

Реакция крови и репродуктивной системы самцов крыс на экспозицию в электромагнитном поле промышленной частоты и диету с нитратом натрия

Елена Шубенок, Наталья Чушова, Маргарита Бакшаева, Александр Козлов,
Роман Новиков, Григорий Горох

ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»

Изучали состояние крови и репродуктивной системы самцов крыс в первые сутки после прекращения 28-дневных воздействий магнитного поля промышленной частоты (50 Гц, 0,4 мТл, 4 часа/день, 5 дней/неделю, суммарно 28 дней), рациона питания с NaNO_3 (6,75 мг/кг массы тела в день, суммарно 28 дней) и их сочетанного воздействия. У животных под воздействием МП ПЧ отмечена тенденция к снижению числа лейкоцитов в крови. Рацион с нитратом натрия приводил к более выраженной лейкопении. В сыворотке крови животных, при сочетании рациона с нитратом и воздействия МП ПЧ, зафиксировано повышение содержания NO_3^- . Влияние экспериментальных факторов и их сочетания вызывало дисбаланс в распределении сперматогенных клеток различных популяций и проявлялось в снижении активности процесса сперматогенеза в группах применения ксенобиотика и его сочетания с действием МП ПЧ. Отмечена тенденция к снижению количества и статистически значимое снижение жизнеспособности эпидидимальных сперматозоидов во всех экспериментальных группах.

Крысы, нитраты, электромагнитное поле промышленной частоты, репродуктивная система самцов, кровь

Введение

Повышение электромагнитного фона в окружающей среде, начавшееся со времен научно-технической революции, в настоящее время происходит в нарастающем темпе. Это не может не сказываться на функционировании важнейших систем жизнеобеспечения организмов, эволюционно сформированных в условиях более низких интенсивностей электромагнитных полей. Кроме того, в последние десятилетия в окружающую среду привносится значительное количество ксенобиотиков. В частности, нитраты широко применяются как в сельском хозяйстве, так и в качестве консервантов в пищевой промышленности. Каждый из указанных факторов подвергается нормированию и контролю, тем не менее, фиксируются факты превышения допустимых концентраций нитратов в питьевой воде, продуктах питания и, кроме того, ни один из факторов не действует на организм изолированно, а при их сочетании предел допустимых значений может иметь необходимость корректировки, так как сочетание нескольких факторов может значительно изменять характер воздействия друг друга, что невозможно оценить на основе однофакторных экспериментов.

Объект исследований – кровь и репродуктивная система крыс-самцов подвергшихся воздействию магнитного поля промышленной частоты (МП ПЧ) и рациона питания с нитратом натрия.

Целью исследования было изучение в крови и репродуктивной системе крыс-самцов эффектов воздействия магнитного поля промышленной частоты и рациона питания с NaNO_3 , изолированно и сочетано.

Методы

Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар (исходный возраст 3 мес, масса $246,7 \pm 1,7$ г.), находившихся на стандартном пищевом рационе вивария и имевших свободный доступ к питьевой воде. Контролем служили животные аналогичного возраста и пола, содержащиеся в таких же условиях, как и

экспериментальные животные, но без воздействия экспериментальных факторов.

Все животные были разделены на 4 группы: 1. Контроль; 2. Животные, облученные в МП ПЧ (50 Гц, 0,4 миллитесла (мТл), 4 ч/день, исключая выходные, общее количество дней облучения - 28) – 50 Гц; 3. Животные, получавшие NaNO_3 (в дозе 6,75 мг/кг, исключая выходные, общее количество дней диеты – 28) – NaNO_3 ; 4. Животные, подвергнутые влиянию излучения МП ПЧ и одновременно принимавшие ксенобиотик – 50 Гц + NaNO_3 , как описано ранее.

Источником МП ПЧ являлась установка (соленоид), состоящая из двух рядом расположенных одинаковых радиальных катушек (катушки Гельмгольца). Катушки были соединены последовательно таким образом, что протекающий ток имел одинаковое направление в каждой из них. Расстояние между центрами катушек было примерно равно их радиусу, что позволяло обеспечить наибольшую однородность магнитного потока в рабочей зоне установки. Рабочая зона с магнитным полем, воздействующим на клетку с животными, формировалась между центрами катушек (примерно $50 \times 50 \times 50$ см). Регулировка величины магнитной индукции (плотности магнитного потока) в диапазоне от 0 до 0,5 мТл обеспечивалась изменением напряжения на выходе автотрансформатора ЛАТР-2,5 кВт в диапазоне 0-40 В. В эксперименте магнитная индукция составляла 0,4 мТл.

Эксперимент проводили в первые сутки после окончания воздействий. Перед попытками оценивали массу животных, после декапитации производили забор крови, в которой определяли количество лейкоцитов и лейкоцитарных элементов крови (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) на гемоанализаторе Celltac MEK-63-18 J/K (Япония), в сыворотке крови определяли концентрацию нитратов и нитритов спектрофотометрическим методом (Метельская и др., 2005), извлекали семенники с придатками, семенные пузырьки и оценивали их массы. В клеточной суспензии, полученной из тестикулярной ткани, проводили количественный

анализ различных типов сперматогенных клеток методом ДНК-проточной цитометрии (цитофлуориметр Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США), как описано ранее (Верещако и др., 2017). Из эпидидимиса выделяли зрелые половые клетки, число которых подсчитывали в камере Горяева, определяли их жизнеспособность с помощью окрашивания эозин-нигрозином (World, 2010). Определение содержания кортикостерона в сыворотке крови крыс-самцов осуществлялась посредством высокоэффективного жидкостного хроматографа фирмы Agilent серии 1100 с диодно-матричным детектором.

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами биологической статистики, используя пакеты программ Microsoft Excel и GraphPad Prism 5. При сравнении двух независимых групп по количественному признаку использовали критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

У крыс-самцов, содержащихся на рационе с нитратом натрия, а также подвергшихся сочетанному воздействию двух факторов, отмечена лейкопения, формируемая за счет снижения концентраций лимфоцитов и гранулоцитов (табл. 1).

Таблица 1. Показатели крови крыс-самцов после длительной экспозиции в МП ПЧ, приема ксенобиотика и их комбинированного воздействия

Table 1. Indices of blood of male rats after prolonged exposure in MF of IF, reception of xenobiotic and their combined action

Группы животных	Лейкоциты	Лимфоциты	Моноциты	Гранулоциты
	N*10 ⁹ /л			
Контроль	9,4±0,5	7,0±0,6	1,3±0,1	2,4±0,2
50 Гц	8,6±0,6	6,6±0,7	1,4±0,1	2,0±0,3
NaNO ₃	8,0±0,3*	6,1±0,3*	1,2±0,1	1,6±0,2*
50Гц+NaNO ₃	8,2±0,4*	6,4±0,5	1,3±0,1	1,9±0,2*

Примечание: * – достоверно к контролю при $p < 0,05$
Note: * - authentically to the control at $p < 0,05$

В сыворотке крови животных, для которых сочетали рацион с нитратом и воздействие МП ПЧ, отмечено повышение содержания NO₃⁻, не носящее достоверного характера (табл. 2). Концентрация нитритов в сыворотке крови экспериментальных животных не отличалась от контроля.

Воздействие МП ПЧ на симпатоадреналовую систему, приводило к возрастанию уровня кортикостерона в сыворотке крови крыс группы 50 Гц. У животных, в рацион питания которых входил NaNO₃, содержание кортикостерона снижалось, по отношению к контрольной группе (табл. 2). Однако статистически значимых отличий между группами не установлено.

Таблица 2. Концентрации кортикостерона, нитрата и нитрита в сыворотке крови крыс-самцов после длительной экспозиции в МП ПЧ, приема ксенобиотика и их комбинированного воздействия
Table 2. Concentrations of corticosterone, nitrate and nitrite in blood serum of male rats after prolonged exposure in MF of IF, reception of xenobiotic and their combined action

Группы животных	Кортикостерон, нг/мл	Нитрат, мкМ	Нитрит, мкМ
Контроль	7,7±2,4	9,2±0,6	2,8±0,2
50 Гц	9,3±2,1	11,6±1,0	2,5±0,4
NaNO ₃	5,5±1,1	10,7±0,6	3,1±0,1
50Гц+NaNO ₃	7,8±2,0	15,6±2,8	2,6±0,4

Оценивая массовые показатели органов репродуктивной системы крыс-самцов при длительном влиянии МП ПЧ и введении в рацион питания NaNO₃, необходимо отметить умеренные изменения масс семенников, эпидидимисов и семенных пузырьков (табл. 3). Так, влияние МП ПЧ приводит к статистически значимому снижению массы эпидидимисов на 7,0%, а введение ксенобиотика - массы семенников на 6,3%, по отношению к контролю. Следует отметить, что сочетанное влияние исследуемых факторов на массовые показатели вызывает изменения аналогичные действию каждого фактора в отдельности.

Таблица 3. Массы органов репродуктивной системы крыс-самцов после длительной экспозиции в МП ПЧ, приема ксенобиотика и их комбинированного воздействия

Table 3. Masses of reproductive system organs of male rats after prolonged exposure in MF of IF, reception of xenobiotic and their combined action

Группы животных	Органы репродуктивной системы		
	Семенники, г	Эпидидимисы, г	Семенные пузырьки, г
Контроль	1,72±0,02	0,56±0,01	1,18±0,07
50 Гц	1,64±0,05	0,52±0,02*	1,17±0,06
NaNO ₃	1,62±0,03*	0,54±0,01	1,23±0,07
50 Гц+NaNO ₃	1,63±0,03*	0,54±0,01	1,24±0,07

Примечание: обозначения такие же как в таблице 1.
Note: The notations is the same as in Table 1.

Количественный анализ сперматогенных клеток на различных стадиях дифференцировки показал значительные нарушения процесса сперматогенеза, вызванные как влиянием облучения, так и применением диеты с ксенобиотиком (рис. 1). Отмечено статистически значимое снижение количества сперматоцитов в прелептотене (S-phaa) на 27,4%; в группе 50 Гц, повышение числа сперматогоний и сперматоцит I-го порядка на 25,9 и на 11,4% - в группе NaNO₃.

Комбинированное влияние МП ПЧ и введения в рацион питания NaNO₃ вызвало сходные изменения процесса сперматогенеза с выявленными в группе применения только ксенобиотика.

Отношение клеток постмейотической стадии к клеткам премейотическим, отражающее полный переход от сперматогоний (2C) к круглым сперматидам (1C) (Suresh, 1992), указывает на

снижение скорости процесса сперматогенеза в группах животных, получавших NaNO_3 (на 19,9%) и его сочетания с облучением (на 24,5%, $p < 0,05$).

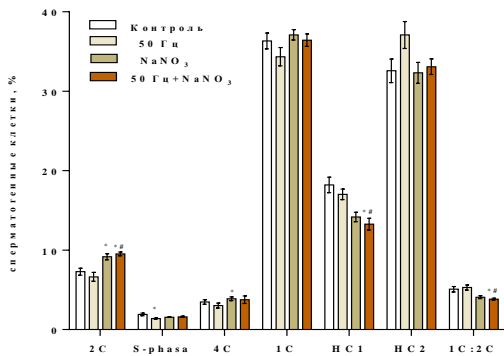


Рис. 1. Изменение количества сперматогенных клеток тестикулярной ткани крыс-самцов после длительной экспозиции в МП ПЧ, приема ксенобиотика и их комбинированного воздействия. Примечания: 2C – сперматогонии; S-phase – сперматоциты в прелептотене; 4C – сперматоциты I порядка, 1C – круглые сперматиды, HC1 и HC2 – удлиненные и продолговатые сперматиды * – достоверно к контролю, # – к группе 50 Гц, ^ – к группе NaNO_3 при $p < 0,05$

Fig. 1. Change in the number of spermatogenic cells of the testicular tissue of male rats after prolonged exposure in MF of IF, reception of xenobiotic and their combined action
Notes: 2C - spermatogonia; S-phase - spermatocytes in preleptotene; 4C - primary spermatocytes; 1C - round spermatids; HC1 and HC2 - elongating and elongated spermatids; * - authentically to the control, # - to the 50 Hz group, ^ - to the NaNO_3 group at $p < 0,05$

Все воздействия (МП ПЧ, нитрат натрия и их сочетанное действие) вызвали снижение количества эпидидимальных сперматозоидов до 94,6%, 95,3%, 88,5% от значений контроля, соответственно, и изменения не имели достоверного характера (рис. 2А).

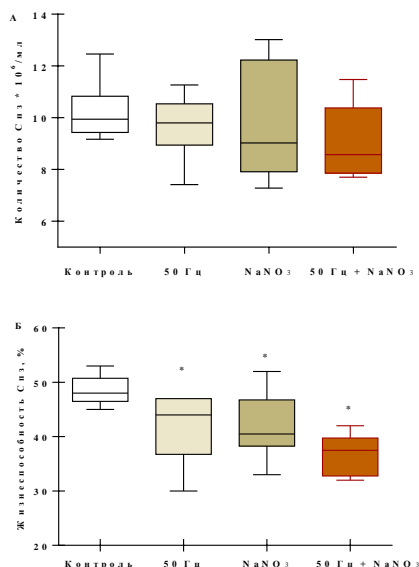


Рис. 2. Количество (А) и жизнеспособность (Б) эпидидимальных сперматозоидов (Спз) у крыс-самцов после длительной экспозиции в МП ПЧ, приема ксенобиотика и их комбинированного воздействия. Примечание: * – достоверно к контролю при $p < 0,05$

Fig. 2. The number (A) and the viability (B) of epididymal spermatozoa (Spz) in male rats after prolonged exposure in MF of IF, reception of xenobiotic and their combined action
Note: * - authentically to the control at $p < 0,05$

Также установлено достоверное снижение жизнеспособности зрелых половых клеток у животных во всех экспериментальных группах (рис. 2Б).

Обсуждение

С развитием технологий человеческая жизнь становится легче, в плане физических нагрузок, но каждый новый технологический продукт часто связан с появлением факторов ранее отсутствовавших в окружающей среде. Современная экологическая обстановка характеризуется наличием выраженного антропогенного загрязнения окружающей среды, существенный вклад в которое вносят повышение электромагнитного фона за счет растущего числа средств коммуникаций, а также химические агенты, которые имеют широкое применение как в сельском хозяйстве так и в пищевой промышленности. В реальной обстановке, благодаря разнообразию антропогенных факторов в окружающей среде, их действие носит, как правило, не изолированный, а сложный комбинированный характер. В связи с этим значительный интерес представляет анализ не только действия отдельно взятого фактора, в нашем исследовании влияние МП ПЧ или NaNO_3 , а и последствия их совместного воздействия на важнейшие жизнеобеспечивающие системы организма.

В исследовании концентрации нитратов и нитритов в сыворотке животных экспериментальных групп оставались на уровне контроля, что свидетельствует об отсутствии каскада реакций восстановления нитратов до нитритов и последующего синтеза монооксида азота, характерных для цикла азота, а это позволяет предполагать детоксикацию организма от экзогенных нитратов за счет выведения с мочой, что согласуется с данными (Бабиенко, 2013). Тенденция повышения содержания NO_3^- в сыворотке крови животных при сочетании рациона с нитратом и воздействия МП ПЧ, возможно, обусловлена негативным влиянием сочетания указанных факторов на системную продукцию монооксида азота.

В последние несколько десятилетий снижение качества и концентрации спермы носит эпидемиологический характер. Ежегодно показатель численности сперматозоидов снижается на 1,5 млн/мл в США и других западных странах на 3 млн/мл в Европе. Огромную роль в этом играет образ жизни, ксенобиотика в продуктах питания, растущий электромагнитный фон и другие причины (Brody, 2014).

При анализе полученных нами данных о действии на репродуктивную систему самцов МП ПЧ, введения в рацион питания NaNO_3 и их сочетанного воздействия выявлены снижение массы семенников и эпидидимисов, нарушения в функционировании сперматогенного эпителия, что в результате проявилось в снижении продукции и жизнеспособности эпидидимальных сперматозоидов.

В исследовании (Bahaodini et al., 2015) было показано, что продолжительная и длительная экспозиция в МП ПЧ вызывала снижение диаметра извитых семенных канальцев, повышение их

количества на единицу площади семенников, снижение подвижности сперматозоидов и уровня тестостерона в крови, редукцию семенных канальцев, увеличение количества клеток Лейдига и дефектных форм эпидидимальных сперматозоидов, но не влияла на их количество и жизнеспособность.

По литературным данным, хроническая интоксикация нитратом натрия приводит к формированию комплекса морфологических нарушений в семенниках в виде дистрофических изменений и аплазии сперматогенного эпителия, особенно на конечных этапах его развития, снижению индекса сперматогенеза, расстройству в сосудах микроциркуляторного русла, а также производит повреждающее влияние на сперму лабораторных животных, которое отражается в снижении абсолютного количества сперматозоидов, их жизнеспособности и подвижности (Doshi et al., 2012; Шаталин и др., 2014). Одним из возможных механизмов указанного патогенного действия нитратов может быть инициация ПОЛ и избыточное образование АФК (Ibrahim et al., 2014).

Полученные нами данные только от части согласуются с литературными, вероятно это связано с различиями в интенсивности воздействий в нашем исследовании и исследованиях других авторов. Тем не менее, полученные результаты однозначно свидетельствуют о возможных негативных воздействиях техногенных факторов на организм животных.

Выводы

1. У животных подвергшихся воздействию нитрата натрия и его воздействию в сочетании с экспозицией в МП ПЧ в крови выявлено снижение количества лейкоцитов, за счет лимфоцитов и гранулоцитов, что и во втором случае, вероятнее всего, обусловлено действием нитрата.

2. Облучение в МП ПЧ, введение в рацион питания NaNO_3 и их сочетанное воздействие вызывают незначительное снижение массы семенников и эпидидимисов, но приводят к нарушению нормального функционирования сперматогенного эпителия, что выражается в преимущественном повышении количества клеток начальных этапов

дифференцировки (сперматогоний, тетраплоидных сперматоцит) и в значительном снижении числа удлинённых и продолговатых сперматид, завершающих стадий трансформации.

3. Количество и жизнеспособность эпидидимальных сперматозоидов значительно снижается при действии исследуемых антропогенных факторов, достигая наиболее выраженных изменений при сочетанном воздействии МП ПЧ и NaNO_3 .

4. Выявленные изменения свидетельствуют о значимых эффектах длительного влияния МП ПЧ и поступления в организм NaNO_3 в крови и мужской репродуктивной системе, что, вероятно, негативно отразится на адаптационных возможностях на уровне организма и популяции.

Литература

1. ВАНАОДИНІ, А., ОВЇФАРД, М., ТАМАДОН, А. et al. Low frequency electromagnetic fields long-term exposure effects on testicular histology, sperm quality and testosterone levels of male rats. *Asian Pacific J. Reproduction*, 2015, Vol. 4, № 3, p. 195–200.
2. BRODY, SA. Мужское бесплодие и окислительный стресс: роль диеты, образа жизни и пищевых добавок. *Андрология и генитальная хирургия*, 2014, № 3, с. 33–41.
3. DOSHI, SB., KHULLAR K., SHARMA RK. et. al. Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2012, Vol. 10, p. 109–120.
4. IBRAHIM, M., ABDELRAHMAN, G., SALEM, A. et al. Effects of 50 Hz magnetic field on the testes and sperm of adult albino rats. *The Open Conference Proceeding J*, 2014, Vol. 5, p. 8–18.
5. *World Health Organization*. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed. WHO Press. Geneva. Switzerland, 2010, p. 26–28.
6. БАБИЕНКО, ВВ. Особенности функционирования цикла оксида азота в условиях длительного поступления субтоксических доз нитратов: экспериментальное исследование. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*, 2013, №2, с. 91–93.
7. ВЕРЕЩАКО, ГГ., ЧУЕШОВА, НВ., ШАЛАТОНИН, ВИ. и др. Чувствительность репродуктивной системы крыс-самцов к изолированному и сочетанному действию внешнего облучения (1,0 Гр) и магнитного поля промышленной частоты (50 Гц). *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*, 2017, № 3, с. 46–53.
8. МЕТЕЛЬСКАЯ, ВА., ГУМАНОВА, НГ. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клиническая лабораторная диагностика*, 2005, № 6, с. 15–18.
9. ШАТАЛИН, БО., КОСТЕНКО, ВА. Состояние окислительного метаболизма семенников на фоне действия нитратной интоксикации и рентгеновского облучения. *Актуальные проблемы транспортной медицины*, 2014, № 3 (37), с. 56–61.

Alena Shubianok, Natalya Chueshova, Marharyta Bakshayeva, Aliaksandr Kazlou, Roman Novikov, Grigoriy Gorokh

Reaction of blood and reproductive system of male rats to exposure in the electromagnetic field of industrial frequency and diet with sodium nitrate

Summary

The state of the blood and reproductive system of male rats was studied on the first day after the 28-day exposure of the magnetic field of the industrial frequency (MF IF, 50 Hz, 0.4 mT, 4 hours / day, 5 days / week), of diet with NaNO₃ (6.75 mg / kg of body weight) and their combined effects. A tendency to decrease in the number of leukocytes in the blood of animals under the influence of a magnetic field was marked. The diet with sodium nitrate led to more pronounced leukopenia. In the blood serum of animals, with the combination of diet with nitrate and the effect of MF IF, an increase in NO₃⁻ was recorded. The influence of experimental factors and their combination caused an imbalance in the distribution of spermatogenic cells of different populations and was manifested in a decrease in the activity of the spermatogenesis process in the xenobiotic application groups and its combination with the effect of MF IF. A tendency to decrease in the amount and a statistically significant decrease of the viability of epididymal spermatozoa in all experimental groups was noted.

Rats, nitrates, electromagnetic field industrial frequency, reproductive system males, blood

Получено марте 2018 г., подписано в печать в апреле 2018 г.

Елена Шубенок. Младший научный сотрудник лаборатории эндокринологии и биохимии Государственного научного учреждения «Институт радиобиологии НАН Беларуси». Адрес: ул. Федюнинского 4, 246007, г. Гомель, Беларусь. Тел. +375293631639, адрес эл. почты shube-lena@yandex.ru

Alena Shubianok. Institute of Radiobiology of National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus, junior researcher. Address: Fedyninskogo Str. 4, Gomel, Republic of Belarus, 246007. Tel +375293631639, e-mail: shube-lena@yandex.ru.

Наталья Чуешова. Научный сотрудник лаборатории эндокринологии и биохимии Государственного научного учреждения «Институт радиобиологии НАН Беларуси». Адрес: ул. Федюнинского 4, 246007, г. Гомель, Беларусь. Тел. +375296929571, адрес эл. почты natalya-chueshova@tut.by

Natalya Chueshova. Institute of Radiobiology of National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus, researcher. Address: Fedyninskogo Str. 4, Gomel, Republic of Belarus, 246007. Tel +375296929571, e-mail: natalya-chueshova@tut.by.

Маргарита Бакшаева. Научный сотрудник лаборатории эндокринологии и биохимии Государственного научного учреждения «Институт радиобиологии НАН Беларуси». Адрес: ул. Федюнинского 4, 246007, г. Гомель, Беларусь. Тел. +375447133373, адрес эл. почты m.bakshaeva@yandex.ru

Marharyta Bakshayeva. Institute of Radiobiology of National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus, researcher. Address: Fedyninskogo Str. 4, Gomel, Republic of Belarus, 246007. Tel +375447133373, e-mail: m.bakshaeva@yandex.ru.

Александр Козлов. Младший научный сотрудник лаборатории эндокринологии и биохимии Государственного научного учреждения «Институт радиобиологии НАН Беларуси». Адрес: ул. Федюнинского 4, 246007, г. Гомель, Беларусь. Тел. +375295369063, адрес эл. почты cozlov.aleksander@yandex.ru.

Aliaksandr Kazlou. Institute of Radiobiology of National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus, junior researcher. Address: Fedyninskogo Str. 4, Gomel, Republic of Belarus, 246007. Tel +375295369063, e-mail: cozlov.aleksander@yandex.ru.

Роман Новиков. Младший научный сотрудник лаборатории эндокринологии и биохимии Государственного научного учреждения «Институт радиобиологии НАН Беларуси». Адрес: ул. Федюнинского 4, 246007, г. Гомель, Беларусь. Тел. +375444724304, адрес эл. почты novikovr86@mail.ru

Roman Novikov. Institute of Radiobiology of National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus, junior researcher. Address: Fedyninskogo Str. 4, Gomel, Republic of Belarus, 246007. Tel +375444724304, e-mail: novikovr86@mail.ru.

Григорий Горох. Заведующий лабораторией эндокринологии и биохимии Государственного научного учреждения «Институт радиобиологии НАН Беларуси». Адрес: ул. Федюнинского 4, 246007, г. Гомель, Беларусь. Тел. +375257445749, адрес эл. почты grygn@tut.by.

Grigoriy Gorokh. Institute of Radiobiology of National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus, head of the laboratory. Address: Fedyninskogo Str. 4, Gomel, Republic of Belarus, 246007. Tel +375257445749, e-mail: grygn@tut.by.