

О.О.Тимошенко

Сумський державний
університет

Ключові слова: посмуговані м'язи, солі важких металів, щури.

Надійшла: 09.11.2015

Прийнята: 14.12.2015

УДК 577.128:611.72.084:[546.81+546.711+546.56]-38

ЗМІНИ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ТА СТРУКТУРИ ПОСМУГОВАНИХ М'ЯЗІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВПЛИВУ НА ОРГАНІЗМ КОМБІНАЦІЇ СОЛЕЙ СВИНЦЮ, МАРГАНЦЮ ТА МІДІ

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Закономірності вікових і конституціональних морфологічних перетворень внутрішніх органів і кісткової системи за умов впливу ендо- і екзогенних чинників і шляхи їх корекції» (номер державної реєстрації 0113U001347).

Реферат. Метою дослідження було визначити на мікроскопічному та ультраструктурному рівнях особливості морфологічної перебудови та динаміку змін хімічного складу посмугованих м'язів за умов дії на організм комбінації солей важких металів. Виявлено, що потрапляння до організму експериментальних щурів солей міді, свинцю та марганцю зумовлює накопичення іонів відповідних металів у скелетних м'язах. Значне підвищення концентрації міді, свинцю та марганцю призводить до набрякових змін та активації склеротичних і атрофічних процесів у посмугованій м'язовій тканині.

Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 4. – С. 85-90.

© О.О.Тимошенко, 2015

✉ alenamaksimova@ukr.net

Tymoshenko O.O. Changes of the chemical composition and structure of striated muscles in rats under the influence of lead, manganese and cooper salts combinations.

ABSTRACT. Background. Heavy metals are dangerous in terms of their toxicity and prevalence in numerous countries. But now there is almost no data about changes in striated muscles in response to the toxic effects of a metal salts combination after their entrance to the body through the gastrointestinal tract. **Objective.** To determine the morphological features and dynamics of the changes in chemical composition of striated muscles under the influence of heavy metal salts combinations. **Methods.** The experiment was performed on 36 white Wistar rats. Animals were subdivided into experimental and control group (18 rats in each). Within 90 days the beings of experimental group were given drinking water with added $MnSO_4 \times 5H_2O$ (5 mg/l), $Pb(NO_3)_2$ (3 mg/l) and $CuSO_4$ (20 mg/l). The content of Cu, Zn, Pb, Fe, Mn, Cr was determined; some morphometric parameters: diameter of muscle fibers (DMF), width of endomysium (WE), width of perimysium (WP), surface area of nucleus (SN), surface area of mitochondria (SM), the volume of nucleus (VN), the volume of mitochondria (VM) were estimated. **Results.** Three months of intoxication led to increase of DMF on 10,17% ($p < 0,05$), WE – on 20,99% ($p < 0,001$), WP – on 14,31% ($p < 0,001$), SN – on 12,54 % ($p < 0,001$), SM – on 14,46% ($p < 0,001$), VN and VM – on 19,34% ($p < 0,001$) and 19,68% ($p < 0,001$) respectively. Chemical analysis of skeletal muscles revealed an increase of copper content on 26,14% ($p < 0,001$), lead – on 31,79% ($p < 0,001$), manganese – on 15,26% ($p < 0,001$). Index of iron have decreased on 5,82% ($p < 0,05$), the level of zinc – on 6,1% ($p < 0,05$). **Conclusion.** The influence of copper salts, lead and manganese on striated muscles induces the activation of sclerotic processes. In addition, the heavy metal intoxication is manifested by the signs of swelling, deformation and structural disorganization of functional parts of the symplast. Chemical and analytical study of the skeletal muscles showed a progressive reduction of iron and zinc, along with the rapid accumulation of drinking metal ions and salts.

Key words: striated muscle, heavy metals salts, rats.

Citation:

Tymoshenko OO. [Changes of the chemical composition and structure of striated muscles in rats under the influence of lead, manganese and cooper salts combinations]. *Morphologia*. 2015;9(4):85-90. Ukrainian.

Вступ

Одним з небажаних наслідків діяльності людини на нашій планеті є забруднення навколишнього середовища, що являє собою результат прогресу та стрімкого технічного розвитку [1; 2]. Потрапляння в навколишнє середовище, або ви-

никнення в ньому нових фізичних, хімічних і біологічних агентів, або перевищення їх природного середньорічного рівня, призводить до негативних впливів на організми живих істот [2-6]. Вивчення механізму таких впливів на біологічні організми та виявлення змін, що розвиваються в

них у відповідь на інтоксикацію, дають змогу виявляти можливі механізми захисту та боротьби з пошкоджуючою дією зовнішніх чинників.

Особливо небезпечними є комбінації токсичних речовин, дія яких на живий організм може бути вкрай небезпечною та частіше за все непередбаченою.

Адаптаційні та компенсаторні можливості біологічних систем на початкових етапах контакту з забруднювачами мають здатність до нівелювання їх впливу та підтримання сталості гомеостазу у тих рамках, які сприяють повноцінному функціонуванню цілісного організму [7]. Проте останнє стає неможливим зі збільшенням терміну експозиції полутантів, або підвищенням їх концентрації [8]. Наступає стан виснаження протекторних систем з поступовим переходом від стадії субкомпенсації до повної декомпенсації, що проявляється спочатку порушенням функції тканин і органів, а згодом і їх незворотними морфологічними перебудовами [9-11].

Важкі метали є особливо небезпечними з погляду на їх токсичність та розповсюдженість на території багатьох країн світу [12]. Упродовж останніх десятиліть ведеться ретельне вивчення різних механізмів патогенного впливу токсичних металів та їх солей на організми живих істот в цілому і на функціонування та структуру окремих систем, органів та тканин [13-16]. При цьому у світовій науковій літературі відверто бракує робіт, що були б присвячені розгляду питань патогенного впливу важких металів на скелетну мускулатуру на органному, тканинному, клітинному та молекулярному рівнях, питань змін хімічного складу довірливої мускулатури в умовах мікроелементозів.

Метою даного дослідження було визначити на мікроскопічному та ультраструктурному рівнях особливості морфологічної перебудови та динаміку змін хімічного складу посмугованих м'язів за умов дії на організм комбінації солей важких металів.

Матеріали та методи

Проведення експерименту здійснювали на 36 білих щурах лінії Вістар чоловічої статі (маса 270-310 г). Тварин розділяли на дослідну та контрольну серії (по 18 щурів відповідно). Протягом 30, 60 та 90 діб істотам піддослідної серії давали питну воду з додаванням $MnSO_4 \times 5H_2O$ (5 мг/л), $Pb(NO_3)_2$ (3 мг/л) та $CuSO_4$ (20 мг/л). Тварини групи контролю під час всього дослідження вживали звичайну питну воду. Тварин виводили з експерименту по 6 істот з кожної групи через кожні 30 діб шляхом декапітації під ефірним наркозом. Для вивчення брали латеральну голівку триголового м'яза литки.

Піддослідні тварини доглядалися в умовах віварію медичного інституту Сумського державного університету відповідно до за-

гальноприйнятих рекомендацій, вимог та положень щодо догляду за лабораторними тваринами («Правила проведення робіт з використанням експериментальних тварин», додаток 4, затверджений наказом Міністерства охорони здоров'я № 755 від 12 серпня 1997 р.). Під час проведення експериментальних робіт порушень норм етики та моралі не було.

Забарвлювали гістологічні препарати гематоксилином і еозином. Вивчення мікропрепаратів проводили з використанням світлового мікроскопа OlympusBH-2 (Японія). Ультрамикроскопічне дослідження реалізовували за допомогою електронного мікроскопу ПЕМ-100м (Суми, Україна) з напругою прискорення 75-100 кВ. Фотографування препаратів виконували цифровою камерою Baumer/optronicTyp: CX 05c. Мікроморфометричний аналіз здійснювали за допомогою універсальної обчислювальної програми «SEO Image Lab 2.0».

Проводили вивчення таких морфометричних параметрів: діаметр м'язового волокна (ДМВ), ширина ендомізії (ШЕ), ширина перимізії (ШП). Площу ядра міосимпласту (ПЯ) та мітохондрій (ПМ) визначали за формулою для розрахунку площі еліпса: $S=\pi ab$ (мкм²); де а – довжина довгої півосі, b – довжина короткої півосі. Об'єм мітохондрії (ОМ) та ядра м'язового волокна (ОЯ) розраховували із використанням формули: $V=4/3 \pi ab(a+b)/2$ (мкм³); де а – довжина довгої півосі, b – довжина короткої півосі.

Визначення концентрації хімічних елементів у посмугованих м'язах здійснювали за допомогою атомного абсорбційного спектрофотометра С115-М1 (Україна) та спеціальної обчислювальної електронної програми до нього «AAS SPEK». Досліджували вміст 1) міді (аналітична довжина хвилі 324,7 нм), 2) заліза (248,3 нм), 3) хрому (357,9 нм) 4) цинку (213,9 нм), 5) марганцю (279,5 нм), 6) свинцю (217,0 нм) в мкг/г сирової маси.

Визначення достовірності відмінностей між вибірками проводили із використанням критерію Стьюдента (t). Відмінність вважали достовірною, якщо вірогідність випадкової різниці не перевищувала 0,05 (p<0,05). Статистичну обробку усіх отриманих даних проводили з використанням електронного статистичного пакету SPSS-15.0 (SPSS for Windows, version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

Результати та їх обговорення

Результати вивчення зразків латеральної голівки триголового м'яза литки старечих щурів після першого місяця інтоксикації солями свинцю, міді та марганцю показали набряк та деформацію м'язових волокон, склеротичні зміни (рис. 1В) та ознаки венозного повнокрів'я. Ядра при цьому розташовувались по периферії цитоплазми.

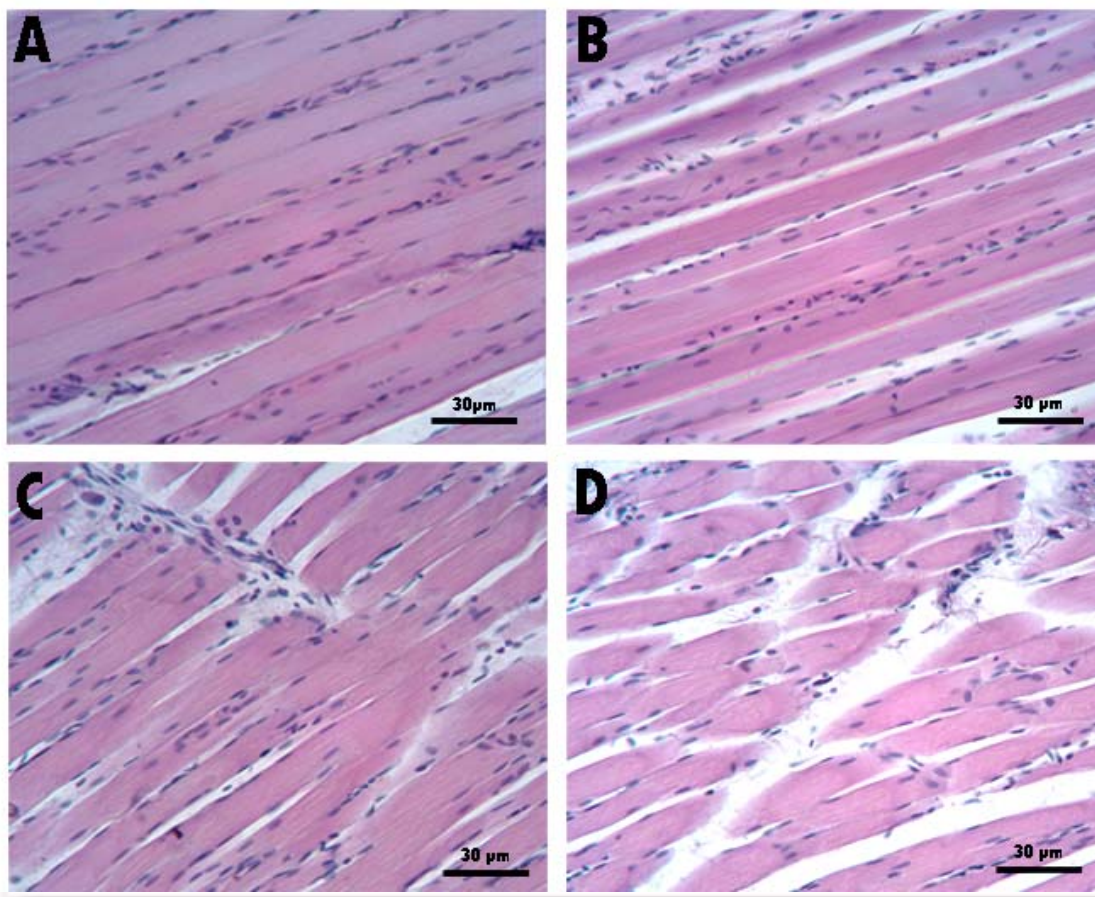


Рис. 1. Поздовжній зріз посмугованого м'яза щура старечого віку контрольної групи (А); після першого місяця експерименту (В); після другого місяця експерименту (С); після третього місяця експерименту (D). Пояснення в тексті. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

Морфометрія після першого місяця дослідження виявила достовірне збільшення ШП (на 4,21%; $p < 0,05$) та ОЯ (на 7,26%; $p < 0,05$), якщо порівнювати з інтактними тваринами (табл. 1).

Реакція клітинних органел міосимпласту щурів старечого віку на 30-добову інтоксикацію не була вираженою та яскравою. Однак, інколи були присутні вогнища дезорганізації міофібрил

поряд із втратою паралельності їх розташування, набряком елементів саркоплазматичного ретикула (рис. 2В).

Хімічний аналіз посмугованих м'язів виявив підвищення вмісту міді у тварин дослідної групи на 11,56% ($p < 0,05$), свинцю – на 12,23% ($p < 0,001$) та марганцю – на 5,97% ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таблиця 1
Результати морфометрії посмугованих м'язів щурів старечого віку, що отримували солі свинцю, марганцю та міді ($M \pm m$)

Параметри	1 місяць		2 місяць		3 місяць	
	Контроль (n = 6)	Дослід (n = 6)	Контроль (n = 6)	Дослід (n = 6)	Контроль (n = 6)	Дослід (n = 6)
ДМВ, мкм	17,61±0,24	18,01±0,24	18,33±0,26	19,07±0,21	19,05±0,27	20,53±0,19*
ШЕ, мкм	2,77±0,12	2,90±0,14	2,89±0,11	3,18±0,08*	3,01±0,09	3,56±0,11*
ШП, мкм	32,12±0,34	34,13±0,22*	34,21±0,26	36,56±0,29*	34,99±0,31	38,79±0,21*
ПЯ, мкм ²	11,15±0,12	11,67±0,21	10,96±0,12	11,79±0,30*	10,82±0,20	12,18±0,25*
ПМ, мкм ²	2,29±0,06	2,38±0,06	2,24±0,072	2,42±0,07*	2,22±0,06	2,54±0,05*
ОЯ, мкм ³	24,16±0,33	25,92±0,29*	23,46±0,41	26,14±0,24*	23,01±0,31	27,46±0,19*
ОМ, мкм ³	1,08±0,02	1,14±0,02	1,06±0,02	1,18±0,02*	1,05±0,03	1,26±0,01*

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,001$.

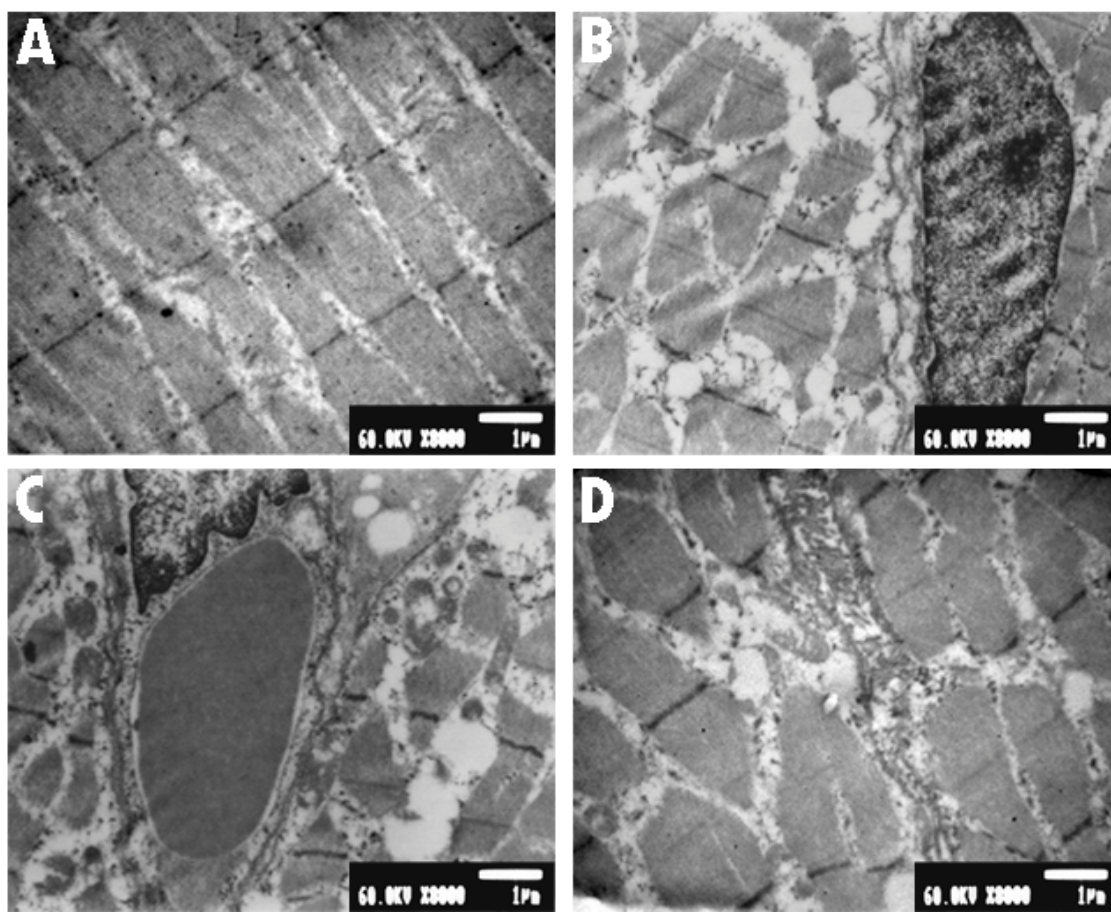


Рис. 2. Ультраструктура посмугованого м'яза щура старечого віку контрольної групи (А); після першого місяця експерименту (В); після другого місяця експерименту (С); після третього місяця експерименту (D).

Після двох місяців інтоксикації спостерігались виражені зміни форми волокон міосимпласту, їх деструкція та, навіть, ділянки руйнації (рис. 1С). Ядра м'язових клітин розташовувались хаотично по всій площі саркоплазми. Усі волокна були розділені яскраво вираженими прошарками ендомізю, пучки волокон оточував масивний перимізій.

ДМВ щурів експериментальної групи після двох місяців зріс на 6,24% ($p < 0,05$), ШЕ – на 14,53% ($p < 0,05$), а ШП – на 8,53% ($p < 0,05$), ПЯ – на 7,56% ($p < 0,05$), та ПМ – на 8,34% ($p < 0,05$). ОЯ і ОМ виявились більшими на 11,41% та 11,63% відповідно, якщо порівнювати з інтактними тваринами ($p < 0,001$) (табл. 1).

Після шістдесяти діб експерименту електронна мікроскопія показала наступні зміни. Міофібрили здебільшого були деформовані, мали хвилеподібну форму. Не завжди можна було чітко виявити межі саркомерів. Ядра м'язових волокон виглядали набряклими, часто не містили гетерохроматину. Також відзначався набряк мітохондрій, деформація та руйнація крист, фрагментація елементів саркоплазматичного ретикулуму (рис. 2С).

Концентрація міді, свинцю та марганцю щу-

рів дослідної групи зросла відповідно на 17,95%, 24,59% ($p < 0,001$) і 7,18% ($p < 0,05$). Достовірно меншим став вміст цинку (на 3,97%, $p < 0,05$) та заліза (на 4,22%, $p < 0,05$). Не змінився лише показник вмісту хрому (табл. 2).

Мікроскопічна картина скелетних м'язів щурів після завершення всього терміну експерименту характеризувалась значно вираженою різноманітністю форми м'язових волокон, зменшенням їх довжини та набряком. Поряд із цим у препаратах зустрічались волокна, які були атрофічними та зменшеними в об'ємі (рис. 1D). Цитоплазма симпласту забарвлювалась переважно у блідорожевий колір. Ядра м'язових клітин також відзначались розмаїттям форм: від дрібних кіл до видовжених набряклих еліпсів і трикутників. Розташовувались вони по всій площі саркоплазми. Сполучнотканинні прошарки зазнали значного розширення, містили ділянки крововиливів.

У тварин старечого віку після трьох місяців експерименту відзначалось збільшення ДМВ на 10,17% ($p < 0,05$), ШЕ – на 20,99% ($p < 0,001$), ШП – на 14,31% ($p < 0,001$), ПЯ 12,54% ($p < 0,001$), ПМ – на 14,46% ($p < 0,001$), а ОЯ і ОМ – на 19,34% ($p < 0,001$) та 19,68% ($p < 0,001$) відповідно (табл. 1).

Результати спектрального аналізу посмугованих м'язів щурів старечого віку, що отримували солі свинцю, марганцю та міді ($M \pm m$)

Метал	1 місяць		2 місяць		3 місяць	
	Контроль (n = 6)	Дослід (n = 6)	Контроль (n = 6)	Дослід (n = 6)	Контроль (n = 6)	Дослід (n = 6)
Cu, мкг/г	2,6932 ±0,0321	3,0045 ±0,0172*	2,7114 ±0,0342	3,1981 ±0,0355*	2,7437 ±0,0262	3,4609 ±0,0411*
Zn, мкг/г	21,1734 ±0,1214	20,8409 ±0,3015	20,9879 ±0,2212	20,1547 ±0,2236*	21,1283 ±0,1952	19,8395 ±0,2024*
Pb, мкг/г	0,2341 ±0,0013	0,2627 ±0,0014*	0,2389 ±0,0017	0,2977 ±0,0016*	0,2474 ±0,0031	0,3260 ±0,0019*
Fe, мкг/г	33,4123 ±0,3017	32,9913 ±0,2158	33,3918 ±0,3563	31,9827 ±0,2436*	33,4729 ±0,3283	31,7390 ±0,2583*
Mn, мкг/г	0,9563 ±0,0017	1,0134 ±0,0022*	0,9513 ±0,0027	1,0196 ±0,0023*	0,9497 ±0,0021	1,0947 ±0,0036*
Cr, мкг/г	0,0234 ±0,00011	0,0235 ±0,00024	0,0241 ±0,00036	0,0241 ±0,00029	0,0241 ±0,00016	0,0241 ±0,00021

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,001$.

Вивчення ультратонких зрізів посмугованих м'язів після трьох місяців інтоксикації виявило численні ділянки деформації та руйнації міофібрил (рис. 2D). Частіше за все не візуалізувались А-, І-диски та Н-зона. Саркоплазма містила значну кількість вакуолей. На фоні набряклих та розширених ядер симпласту зустрічались ядра у стадії пікнозу. Мітохондрії в препаратах виявлялись гідропічними, їх внутрішня мембрана була зруйнованою, кристи – деформованими, або повністю відсутніми. Структури саркоплазматичного ретикулуму частіше за все були дилатованими, містили місяця розриву та деформації.

Спектральний аналіз довільних м'язів виявив збільшення у дослідних щурів вмісту міді на 26,14% ($p < 0,001$), свинцю – на 31,79% ($p < 0,001$), марганцю – на 15,26% ($p < 0,001$). Показник рівня заліза зменшився на 5,82% ($p < 0,05$), рівня цинку – на 6,1% ($p < 0,05$). Концентрація хрому повністю відповідала такій у групі інтактних щурів ($p = 1,0$) (табл. 2).

Підсумок

Отже, хронічний вплив солей міді, свинцю та марганцю на посмуговані м'язи щурів викликає активацію склеротичних процесів, що виявляє себе вираженим розвитком сполучнотканинних прошарків. Поряд з цим інтоксикація важкими металами проявляє себе ознаками набряку, деформації та структурної дезорганізації як скорочувального апарату, так і інших функціональних апаратів симпласту. Хіміко-аналітичне дослідження скелетних м'язів показало прогресуюче зниження вмісту заліза і цинку поряд зі стрімким накопиченням іонів тих металів, солі яких надходили до організму тварин у підвищеній кількості (свинцю, марганцю та міді).

Перспективи подальших досліджень пов'язані із застосування методів растрової мікроскопії та імуногістохімії з метою вивчення особливостей структурної перебудови скелетних м'язів та компонентів їхнього мікроциркуляторного русла в умовах інтоксикації різними комбінаціями солей важких металів.

Літературні джерела References

1. Kan H. Environment and health in china: challenges and opportunities. *Environ Health Perspect.* 2009 Dec;117(12):A530-1. doi: 10.1289/ehp.0901615.
2. Fuhrmann S, Stalder M, Winkler MS, Niwagaba CB, Babu M, Masaba G, Kabatereine NB, Halage AA, Schneeberger PH, Utzinger J, Cissé G. Microbial and chemical contamination of water, sediment and soil in the Nakivubo wetland area in Kampala, Uganda. *Environ Monit Assess.* 2015 Jul;187(7):475. doi: 10.1007/s10661-015-4689-x.

3. Wu Q, Leung JY, Geng X, Chen S, Huang X, Li H, Huang Z, Zhu L, Chen J, Lu Y. Heavy metal contamination of soil and water in the vicinity of an abandoned e-waste recycling site: implications for dissemination of heavy metals. *Sci Total Environ.* 2015 Feb 15;506-507:217-25. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.10.121.
4. Volk HE, Lurmann F, Penfold B, Hertz-Picciotto I, McConnell R. Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. *JAMA Psychiatry.* 2013 Jan;70(1):71-7. doi:

10.1001/jamapsychiatry.2013.266.

5. Solomon PA. Air pollution and health: bridging the gap from sources to health outcomes. *Environ Health Perspect.* 2011 Apr; 119(4): 156-7. doi: 10.1289/ehp.1103660.

6. Krommer V, Zechmeister HG, Roder I, Scharf S, Hanus-Illy A. Monitoring atmospheric pollutants in the biosphere reserve Wienerwald by a combined approach of biomonitoring methods and technical measurements. *Chemosphere.* 2007 May;67(10):1956-66.

7. Benedetti M, Giuliani ME, Regoli F. Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: molecular and biochemical biomarkers in environmental toxicology. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Mar;1340:8-19. doi: 10.1111/nyas.12698.

8. Holmes AL, Wise SS, Sandwick SJ, Lingle WL, Negron VC, Thompson WD, Wise JP Sr. Chronic exposure to lead chromate causes centrosome abnormalities and aneuploidy in human lung cells. *Cancer Res.* 2006 Apr 15;66(8):4041-8.

9. Lavery TJ, Kemper CM, Sanderson K, Schultz CG, Coyle P, Mitchell JG, Seuront L. Heavy metal toxicity of kidney and bone tissues in South Australian adult bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Mar Environ Res.* 2009 Feb;67(1):1-7. doi: 10.1016/j.marenvres.2008.09.005.

10. Fernandez R, Ariza M, Iscar M, Martinez

C, Rubinos G, Gagatek S, Montoliu MA, Casan P. Impact of environmental air pollutants on disease control in asmathic patients. *Lung.* 2015 Apr;193(2):195-8. doi: 10.1007/s00408-015-9695-9.

11. Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015 Apr 10;9:124. doi: 10.3389/fncel.2015.00124.

12. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. *EXS.* 2012;101:133-64. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6.

13. Rana SV. Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals – a review. *Biol Trace Elem Res.* 2014 Jul;160(1):1-14. doi: 10.1007/s12011-014-0023-7.

14. Gilani SR, Zaidi SR, Batool M, Bhatti AA, Durrani AI, Mahmood Z. Report: Central nervous system (CNS) toxicity caused by metal poisoning: Brain as a target organ. *Pak J Pharm Sci.* 2015 Jul;28(4):1417-23

15. Alissa EM, Ferns GA. Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *J Toxicol.* 2011;2011:870125. doi: 10.1155/2011/870125.

16. Sabath E, Robles-Osorio ML. Renal health and the environment: heavy metal nephrotoxicity. *Nefrologia.* 2012 May 14;32(3):279-86. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2012.Jan.10928.

Тимошенко А.А. Изменения химического состава и структуры поперечнополосатых мышц крыс в условиях воздействия на организм комбинации солей свинца, марганца и меди.

Реферат. Целью исследования было определить на микроскопическом и ультраструктурном уровнях особенности морфологической перестройки и динамику изменений химического состава поперечнополосатых мышц в условиях воздействия на организм комбинации солей тяжелых металлов. Выявлено, что попадание в организм экспериментальных крыс солей меди, свинца и марганца приводит к накоплению ионов соответствующих металлов в скелетных мышцах. Значительное повышение концентрации меди, свинца и марганца приводит к отчетным изменениям и активации склеротических и атрофических процессов в поперечнополосатой мускулатуре.

Ключевые слова: поперечнополосатые мышцы, соли тяжелых металлов, крысы.