doi: 10.17116/repro201723125-28

# Оценка функционального состояния семенников и яичников у крыс, подвергнутых действию шестивалентного хрома в малых дозах

К.б.н., с.н.с. В.П. МАМИНА[1], к.б.н., н.с. Л.Д. ШЕЙКО[2]

[1]Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия, 620144; [2]ФГУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи», Екатеринбург, Россия, 620028

**Цель исследования** — анализ функционального состояния семенников и яичников у крыс разведения Wistar, подвергнутых действию шестивалентного хрома в малых дозах.

**Материал и методы.** Эксперименты проводили на половозрелых крысах разведения Wistar обоих полов с массой тела у самцов 230—250 г, у самок —180—190 г (всего 50 животных). Животные были разделены на группы в соответствии с получаемой дозой бихромата калия. 1-я группа (контроль) — крысам ежедневно внутрибрюшинно вводили физиологический раствор; 2-я группа — самцы, ежедневно получавшие внутрибрюшинно инъекцию бихромата калия в дозе 0,028 мг/кг; 3-я группа — самки, затравленные бихроматом калия в дозе 0,028 мг/кг; 4-я группа — самцы, получавшие бихромат калия в дозе 0,28 мг/кг; 5-я группа — самки, подвергнутые обработке в дозе 0,28 мг/кг в течение 48 дней. У самцов на мазках из эпидидимальных сперматозоидов проводили оценку их морфологического состояния, у самок — методом вагинальных мазков определяли продолжительность эстрального цикла. Для оценки генеративной функции животных в конце экспозиционного периода подопытных животных спаривали с интактными, проводился анализ эмбриональных потерь.

**Результаты.** Цитологический анализ эпидидимальных сперматозоидов показал увеличение числа патологических форм сперматозоидов ($p<0,05$). У самок отмечается нарушение эстрального цикла: увеличение продолжительности стадии диэструса (стадия желтого тела). Общая эмбриональная смертность плодов возрастает при спаривании как подопытных самцов с интактными самками, так и подопытных самок с интактными самцами. Следует отметить, что при спаривании подопытных самцов с интактными самками наибольший вклад в эмбриональную смертность вносит постимплантационная гибель, при спаривании самок, получивших бихромат калия в дозе 0,028 мг/кг, с интактными самцами — доимплантационная гибель, при дозе 0,28 мг/кг — постимплантационная гибель.

**Выводы.** Шестивалентный хром в малых дозах вызывает как у самок, так и у самцов нарушение репродуктивной функции. Однако механизм повреждающего действия различен: у самок — изменения происходят в гипофиз-гонадной оси, которые сопровождаются гормональным дисбалансом, приводящим либо к гибели гаметы, либо к ее неспособности к оплодотворению; у самцов — непосредственное мутагенное действие на сперматогенные клетки.

*Ключевые слова: шестивалентный хром, сперматогенез, сперматозоиды, эстральный цикл, эмбриональные потери.*

# The assessment of functional state of testis and ovaries of rats after chrome hexavalent exposure

V.P. MAMINA[1], L.D. SHEIKO[2]

[1]Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Division of Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia, 620144; [2]Federal official body «The Ural scientific research Institute of Protection of Mother and Infancy of Federal agency on highly technological medical aid», Ekaterinburg, Russia, 620028

**Objective.** To analysis the functional state of testis and ovaries of Wistar rats after the action hexavalent chrome in small doses.

**Material and methods.** The experiments were performed on rats of dilution Wistar. The weight of females compounded 180—190 g, of males — 230—250 g (n=50). The rats were divided into five groups: group I — control rats were injected daily with physiologic saline intraperitoneally (i.p.) for 48 days; group II — males received daily i.p. potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) at a dose 0,028 mg/kg; group III — females received daily i.p. potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) at a dose 0,028 mg/kg; group IV — males received daily i.p. potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) at a dose 0,28 mg/kg, group V — females received daily i.p. potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) at a dose 0,28 mg/kg. At males on smears from epididymidal spermatozoon spent an assessment of their morphological state, at females a method of vaginal smears defined durations of an estrous cycle. For an assessment of generative function a copulate of experimental animals with intact was spent, analysis of embryonic losses was spent.

**Results.** The analysis of epididymidal spermatozoon showed the increase of pathological forms of spermatozoon ($p<0.05$). The females had estrous cycle disorders: the increase of duration of diestrus (a stage of yellow body). The general embryonic mortality of fetuses increased at coupling of experimental males with of intact females, and at coupling of experimental females with of intact males. It is necessary to note, that at coupling experimental males with intact females the greatest contribution to an embryonic mortality brings postimplantation embryos death, at coupling experimental females with intact males: preimplantation embryos death occur at a dose of 0,028 mg/kg and postimplantation embryos death at a dose of 0,28 mg/kg.

**Conclusion.** Hexavalent chromium in small doses causes the reproductive function disorders. However, the mechanism of damaging action is different: at females the changes occur in hypophysis-gonadal axis and are accompanied by hormonal disbalance and lead

© В.П. Мамина, Л.Д. Шейко, 2017

e-mail: mamina@ipae.uran.ru

to the destruction of gametes or infertility. At males the immediate mutagen action on spermatogenous cells was observed.

*Keywords: hexavalent chromium, spermatozoon, estrous cycle, embryonic mortality.*

Одной из причин, приводящих к нарушению репродуктивной функции, является воздействие производственных и экологических факторов на организм человека. В настоящее время установлено, что токсичность соединений напрямую зависит от их растворимости, валентности, продолжительности действия, дозы и путей поступления в организм. Соединения шестивалентного хрома входят в перечень потенциально опасных химических веществ по действию на репродуктивную функцию человека и относятся к опасным загрязнителям окружающей среды, обладающим мутагенными, канцерогенными свойствами [8, 12]. Исследования в области репродуктивной токсикологии показали гонадо- и генотоксический эффект солей тяжелых металлов. За последние десятилетия отмечается ухудшение показателей состояния репродуктивного здоровья [1, 13]. Частота бесплодного брака возросла до 10—12%, в 30—40% случаев причинами является инфертильность мужчин [7]. Шестивалентный хром может оказывать неблагоприятное действие на всех этапах репродуктивного процесса: на созревание половых клеток, оплодотворение, эмбриогенез и постнатальное развитие. У женщин, проживающих в хромовой биогеохимической провинции, наблюдаются нарушения менструальной функции, бесплодие, увеличение самопроизвольного прерывания беременности в ранние сроки [3]. Действие химических веществ на гонады может быть как прямым, так и опосредованным. Отдельные ксенобиотики способны непосредственно вызывать генотоксический эффект в половых клетках, проникая через гематотестикулярный барьер. Опосредованное действие ксенобиотиков на гонады происходит через регулирующие репродуктивную функцию механизмы. К интегральным показателям функционального состояния семенников и яичников следует отнести в первую очередь способность к оплодотворению и уровень эмбриональных потерь. В литературе практически отсутствуют данные, касающиеся вклада женского и мужского организма в эмбриональные потери при воздействии шестивалентного хрома. В литературе имеются немногочисленные данные о сравнительной чувствительности женской и мужской генеративной функции к действию негативных факторов окружающей среды. Ряд авторов [11] в клинических и экспериментальных исследованиях показали одинаковую чувствительность мужских и женских половых желез к воздействию ряда химических соединений, обладающих токсическим свойством. В то же время имеются данные, которые указывают на более выраженный мутагенный эффект со стороны гонад у самцов по сравнению с самками [10].

Цель исследования — оценка функционального состояния семенников и яичников у крыс Wistar, подвергнутых действию шестивалентного хрома в малых дозах.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на половозрелых крысах разведения Wistar обоих полов с массой тела у самцов 230—250 г, у самок — 180—190 г (всего 50 животных). Моделирование хромовой интоксикации у животных осуществлялось при субхроническом внутрибрюшинном введении бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) в дозах 1/1000 и 1/100 от $ЛД_{50}$ ($ЛД_{50}$=28 мг на 1 кг массы тела), что составляет 0,028 и 0,28 мг на 1 кг массы тела по веществу, в течение 48 дней. Контрольные животные получали физиологический раствор в том же объеме. В конце хромовой экспозиции часть подопытных животных, получивших бихромат калия, спаривалась с интактными животными в соотношении 1 самец + 2 самки с последующим анализом эмбрионального материала. Другую часть животных умерщвляли в соответствии с методическими указаниями по биоэтике [14]. Сперматозоиды, извлеченные из хвостовой части эпидидимиса, исследовались на морфологию, в камере Горяева учитывали количество сперматозоидов [4]. У самок определяли продолжительность эстрального цикла и отдельных его стадий методом вагинальных мазков. На 19—20-й день беременности в яичниках определяли количество желтых тел беременности, число живых эмбрионов, мест имплантаций и резорбций. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия *t* Стьюдента и непараметрических методов: U-критерий Вилкоксона—Манна—Уитни и критерия $\chi^2$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У самцов, получавших бихромат калия, количество и процент подвижных спермиев находятся в пределах нормы, но доля клеток с аномальной головкой и хвостом значимо выше, чем в контроле **(см. таблицу; рис. 1)**.

Известно, что морфология головки отражает мутационный процесс, происходящий в клетке, и является индикатором токсического действия химических факторов. Генетические изменения в половых клетках приводят к доминантно-летальным мутациям, которые включают гибель эмбрионов как до, так и после имплантации [9]. При спаривании самцов,

**Показатели функционального состояния сперматозоидов и яичников у крыс, подвергавшихся воздействию бихромата калия**

| Показатель | Контроль | Доза бихромата калия | |
|---|---|---|---|
| | | 0,028 мг/кг | 0,28 мг/кг |
| Концентрация сперматозоидов, тыс./мл | 46,9±0,9 | 34,4±3,9 | 36,0±2,39 |
| Количество аномальных форм спермиев, % | 2,80±0,6 | 4,10±0,20* | 4,9±0,52* |
| Продолжительность эстрального цикла, дни: | 4,4±0,08 | 4,58±0,18* | 4,85±0,23* |
| стадия диэструса | 1,9±0,6 | 2,9±0,3* | 2,8±0,23* |
| стадия эструса | 1,1±0,5 | 1,1±0,06 | 1,08±0,043 |

*Примечание*. * — различия значимы при $p<0,05$.

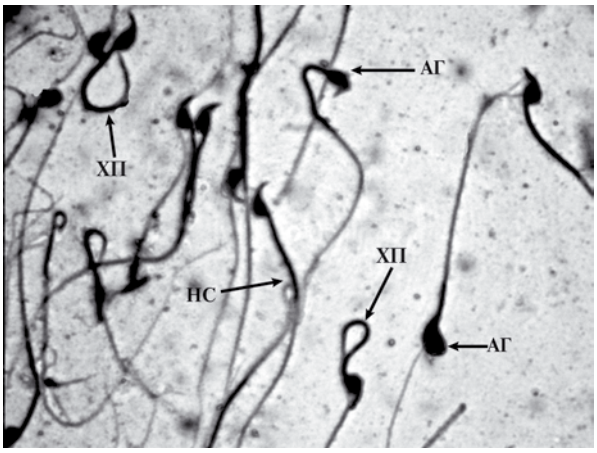


***Рис. 1.*** **Сперматозоиды в норме (НС), с аномальной головкой (АГ) и патологией хвоста (хвост—петля; ХП) у крыс при воздействии шестивалентного хрома. Ув. 1080.**

получивших бихромат калия, с интактными самками количество беременных самок не отличалось от контрольной группы (75 и 77% соответственно). Наблюдаются увеличение количества эмбрионов с резорбцией на ранних стадиях развития и снижение числа живых плодов, приходящихся на одну самку, возрастает общая эмбриональная смертность ($p<0,05$). Наибольший вклад в общую эмбриональную смертность вносит постимплантационная гибель **(рис. 2)**.

В наших исследованиях увеличение эмбриональной смертности при спаривании подопытных самцов с интактными самками обусловлено как генетическими, так и не генетического характера изменениями в половых клетках. Как правило, возрастание числа сперматозоидов с аномальными головками приводит к постимплантационным потерям, доимплантационная гибель может быть вызвана снижением оплодотворяющей способности сперматозоидов, не связанными с генетическими нарушениями. У самок, подвергнутых действию бихромата калия, наблюдалось нарушение овариально-эстрального цикла. У подопытных самок возрастает продолжительность стадии диэструса (покоя), во время которой происходит рост и созревание фолликулов **(см. таблицу)**. Известно, что активность желтого тела зависит от секреции пролактина и лютеотропного гормона. Задержка овуляции ведет к внутрифолликулярному перезреванию яйцеклетки и, как следствие, — к возрастанию частоты эмбриональной гибели плодов [6]. При спаривании подопытных самок с интактными самцами также значимо увеличивается эмбриональная смертность, однако ее структура несколько другая, чем в случае с подопытными самцами: при дозе 0,028 мг/кг наибольший вклад в эмбриональную смертность вносит гибель эмбрионов до имплантации, при дозе 0,28 мг/кг — постимплантационная гибель **(см. рис. 2)**. Полученные данные свидетельствуют о нарушении генеративной функции самок и самцов, подвергнутых воздействию шестивалентного хрома в малой дозе. Однако механизм повреждающего действия различен: у самок первоначальные изменения происходят в гипофиз-гонадной оси, у самцов — непосредственное мутагенное действие на сперматогенные клетки. Гонадотоксическое действие хрома у самцов связано с нарушением проницаемости гематотестикулярного барьера, с активацией процессов перекисного окисления и подавлением систем антиоксидантной защиты в ткани семенников [5]. Шестивалентный хром, проникая через гематотестикулярный барьер, вызывает хромосомные аберрации в половых клетках, которые приводят к формированию сперматозоидов с аномальными головками. Показано, что увеличение количества сперматозоидов с аномальной головкой приводит и к возрастанию частоты доминантных летальных мутаций [2].

## ВЫВОДЫ

Шестивалентный хром в малых дозах приводит к нарушению морфофункционального состояния сперматозоидов у крыс: возрастает доля сперматозоидов с аномальной головкой. У самок наблюдается увеличение продолжительности овариально-эстрального цикла. Увеличение общей эмбриональной смертности при скрещивании подопытных самцов с интактными самками в большей степени происходит за счет постимплантационной гибели, что свидетельствует о мутагенном эффекте исследуемого соединения. Уровень общей эмбриональной смертности указывает на более высокую чувствительность гонад самцов к воздействию шестивалентного хрома по сравнению с самками.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

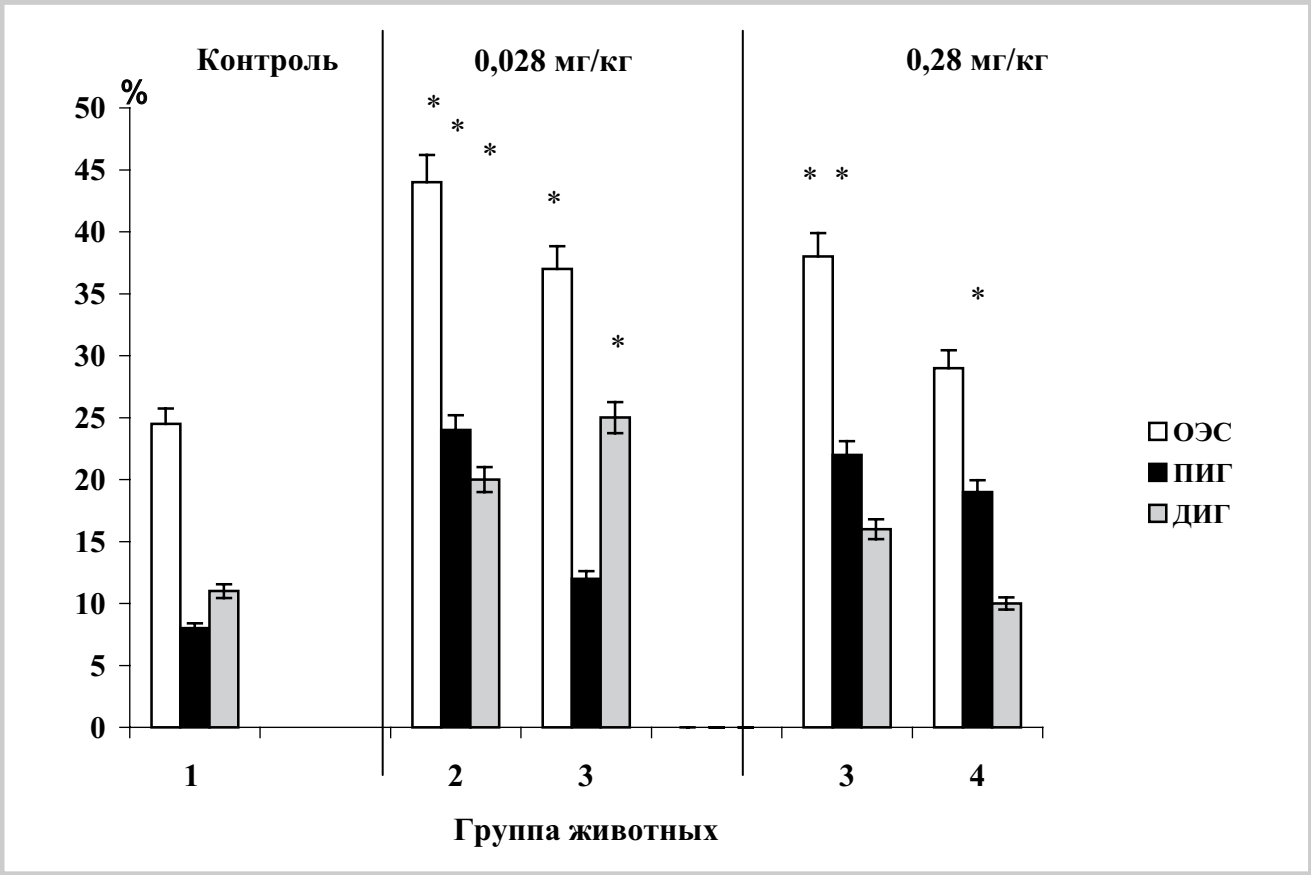


***Рис. 2.*** **Состояние генеративной функции самцов и самок крыс при воздействии шестивалентного хрома.**

1-я группа — интактные самцы + интактные самки; 2-я группа — самцы, получившие $K_2Cr_2O_7$ + интактные самки; 3-я группа — самки, получившие $K_2Cr_2O_7$ + интактные самцы; 4-я группа — самцы, получившие $K_2Cr_2O_7$ + интактные самки; 5-я группа — самки, получившие $K_2Cr_2O_7$ + интактные самцы.
ОЭС — общая эмбриональная смертность; ПИГ — постимплантационная гибель; ДИГ — доимплантационная гибель.

## ЛИТЕРАТУРА


1. Быков В.Л. Сперматогенез у мужчин в конце XX века. *Проблемы репродукции*. 2000;1:6-13.
2. Даев С.В., Дукельская А.В. Индукция аномалий спермиевых головок у половозрелых самцов мышей линии СВА феромоном самок мышей 2,5-диметилпиразином. *Генетика*. 2003;39(7):811-815.
   doi: 10.1023/A:1024709321888
3. Дощанова А.М. *Состояние репродуктивной системы женщин, проживающих в хромовой биогеохимической провинции*: Дис. ... д-ра мед. наук. СПб. 1996.
4. Иванов Ю.В. Морфологические методы исследований в гигиене и токсикологии. *Гигиена и санитария*. 1983;4:17-20.
5. Мамина В.П. Сперматогенез и процессы перекисного окисления липидов в гонадах крыс, подвергнутых действию шестивалентного хрома. *Проблемы репродукции*. 2015;21(2):23-26.
   doi: 10.17.116/ repro201521223–26
6. Никитин А.И. Гормоноподобные ксенобиотики и репродуктивная система. *Проблемы репродукции*. 2002;2:5-15.
7. Никитин А.И. *Вредные факторы среды и репродуктивная система человека (ответственность перед будущими поколениями)*. 2-е издание, дополненное. СПб:. Элби-СПб. 2008.
8. Перечень веществ, продуктов, производственных процессов, бытовых и природных факторов, канцерогенных для человека. Федеральные санитарные правила, нормы и гигиенические нормативы. ГН 1.1.029-95. М. 1995;3-7.
9. Померанцева М.Д., Рамайя Л.К., Рубанович А.В., Шевченко В.А. Генетические последствия повышенного радиационного фона у мышевидных грызунов. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2006;46(3):279-286.
10. Саноцкий И.В., Фоменко В.Н. *Отдаленные последствия неорганических соединений* М.: Медицина. 1989.
11. Смирнов М.И. Отдаленные эффекты воздействия трех- и шестивалентного хрома в воде на организм. *Гигиена и санитария*. 1985;7:31-32.
12. *Хром. Гигиенические критерии состояния окружающей среды*. ВОЗ (Женева). 1990;1.
13. Dohle GR, Diemer T, Giwercman A. *Europ Assoc Urology*. 2010.
14. World Medical Association Declaration of Helsinki; Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subject. *UMS*. 2002;42-46.