

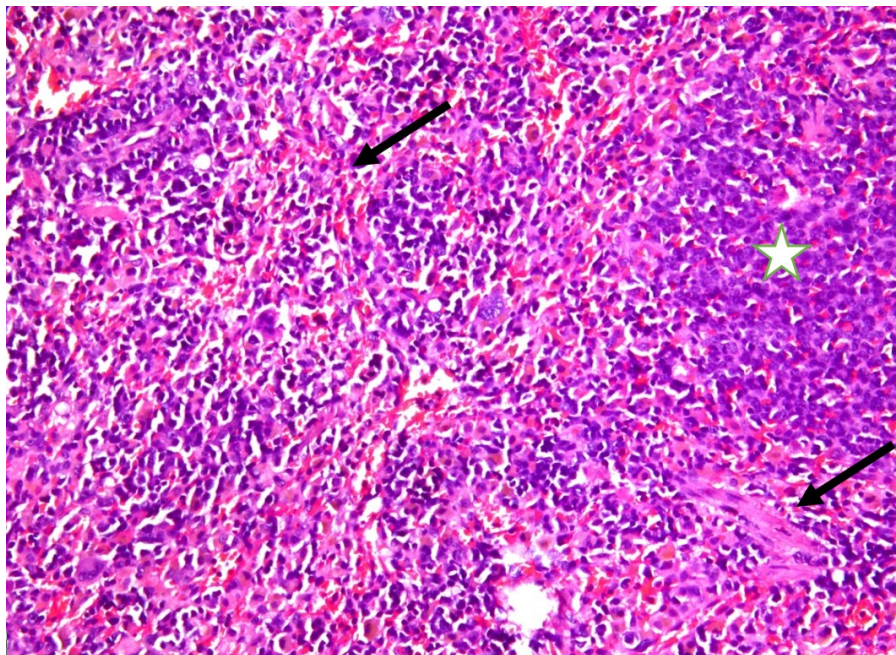


Рисунок 4 - Селезенка крысы: фокусы экстрамедуллярного кроветворения (звёздочка), фиброз стромы (стрелки), окраска гематоксилином и эозином, 200
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.135.49.5>

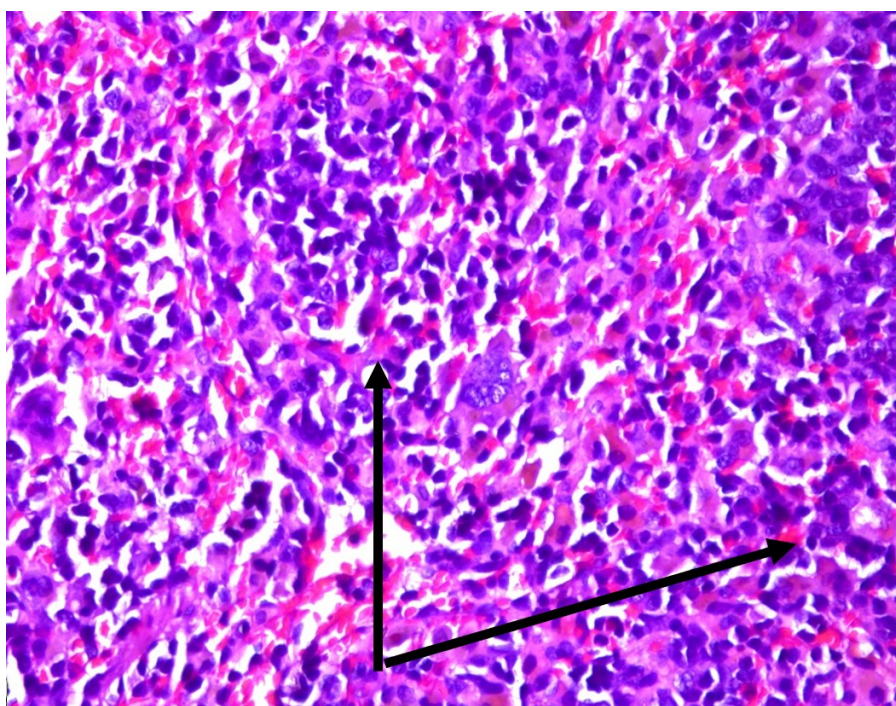


Рисунок 5 - Селезенка крысы линии Wistar: фокусы экстрамедуллярного кроветворения, пролиферация мегакариоцитарного ростка, окраска гематоксилином и эозином, x400
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.135.49.6>

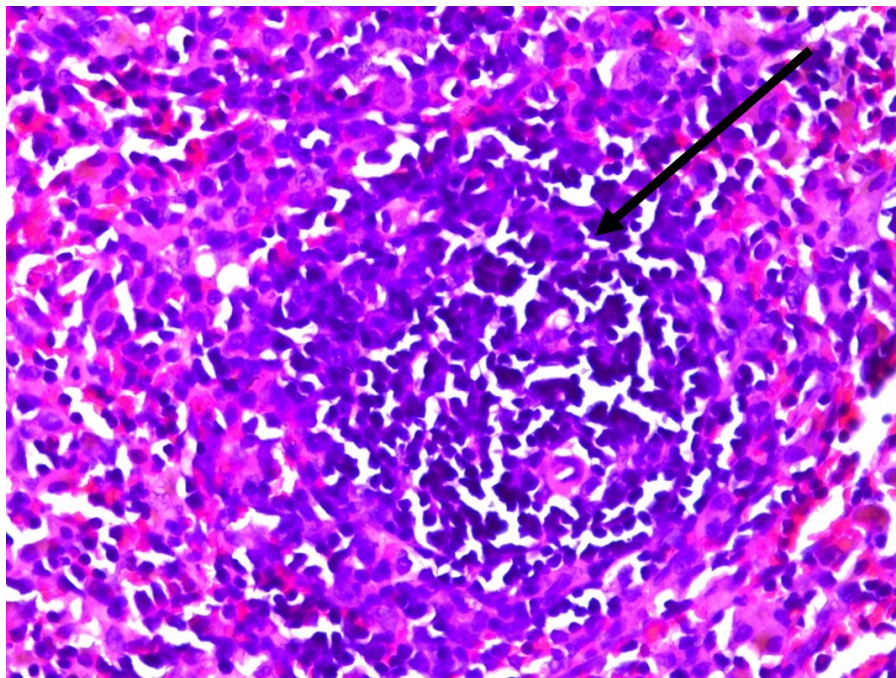


Рисунок 6 - Селезенка крысы линии Wistar: редукция лимфоидных фолликулов, окраска гематоксилином и эозином, x400

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.135.49.7>

Лабораторные исследования крови и морфологическое исследование органов кроветворной системы у крыс контрольной группы не выявили существенных отклонений от нормы.

Заключение

Введение серпентинита крысам линии *Wistar* на протяжении двух месяцев вызвало выраженную гиперплазию всех ростков кроветворения в костном мозге, дистрофические изменения в селезенке с редукцией лимфоидного аппарата белой пульпы, и появлением очагов экстрамедуллярного кроветворения в красной пульпе. Морфологические изменения в костном мозге и селезенке подтверждались клинико-лабораторными изменениями в крови исследуемых животных и отсутствовали у крыс контрольной группы.

На основании проведенных исследований можно заключить, что применение неочищенного от солей никеля и железа серпентинита привело к повреждающему действию на кроветворную систему крыс. Исследования необходимо продолжить в целях выбора безопасного для живых объектов использования удобрений на основе серпентинита в сельском хозяйстве.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Власенко В.П. Состав и свойства горной породы серпентинит и возможности использования ее в качестве мелиоранта почв / В.П. Власенко, А.В. Осипов, В.В. Костенко // Агрохимический вестник. — 2019. — № 4. — С. 28-31.
2. Мельникова Л.Ф. Органоминеральные удобрения. Теория и практика их получения и применения / Л.Ф. Мельникова. — СПб.: ГПУ, 2007. — 306 с.
3. Небольсин А.Н. Теоретические основы известкования почв / А.Н. Небольсин, З.П. Небольсина. — СПб.: ГНУ ЛНИИСХ Россельхозакадемии, 2009. — 347 с.
4. Шильников И.А. Некоторые аспекты проблем известкования кислых почв в современных условиях / И.А. Шильников, Г.Е. Гришин, Н.И. Аканова [и др.] // Нива Поволжья. — 2011. — № 1. — С. 87-92.
5. Байбеков Р.Ф. Методические рекомендации по применению минерального удобрения Серпомаг производства ЗАО «Литосфера» в качестве химического мелиоранта и магниевого удобрения в сельскохозяйственном производстве Российской Федерации / Р.Ф. Байбеков, И.А. Шильников, Н.И. Аканова [и др.]. — Москва, 2014. — 40 с.
6. Skinner H.C.W. The Web of Magnesium / H.C.W. Skinner // International Geology Review. — 2005. — Vol. 47. — Iss. 11. — P. 1111-1119. — DOI: 10.2747/0020-6814.47.11.1111.

7. Senbayram M. Role of Magnesium Fertilisers in Agriculture: Plant-Soil Continuum / M. Senbayram, A. Gransee, V. Wahle [et al.] // *Crop & Pasture Science*. — 2015. — Vol. 66. — P. 1219-1229. — DOI: doi.org/10.1071/CP15104.
8. Rajapaksha A.U. Nickel and Manganese Release in Serpentine Soil from the Ussangoda Ultramafic Complex, Sri Lanka / A.U. Rajapaksha, M. Vithanage, C. Oze [et al.] // *Geoderma*. — 2012. — Vol. 189. — P. 1-9. — DOI: doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.04.019.
9. Herath I. Immobilization and Phytotoxicity Reduction of Heavy Metals in Serpentine Soil Using Biochar / I. Herath, P. Kumarathilaka, A. Navaratne [et al.] // *Journal of Soils and Sediments*. — 2014. — Vol. 15. — Iss. 1. — P. 126-138. — DOI: 10.1007/s11368-014-0967-4.
10. Fernández S. Plant Heavy Metal Concentrations and Soil Biological Properties in Agricultural Serpentine Soils / S. Fernández, S. Seoane, A. Merino // *Soil Science and Plant Analysis*. — 1999. — Vol. 30. — Iss. 13-14. — P. 1867-1884. — DOI: 10.1080/00103629909370338.
11. Коптяева К.Е. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы) / К.Е. Коптяева, А.А. Мужикян, Я.А. Гуцин [и др.] // *Лабораторные животные для научных исследований*. — 2018. — С. 71-92. — DOI: 10.29926/2618723X-2018-02-08.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Vlasenko V.P. Sostav i svojstva gornoj porody serpentinit i vozmozhnosti ispol'zovaniya ee v kachestve melioranta pochv [Composition and Properties of Serpentine Rock and Possibilities of its Use as a Soil Ameliorant] / V.P. Vlasenko, A.V. Osipov, V.V. Kostenko // *Agrohimicheskij vestnik [Agrochemical Bulletin]*. — 2019. — № 4. — P. 28-31. [in Russian]
2. Mel'nikova L.F. Organomineral'nye udobreniya. Teoriya i praktika ih poluchenija i primeneniya [Organomineral Fertilizers. Theory and Practice of Their Production and Application] / L.F. Mel'nikova. — SPb.: SPU, 2007. — 306 p. [in Russian]
3. Nebol'sin A.N. Teoreticheskie osnovy izvestkovaniya pochv [Theoretical Basis of Soil Liming] / A.N. Nebol'sin, Z.P. Nebol'sina. — SPb.: State National Research Institute of Agricultural Research of the Russian Academy of Agricultural Sciences, 2009. — 347 p. [in Russian]
4. Shil'nikov I.A. Nekotorye aspekty problem izvestkovaniya kislých pochv v sovremennykh usloviyakh [Some Aspects of Acidic Soil Liming Problems in Modern Conditions] / I.A. Shil'nikov, G.E. Grishin, N.I. Akanova [et al.] // *Niva Povolzh'ja [Niva of Volga region]*. — 2011. — № 1. — P. 87-92. [in Russian]
5. Bajbekov R.F. Metodicheskie rekomendacii po primeneniju mineral'nogo udobreniya Serpomag proizvodstva ZAO «Litosfera» v kachestve himicheskogo melioranta i magnievogo udobreniya v sel'skohozjajstvennom proizvodstve Rossijskoj Federacii [Methodological recommendations on the use of mineral fertilizer Serpomag produced by CJSC "Litosphere" as a chemical ameliorant and magnesium fertilizer in agricultural production in the Russian Federation] / R.F. Bajbekov, I.A. Shil'nikov, N.I. Akanova [et al.]. — Moscow, 2014. — 40 p. [in Russian]
6. Skinner H.C.W. The Web of Magnesium / H.C.W. Skinner // *International Geology Review*. — 2005. — Vol. 47. — Iss. 11. — P. 1111-1119. — DOI: 10.2747/0020-6814.47.11.1111.
7. Senbayram M. Role of Magnesium Fertilisers in Agriculture: Plant-Soil Continuum / M. Senbayram, A. Gransee, V. Wahle [et al.] // *Crop & Pasture Science*. — 2015. — Vol. 66. — P. 1219-1229. — DOI: doi.org/10.1071/CP15104.
8. Rajapaksha A.U. Nickel and Manganese Release in Serpentine Soil from the Ussangoda Ultramafic Complex, Sri Lanka / A.U. Rajapaksha, M. Vithanage, C. Oze [et al.] // *Geoderma*. — 2012. — Vol. 189. — P. 1-9. — DOI: doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.04.019.
9. Herath I. Immobilization and Phytotoxicity Reduction of Heavy Metals in Serpentine Soil Using Biochar / I. Herath, P. Kumarathilaka, A. Navaratne [et al.] // *Journal of Soils and Sediments*. — 2014. — Vol. 15. — Iss. 1. — P. 126-138. — DOI: 10.1007/s11368-014-0967-4.
10. Fernández S. Plant Heavy Metal Concentrations and Soil Biological Properties in Agricultural Serpentine Soils / S. Fernández, S. Seoane, A. Merino // *Soil Science and Plant Analysis*. — 1999. — Vol. 30. — Iss. 13-14. — P. 1867-1884. — DOI: 10.1080/00103629909370338.
11. Коптяева К.Е. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы) [Methods of autopsy and extraction of organs from laboratory animals (rats)] / К.Е. Коптяева, А.А. Мужикян, Я.А. Гушин [et al.] // *Лабораторные животные для научных исследований*. — 2018. — С. 71-92. — DOI: 10.29926/2618723X-2018-02-08. [in Russian]