

На правах рукописи

Романова Маргарита Сергеевна

**ЦИТО- И КАРИОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ Т-  
ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ СВИНЦОМ В  
УСЛОВИЯХ IN VITRO И IN VIVO**

03.00.25 - гистология, цитология, клеточная биология

03.00.16 - экология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Томск – 2006 г.

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Томском государственном университете»  
Рособразования и в ГОУ ВПО Сибирском государственном медицинском  
университете Росздрава

Научные руководители:

доктор биологических наук,  
профессор

Ильинских Николай Николаевич

доктор биологических наук,  
профессор

Ильинских Ирина Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,  
профессор

Петрова Ирина Викторовна

доктор биологических наук,  
профессор

Бабенко Андрей Сергеевич

Ведущая организация: ГОУ ВПО Новосибирский государственный  
медицинский университет Росздрава

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г. в \_\_\_\_ часов на  
заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском  
государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский  
тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке  
СибГМУ по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 107.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Герасимов А.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время человек находится под влиянием огромного количества неблагоприятных экологических факторов. Известно, что окружающая среда в разной степени загрязнена множеством различных субстанций, значительная часть которых чужеродна для организма человека. Свинец используется человеком с давних времен, причем его применение не ограничивается одной отраслью, по объему промышленного производства он занимает четвертое место в группе цветных металлов. Ежегодно в мире вырабатывается несколько миллионов тонн свинца. В результате хозяйственного использования свинца, а также в силу естественных природных процессов, этот элемент и его соединения весьма распространены в мире и легко доступны [Полянский Н.Г., 1986]. Исследования последних лет показывают, что свинец остается в числе приоритетных загрязнителей многих регионов [Стежка В.А., Дмитруха Н.Н., 2002, Ефимова А.А., Нежданова М.В., 1996, Курамшина Н.Г., Курамшин Э.М., 1997 и др.]. Для всех регионов России свинец – основной антропогенный токсичный элемент из группы тяжелых металлов [Ильинских Е.Н., Огородова Л.М., 2003]. Повышенное содержание свинца обнаруживается практически во всех средах – в почве [Засекин Д.А., 1999, Джанаев З.Г., 1997 и др.], воде [Wyatt C.Jane, Fimbres C., 1998], атмосфере, организмах животных и растений. Фиксируются случаи превышения допустимого содержания свинца в питьевой воде [Быков А.А., Ревич Б.А., 2001, Засекин Д.А., 1999 и др.], в пищевых продуктах [Ванханен В.Д., Выхованец Т.А., 1997, Быков А.А., Ревич Б.А. 2000 и др.] – сырах [Захарова Н.П., Тетерева Л.И., 1997], консервах [Стародумов В.Л., Лутай Г.Ф., 1999], молоке коров [Лукашев В.К., Симуткина Т.Н., 1998, Сироткин А.Н., Воронов С.И., 2000 и др.], в организмах диких [Семенов А.Д., Макаров Э.В., 2002] и домашних животных [Кроль М.Ю., Гаруни М.Х., 1999, Рабинович М.И., 1999], растительности [Закруткин В.Е., Шкафенко Р.П., 1997, Колпакова А.Ф., 1999 и др.]. Основными источниками свинца в окружающей среде являются выбросы и сбросы промышленных предприятий, транспорт, свинецсодержащие красители. Отмечается, что немаловажными источниками могут также являться используемая в охоте свинцовая дробь, сельскохозяйственные удобрения, ядохимикаты [Глунцов Н.М., Макарова С.Л., 1999, Sauve S., McBride M.B., 1997], водопроводные системы [Dambrine E., Party J.-P., 1999, Viraraghavan T., Subramanian K.S., 1996], аварийные ситуации на предприятиях [Засекин Д.А., 1999, Перевозников М.А., Светашова Е.С., 2002].

Свинец имеет свойство накапливаться в живых организмах, составляющих трофическую цепь, последним звеном которой часто является человек [Бондарев Л.Г., 1976, Полянский Н.Г., 1986, Нарзулаев С.Б., Капилевич Л.В., Филиппов Г.П. и др., 1998]. В России постепенно увеличивается численность контингентов, имеющих профессиональный контакт со свинцом [Ильинских Е.Н., Огородова Л.М., 2003]. В результате

многочисленных исследований выяснено, что свинец может оказывать неблагоприятное влияние практически на все органы и ткани человека, в том числе и на иммунную систему. Несмотря на накопленный в этой области материал, до сих пор не выяснены многие вопросы, касающиеся воздействия свинца на клеточные и молекулярные механизмы, обуславливающие функционирование иммунной системы [Стежка В.А., Дмитруха Н.Н., Покровская Т.Н. и др., 2002, Паранько Н.М., Рублевская Н.И., 1999, Apostoli P., 1998 и др.]. Практически отсутствуют сведения о влиянии свинца на Т-лимфоциты периферической крови человека, являющиеся важным составным звеном в системе иммунитета.

В связи с этим целью исследования являлось изучение цитоморфологических последствий воздействия свинцом на Т-лимфоциты периферической крови человека в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить уровень цитогенетических нарушений и активность эксцизионной ДНК-репарации в периферической крови людей, занятых в свинцовом производстве.
2. Исследовать цитоморфологические изменения и соотношение субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови лиц, занятых в сфере свинцового производства.
3. Провести анализ последствий воздействия хлорида свинца на культуры Т-лимфоцитов, полученных от рабочих, занятых в сфере производства свинца и от здоровых доноров, изучив митотическую активность, кариопатологические изменения и уровень хромосомных aberrаций.
4. Изучить специфичность поражения отдельных хромосом Т-лимфоцитов периферической крови, полученной от рабочих свинцового производства.
5. Изучить в условиях *in vitro* цитологические последствия воздействия хлорида свинца на Т-лимфоциты на фоне изменений ядерного аппарата, вызванных биологически активными веществами: фитогемагглютинином и цитохалазином В.

Научная новизна. В результате проведенных исследований впервые проведена комплексная оценка морфологии Т-лимфоцитов и функционального состояния Т-системы иммунитета у людей в условиях свинцового производства и кариопатологических последствий воздействия хлорида свинца на Т-лимфоциты в условиях культуры клеток. Впервые показано, что при свинцовом производстве в Т-лимфоцитах периферической крови рабочих плавильного и прокатного цехов наблюдается высокий уровень хромосомных аномалий с неслучайным поражением определенных районов хромосом, что сопровождается дисбалансом субпопуляций иммунокомпетентных клеток и нарушением в системе эксцизионной ДНК-репарации Т-лимфоцитов. Впервые в условиях *in vitro* проведена оценка совместного воздействия на Т-лимфоциты солей свинца и цитохалазина В, оказывающего разрушающее

действие на цитоскелет клетки и изменяющего ее плоидность. Показано, что цитохалазин В способен модифицировать кариопатологические последствия токсического действия свинца на Т-лимфоциты периферической крови человека.

Практическая значимость работы. Результаты настоящих исследований расширяют представления о влиянии свинца на иммунокомпетентные клетки человека. Важность исследования определяется возможностью прогнозирования цитологических изменений Т-лимфоцитов у лиц, подвергающихся воздействию свинца. Показано, что поражение Т-лимфоцитов сопровождается изменениями в иммунореактивности организма с одновременным нарушением в активности эксцизионной ДНК-репарации. Это позволяет рекомендовать практическим врачам при обследовании лиц, связанных со свинцовым производством, обращать особое внимание на своевременное выявление и профилактику возможной иммунной патологии, при этом возможен цитологический контроль реабилитации пораженного человека.

Результаты исследований используются при чтении курса общей генетики для студентов лечебных факультетов Сибирского Государственного Медицинского Университета и курсов экологии человека и экологической токсикологии для студентов Томского Государственного Университета.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. К неблагоприятным последствиям воздействия свинца на организм следует отнести нарушения в цитогенетическом аппарате Т-лимфоцитов периферической крови у рабочих свинцового производства, сопровождающиеся появлением клеток с микроядрами, патологиями митоза, хромосомными абберациями, с локализацией аббераций в определенных районах хромосом.

2. Возрастание числа Т-лимфоцитов с нарушениями морфологии и цитогенетическими аномалиями, наблюдаемое у работающих в условиях свинцового производства, сопровождается выраженной Т-иммунодепрессией организма.

3. Хлорид свинца в условиях культуры клеток способствует изменению митотической активности и появлению клеток с кариопикнозом и кариорексисом.

4. В условиях культуры Т-лимфоцитов цитохалазин В, разрушающий цитоскелет клетки и изменяющий ее плоидность, приводит к усилению кариопатологических эффектов хлорида свинца.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на Международной научной школе-конференции студентов и молодых ученых (Абакан, 2003), на юбилейной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых МФСХ (Томск, 2004), на V межвузовской конференции студентов и молодых ученых (Ижевск, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 183 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, описание материала и методов исследования, результаты и их обсуждение), выводов и списка литературы, включающего 328 источников, из которых 139 отечественных и 189 иностранных. Диссертация иллюстрирована 25 таблицами и 31 рисунками.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Анализ Т-лимфоцитов периферической крови в условиях *in vivo* Анализ Т-лимфоцитов периферической крови у рабочих свинцового производства**

Обследованы 26 рабочих литейного производства и 22 рабочих цеха холодного проката Шымкентского свинцового завода (Республика Казахстан). В качестве контроля обследовано 16 здоровых служащих, работающих в непромышленной сфере того же предприятия. Возраст обследуемых составил от 23 до 48 лет. Стаж работы на свинцовом производстве - от 1 года до 10 лет и более. Доноры не подвергались воздействию рентгеновского облучения в течение не менее трех месяцев до проведения цитогенетических исследований.

Кровь для исследования брали из локтевой вены (объем 20-40 мл) при поступлении рабочих и служащих в профилакторий, где они получали физиолечение на протяжении 2-ух недель. Забор крови для анализа проводили в первые 3 дня после поступления в профилакторий. В качестве антикоагулянта использовали гепарин.

Использовались следующие методы (табл 1):

#### 1. Метод изучения соотношения субпопуляций лимфоцитов

Экспрессию мембранных маркеров на лимфоцитах определяли иммунофлюоресцентным методом с помощью моноклональных антител к следующим детерминантам: CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+. В работе использовали моноклональные антитела к дифференцировочным антигенам лимфоцитов производства фирмы "ДиагноТех", г. Москва. Подсчет осуществляли на люминесцентном микроскопе Люмам И-2. Определяли процент и абсолютное число лимфоцитов, несущих определенные детерминанты [Методические рекомендации. Определение субпопуляций лимфоцитов с использованием моноклональных антител методом иммунофлуоресценции, 1996].

#### 2. Определение уровня эксцизионной ДНК-репарации лимфоцитов

Уровень репаративного синтеза, индуцированного УФ-облучением определяли с помощью метода сцинтилляционной радиометрии по включению <sup>3</sup>H-тимидина в общую массу клеток при подавлении репликативного синтеза ДНК гидроксимочевинной [Засухина Г.Д., 1975].

#### 3. Метод культуры тканей *in vitro*

Для культивирования лимфоцитов применяли методику, предложенную Moorhead et al. [Прокофьева-Бельговская А.А., 1969, Захаров А.Ф., 1982,

Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц., 2004]. В нашем исследовании в часть культур за 48 часов до фиксации вводили цитохалазин В в концентрации 0,01 мг/мл, что является стандартной концентрацией, вызывающей блокирование цитокинеза. Цитохалазин В вызывают деполимеризацию актиновых микрофиламентов, препятствуя цитокинезу и приводя к формированию бинуклеарных клеток. Фиксацию материала проводили через 72 часа после начала инкубации. Для окраски полученных препаратов использовали метод окраски препаратов по Нохта-Максимуму (АзурII-эозин). Изучение полученных препаратов проводили с помощью светового микроскопа модели МБИ-6 при увеличении в 1000 раз.

Таблица 1

## Логическая структура диссертационной работы

Методы	Материал – Т-лимфоциты периферической крови человека				
	Работники свинцового производства				Эксперименты на культурах лимфоцитов здоровых доноров, не связанных с производством свинца
	Рабочие плавильного и прокатного цехов		Служащие непромышленной сферы		
	in vivo	эксперименты в условиях in vitro	in vivo	эксперименты в условиях in vitro	эксперименты в условиях in vitro
Метод изучения соотношения субпопуляций лимфоцитов	+		+		
ДНК-репаративный анализ	+		+		
Кариологические методы исследования:					
1. Анализ аномалий интерфазного ядра					
1) Микроядерный тест	+	+	+		+
2) Анализ морфологических изменений интерфазного ядра	+	+			+
2. Хромосомный анализ	+	+	+	+	
Анализ пролиферации	+	+	+	+	+

4. Кариологические методы исследования

#### 4.1. Анализ аномалий интерфазного ядра

##### 4.1.1. Микроядерный тест

Изучали уровень микроядер в культурах бласттрансформированных Т-лимфоцитов человека [Ильинских Н.Н., 1992]. Микроядра в лимфоцитах выглядели при микроскопировании как тёмно-фиолетовые тельца, расположенные рядом с ядром на голубоватом фоне цитоплазмы лимфоцита. Подсчёт числа лимфоцитов с микроядрами производили на 10000 клеток в каждом препарате.

##### 4.1.2. Анализ морфологических изменений ядра

Учитывали следующие виды кариопатологии ядер бласттрансформированных Т-лимфоцитов: кариопикноз, кариорексис и кариолизис [Терентьева Э.И., 1978, Яновский Д.Н., 1969]. Рассматривали также особенности морфологии интерфазных ядер. В зависимости от морфологии ядра клетки относили к различным классам: 1) класс клеток с круглыми ядрами; 2) класс клеток с овальными ядрами; 3) класс клеток с лопастевидными ядрами; 4) класс клеток с ядрами других форм (каплевидные, угловатые, извилистые и т.д.). Кроме того, выделяли классы клеток с гладкой и рифленой поверхностью ядра, а также учитывали видимые в световой микроскоп повреждения оболочки ядра. С каждого препарата анализировалось по 1000 клеток.

#### 5. Анализ пролиферации Т-лимфоцитов

Метод основан на блокировании колхицином митотического деления в метафазе. Колхицин добавляли в культуру за 2 часа до начала фиксации. Проводили расчет митотического индекса:

$$[m] = Nm/N,$$

где Nm – число митозов, N – общее количество клеток.

В работе проводили также расчет митотического индекса, основанный на количестве морфологически интактных клеток. Для расчета митотического индекса анализировалось по 1000 клеток на каждом препарате. Кроме того, учитывали различные виды аномалий митоза.

#### **Экспериментальные воздействия на культуры Т-лимфоцитов**

Изучалось влияние хлорида свинца на культивируемые Т-лимфоциты, полученные от рабочих свинцового производства, а также от служащих непромышленной сферы этого предприятия (более подробное описание см. выше).

Кроме того, было осуществлено исследование влияния свинца на Т-лимфоциты крови здоровых доноров в условиях *in vitro*. Эксперименты проводились на культурах Т-лимфоцитов, полученных от 19 здоровых доноров-добровольцев (13 женщин и 6 мужчин) возрастом 20-25 лет. Во всех случаях это были люди не связанные с производством свинца, жители г. Томска и студенты Сибирского государственного медицинского университета и Томского государственного университета. Доноры не подвергались воздействию рентгеновского облучения в течение не менее трех

месяцев до проведения цитогенетических исследований.

Для приготовления культур лимфоцитов и препаратов использовались методики, описанные ранее. Фиксация материала проводилась через 72 часа после начала инкубации. Отдельно проводилось изучение культур лимфоцитов через 2, 21 и 46 часов культивирования. Для окрашивания препаратов, полученных из культивируемых Т-лимфоцитов крови рабочих свинцового производства, помимо окрашивания по Нохта-Максимову использовали G-окраску хромосом с использованием трипсина [Захаров А.Ф., 1982].

Применяемые концентрации солей были рассчитаны исходя из рекомендованных в качестве биологической ПДК концентраций свинца в крови [Тарасова Л.А., 1998]. Кроме того, предварительно в условиях *in vitro* было проведено титрование солей с определением ТЦД<sub>50</sub>, который составил 0,1 мг/мл. В соответствии с этим применялись следующие концентрации хлорида свинца: 1,0 мг/мл; 0,1 мг/мл; 0,01 мг/мл; 0,001 мг/мл; 0,0001 мг/мл и соответствующие концентрации хлорида натрия.

При культивировании лимфоцитов, полученных от рабочих свинцового производства, использовалась концентрация 0,1 мг/мл.

В части работы, посвященной совместному воздействию на Т-лимфоциты цитохалазина В и хлорида свинца, цитохалазин В добавлялся в культуры за 48 часов до фиксации в концентрации 0,01 мг/мл, что является стандартной концентрацией, вызывающей блокирование цитокинеза, в то время как хлорид свинца вводился в среду во время начала культивирования (за 72 часа до фиксации) в концентрации 0,1 мг/мл.

При изучении лимфоцитов, культивируемых в течение разного времени (2, 21, 46 и 72 часов) использовалась концентрация хлорида свинца, равная 0,1 мг/мл, добавляемая в культуру в начале культивирования. При культивировании лимфоцитов в присутствии и в отсутствие фитогемагглютинина использовалась эта же концентрация  $PbCl_2$ , при этом  $PbCl_2$  добавлялся также в начале культивирования (за 72 часа до фиксации).

Для изучения полученных препаратов использовали микроядерный тест, анализ морфологических изменений ядра, анализ пролиферации Т-лимфоцитов (описаны выше), а также хромосомный анализ.

#### Хромосомный анализ

Проводили подсчет количества хромосом, а также анализ структурных нарушений. На препаратах, полученных из культур Т-лимфоцитов каждого донора и в контроле изучалось по 100 метафазных пластинок.

#### Методы статистической обработки

Статистический анализ и обработка данных проводили с использованием пакета программ Statistica версия 6.0 для Windows. Проверку нормальности распределения признаков проводили с применением Kolmogorov-Smirnov test. Для оценки статистической значимости различий признаков, имеющих нормальное распределение, использовали t-критерий Стьюдента.

Для непараметрических данных расчет проводили по критерию Краскала-Уоллиса.

Для оценки какого-либо признака на препаратах подсчитывали число клеток с данным признаком, а затем определяли индекс - количество клеток с признаком, приходящееся на 1000 клеток:

$$И = \frac{\text{сумма клеток с признаком} \times 100}{\text{сумма клеток без признака}}$$

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Цитогенетический, ДНК-репаративный анализ Т-лимфоцитов и состояние Т- и В-систем иммунитета у рабочих свинцового производства

Изучение уровня лимфоцитов с микроядрами и ДНК-репаративной активности в клетках крови свидетельствуют о том, что у рабочих плавильного и прокатного цехов свинцового производства наблюдаются существенные изменения этих показателей по сравнению с контролем. Так, установлено, что у рабочих при поступлении в профилакторий и при выписке содержание Т-лимфоцитов с микроядрами в периферическом крови было статистически значимо выше, чем у здоровых доноров ( $3,0 \pm 0,2\%$  в начале и  $1,2 \pm 0,1\%$  перед выпиской при  $0,6 \pm 0,1\%$  в контроле; в обоих случаях  $p$  не более  $0,05$ ). Перед выпиской у всех рабочих отмечено снижение показателей микроядерного теста по сравнению с их величиной при поступлении в профилакторий, однако полной нормализации не наблюдалось.

Изучение последствий стимуляции эксцизионной ДНК-репарации УФ-облучением свидетельствует о том, что индекс стимуляции у рабочих свинцового производства статистически значимо ниже наблюдаемого в контроле ( $1,2 \pm 0,22$  при поступлении рабочих в профилакторий,  $1,1 \pm 0,26$  при выписке рабочих из профилактория,  $2,9 \pm 0,42$  в контроле, отличия статистически значимы (при  $p < 0,05$ )). Анализ состояния Т- и В-систем иммунитета показал, что у рабочих свинцового завода наблюдается выраженная Т-иммунодепрессия при одновременной стимуляции В-звена иммунитета. Если у здоровых доноров абсолютное содержание Т-лимфоцитов составило  $1620 \pm 61,7$ , то у рабочих свинцового производства этот показатель был достоверно снижен -  $700 \pm 5,8$  ( $p < 0,01$ ), однако уже перед выпиской число Т-лимфоцитов у рабочих возвращалось к уровню, наблюдаемому в контрольной группе. В то же время следует отметить, что зарегистрированная нормализация происходила в результате резкого возрастания у рабочих общего числа лимфоцитов, поскольку относительный уровень Т-лимфоцитов оставался низким во всех группах обследованных рабочих даже через 3 мес. после их выписки из профилактория.

Изучение уровня Т-хелперов и Т-супрессоров свидетельствует о значительном дисбалансе иммунорегуляторных клеток. Если в норме отношение  $Th/Ts$  составляло  $2,8$ , то у рабочих свинцового производства число Т-хелперов было резко уменьшено (отношение  $Th/Ts$  равно  $0,72$ ) при

сохранявшемся без изменения числе Т-супрессоров. Перед выпиской из профилактория в крови рабочих значительно возросло число Т-супрессоров, при этом нормализации количества Т-хелперов не происходило и отношение Th/Ts оставалось низким при выписке (1,04) и через 3 мес. после нее (0,58).

Корреляционный анализ полученных данных свидетельствует о том, что некоторые показатели иммунореактивности организма тесно связаны с показателями микроядерного теста и ДНК-репаративного синтеза. Так, в начале при поступлении в профилакторий наблюдалась обратная корреляция между числом лимфоцитов с микроядрами и числом Т-лимфоцитов ( $r=-0,67$ ;  $p<0,05$ ), по-видимому, в основном за счет Т-хелперов. Через 3 месяца после выписки рабочих из профилактория регистрировалась прямо пропорциональная зависимость между индексом стимуляции ДНК-репарации и количеством Т-супрессоров ( $r=+0,52$ ), В-лимфоцитов ( $r=+0,52$ ) и Т-хелперов ( $r=+0,53$ ;  $p<0,05$  для всех показателей).

### **Влияние свинца на Т-лимфоциты рабочих свинцового производства и Т-лимфоциты доноров, не связанных со свинцовым производством, в условиях *in vitro***

Установлено, что введение хлорида свинца в культуры Т-лимфоцитов, полученные из крови рабочих свинцового производства, привело к существенным изменениям ядер лимфобластов. Показано, что соль вызвала появление бинуклеаров, лопастных выбросов хроматина, а на поздних сроках (72 часа) появление клеток с множеством гетероморфных ядер. Помимо этого через 72 часа отмечено увеличение практически всех типов регистрируемых патологий интерфазного ядра.

Хлорид свинца вызвал в культуре повышение частоты клеток с микроядрами, а также увеличение частоты встречаемости клеток с различными видами кариопатологии (лопастные ядра, кариорексис, кариопикноз, кариолизис) и нарушениями митоза (отставания хромосом, мосты, слипание хромосом, преждевременное расхождение хроматид, трех- и многополюсные мета- и анафазы, неравнополюсные ана-телофазы) по сравнению с интактной культурой.

Результаты кариометрии в ФГА бласттрансформированных лимфоцитах свидетельствуют о том, что при введении хлорида свинца в культуры клеток наблюдалось постепенное увеличение площади ядер, особенно существенное через 72 часа после введения  $PbCl_2$  (рис. 1).

Через 24 часа после введения соли отмечалось увеличение митотической активности культуры, а через 72 часа – резкое ее падение.

Анализ хромосомного набора в культурах лимфоцитов после введения в них хлорида свинца свидетельствует о существенных изменениях, как в структуре, так и в числе хромосом.

Добавление  $PbCl_2$  в культуры Т-лимфоцитов, полученных как от рабочих свинцового производства, так и от доноров, не связанных со свинцовым производством, привело к достоверному ( $p<0,05$ ) увеличению числа клеток с

хроматидными разрывами. Количество клеток с хромосомными обменами достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличилось лишь при добавлении  $PbCl_2$  в культуры лимфоцитов, полученных от рабочих свинцового производства. Кроме того, хлорид свинца вызвал статистически значимое ( $p < 0,01$ ) повышение количества клеток с измененным числом хромосом. Причем в культурах Т-лимфоцитов, полученных от рабочих свинцового производства, это произошло за счет увеличения количества гипоплоидных и полиплоидных клеток ( $p < 0,05$ ).

Сопоставление величин поражений хромосом и групп хромосом с той долей, которую каждая из хромосом или групп хромосом занимает в общей длине хромосомного набора, показывает, что распределение нарушений по длине хромосом имело неслучайный характер. Чаще, чем ожидалось, поражались хромосомы 1,2,6,9,10,11 и 12. В хромосомах 14-20 наблюдались единичные aberrации, а в 13, 21, 22 и Y ни одного случая поражения хромосомы не зарегистрировано.

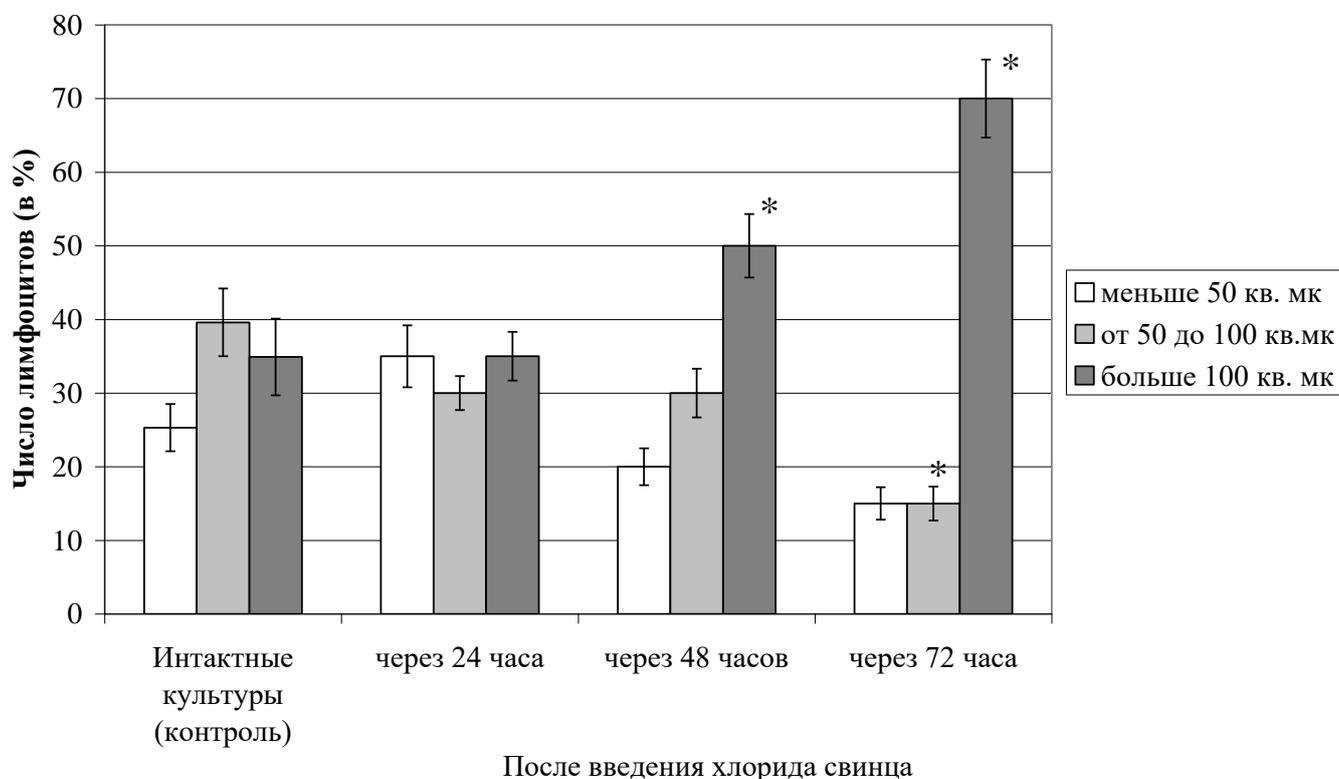


Рис.1 Площадь ядер в стимулированных ФГА культурах лимфоцитов периферической крови, полученных от рабочих свинцового производства, после введения хлорида свинца.

Примечание. Статистически значимые отличия от контроля отмечены звездочкой при  $p < 0,05$ .

### **Дозозависимые изменения митотической активности и морфологии ядер Т-лимфоцитов человека под влиянием свинца в экспериментах в условиях *in vitro***

После добавления в культуру лимфоцитов, полученную от здоровых доноров, не связанных со свинцовым производством, хлорида свинца в концентрации 1 мг/мл, отмечалось статистически значимое ( $p < 0,05$ )

повышение митотического индекса, рассчитанного относительно количества морфологически интактных клеток, с  $2,0 \pm 0,40$  в контроле до  $4,0 \pm 0,82$  в культуре с воздействием свинца (рис. 2). Этого не наблюдалось в культуре с добавлением хлорида натрия в соответствующей концентрации. После добавления в культуру лимфоцитов хлорида свинца в концентрации  $0,1$  мг/мл также отмечалось статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение митотического индекса с  $1,7 \pm 0,27$  в контроле до  $5,5 \pm 2,30$  в культуре с добавлением свинца. При добавлении хлорида натрия увеличения митотического индекса не наблюдалось. Статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение митотического индекса характерно также для культур лимфоцитов с добавлением хлорида свинца в концентрации  $0,01$  мг/мл (с  $1,7 \pm 0,27$  в контроле до  $4,7 \pm 1,30$  в культуре с добавлением хлорида свинца). Введение хлорида натрия в соответствующей концентрации значимо не повлияло на значение митотического индекса. При воздействии на культуру лимфоцитов хлорида свинца в концентрации  $0,001$  мг/мл также произошло статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение митотического индекса с  $2,3 \pm 0,10$  в контроле до  $7,6 \pm 1,72$  в культуре со свинцом. При добавлении  $PbCl_2$  в концентрации  $0,0001$  мг/мл повышения митотического индекса не наблюдалось ( $2,1 \pm 0,24$  в контроле и  $2,5 \pm 1,65$  в культуре с хлоридом свинца).

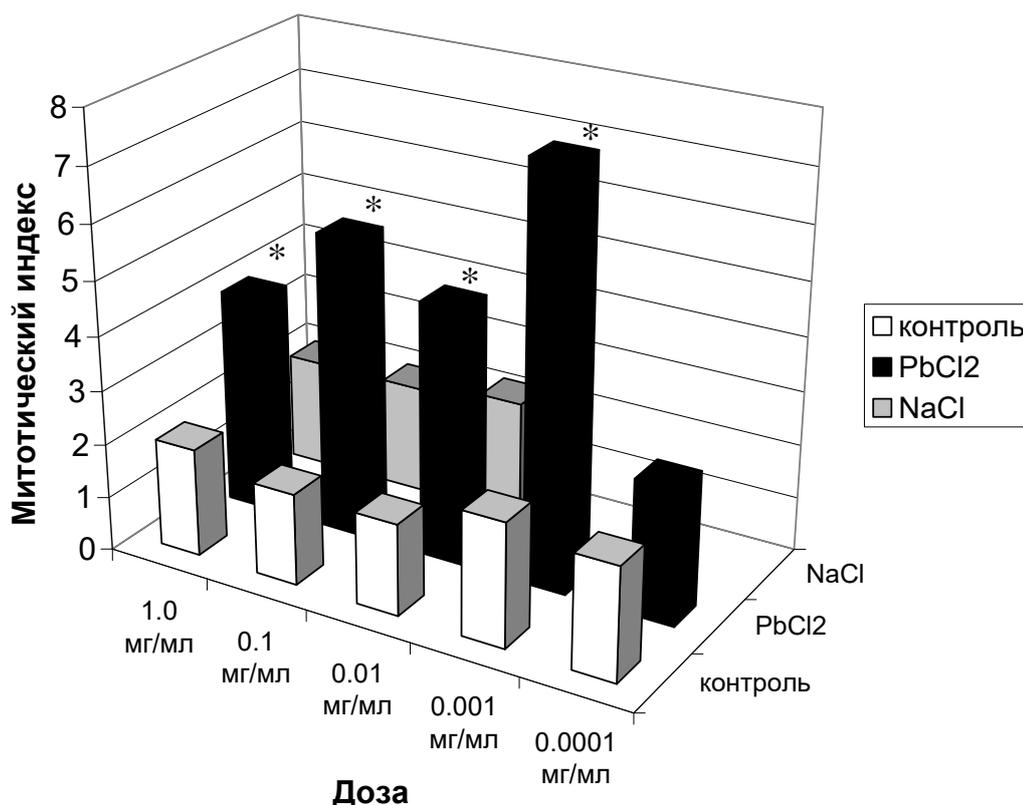


Рис. 2 Частота митозов после воздействия различных доз  $PbCl_2$  и  $NaCl$  на культуры ФГА-бласттрансформированных Т-лимфоцитов здоровых доноров. Примечание. Статистически значимые отличия от контроля отмечены звездочкой при  $p < 0,05$ .

Ни одна из рассмотренных концентраций хлорида свинца и хлорида

натрия не вызвала значимого изменения частоты бинуклеарных клеток.

Хлорид свинца в концентрации 1 мг/мл не оказал заметного воздействия на частоту клеток с кариорексисом. Хлорид натрия в соответствующей концентрации вызвал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение количества клеток с кариорексисом с  $7,2 \pm 1,82$  в контроле до  $19,5 \pm 3,98$  в культуре с добавлением этой соли. Хлорид свинца и хлорид натрия в концентрациях 0,1 мг/мл и 0,01 мг/мл не вызвали статистически значимых изменений этого показателя.  $PbCl_2$  в концентрации 0,0001 мг/мл вызвал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение этого показателя с  $2,5 \pm 1,89$  в контроле до  $0,2 \pm 0,05$  в культуре с добавлением соли.

Добавление в культуру лимфоцитов хлоридов свинца и натрия в концентрации 1 мг/мл не вызвало значимого изменения частоты клеток с пикнотическими ядрами. Хлорид свинца в концентрации 0,1 мг/мл вызвал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты клеток с кариопикнозом с  $56,8 \pm 3,96$  в контроле до  $76,1 \pm 6,77$  в культуре после воздействия  $PbCl_2$ . Хлорид натрия не оказал заметного воздействия на данный показатель.  $PbCl_2$  в концентрациях 0,01 мг/мл и 0,0001 мг/мл значимо не повлиял на частоту клеток с кариопикнозом. Хлорид натрия также не вызвал значимых изменений.

Число клеток с кариопикнозом и кариорексисом после воздействия на культуру лимфоцитов хлоридом свинца в концентрациях 1 мг/мл и 0,1 мг/мл статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличилось. Хлорид натрия не вызвал подобного эффекта. После добавления в культуру лимфоцитов  $PbCl_2$  в концентрации 0,01 мг/мл выявлено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты клеток с кариопикнозом и кариорексисом с  $59,2 \pm 4,96$  в контроле до  $76,0 \pm 5,54$  в культуре с добавлением свинца. При добавлении в культуру хлорида натрия данный показатель также статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличился с  $59,2 \pm 4,96$  в контроле до  $77,2 \pm 8,01$  в культуре с добавлением  $NaCl$ .

Хлорид свинца в концентрации 0,001 мг/мл вызвал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты клеток с кариорексисом и кариопикнозом с  $59,2 \pm 4,51$  в контроле до  $81,5 \pm 5,51$  в культуре с добавлением этой соли. Добавление в культуру хлорида свинца в концентрации 0,0001 мг/мл не вызвало статистически значимого изменения этого показателя. Ни одна из доз изучаемых солей не вызвала значимых изменений количества клеток с кариолизисом.

Учитывалась также частота клеток, имеющих ядра с поврежденными оболочками, видимыми в световой микроскоп, в частности, с экстрезиями хроматина. При добавлении в культуру лимфоцитов хлорида свинца в концентрации 0,01 мг/мл исследуемый показатель статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снизился с  $1,0 \pm 0,32$  в контроле до  $0,6 \pm 0,39$  в культуре с добавлением соли. Статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение данного показателя наблюдалось также при добавлении в культуру хлорида свинца в

концентрации 0,0001 мг/мл ( $1,1 \pm 0,35$  в контроле и  $0,1 \pm 0,10$  в культуре с добавлением соли). Все остальные рассмотренные концентрации хлоридов свинца и натрия не вызвали достоверных изменений.

Ни одна из исследованных концентраций хлорида свинца и натрия не вызвала значительных изменений в содержании клеток с микроядрами.

После добавления в культуру лимфоцитов хлорида свинца в концентрации 1 мг/мл не произошло значимого изменения частоты клеток, имеющих ядра с разными типами поверхности (при тотальном анализе). Хлорид натрия вызвал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты клеток с ядрами, имеющими гладкую поверхность с  $7,9 \pm 1,09$  в контроле до  $13,1 \pm 2,25$  в культуре с добавлением хлорида свинца, а также недостоверное ( $p > 0,05$ ) уменьшение частоты клеток с ядрами, имеющими рифленую поверхность с  $23,3 \pm 2,82$  в контроле до  $15,3 \pm 2,68$  в культуре с добавлением соли. Хлорид свинца в концентрации 0,1 мг/мл не оказал заметного воздействия на количество клеток, имеющих ядра с гладкой поверхностью ( $7,9 \pm 1,09$  в контроле и  $8,3 \pm 3,06$  в культуре с добавлением соли), и вызвал статистически незначимое ( $p > 0,05$ ) уменьшение количества клеток, имеющих ядра с рифленой поверхностью с  $23,3 \pm 2,82$  в контроле до  $14,1 \pm 4,83$  в культуре с добавлением соли. Хлорид свинца в концентрациях 0,01 мг/мл, 0,001 и 0,0001 мг/мл значимо не повлиял ни на один из показателей. Это относится и к хлориду натрия.

При добавлении в культуру лимфоцитов хлорида свинца в концентрации 1 мг/мл не произошло значимого изменения частоты клеток, имеющих ядра с гладкой и рифленой поверхностью (при выборочном анализе морфологически интактных клеток). Хлорид натрия вызвал достоверное изменение обоих показателей – частоты клеток с гладкими и рифлеными ядрами. Частота клеток с гладкими ядрами ( $p < 0,001$ ) увеличилась с  $28,6 \pm 4,08$  в контроле до  $53,4 \pm 3,17$  в культуре с добавлением соли. Частота клеток с рифлеными ядрами ( $p < 0,05$ ) уменьшилась с  $71,0 \pm 4,07$  в контроле до  $44,9 \pm 2,84$  в культуре с добавлением соли. Хлорид свинца и хлорид натрия в остальных изученных концентрациях не вызвали значимых изменений.

Под влиянием хлорида свинца и хлорида натрия не произошло изменений частоты клеток с ядрами разной морфологии (при тотальном анализе препаратов). Хлорид натрия в концентрации 1 мг/мл вызвал статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты клеток с круглыми ядрами ( $14,6 \pm 1,12$  в контроле и  $21,8 \pm 3,47$  в культуре с добавлением хлорида натрия) в культурах Т-лимфоцитов (при выборочном анализе морфологически интактных клеток). Все остальные изучаемые концентрации хлоридов свинца и натрия не вызвали достоверных изменений изучаемых показателей.

#### **Влияние сроков инкубации с солями свинца на состояние ядер лимфоцитов периферической крови человека в условиях культуры**

В культурах лимфоцитов, полученных из крови здоровых доноров, не связанных со свинцовым производством, фиксацию которых проводили через

46 часов после начала инкубации (при выборочном анализе морфологически интактных клеток), наблюдалось статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты митозов с  $2,1 \pm 0,24$  в контроле до  $4,5 \pm 1,75$  в культуре с добавлением свинца (в концентрации 1 мг/мл). В культурах лимфоцитов, фиксацию которых проводили через 72 часа после начала инкубации, также наблюдалось достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты митозов с  $2,0 \pm 0,40$  в контроле до  $4,0 \pm 0,82$  в культуре с добавлением соли. Хлорид натрия не вызвал подобного эффекта.

Под влиянием хлорида свинца и хлорида натрия не произошло достоверных изменений частоты бинуклеарных клеток на всех сроках фиксации.

После добавления хлорида свинца и хлорида натрия не отмечалось значимых изменений содержания клеток с кариорексисом в культурах лимфоцитов, фиксацию которых проводили через 2 и 21 часа после начала инкубации. Через 46 часов культивирования с хлоридом свинца произошло статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты клеток с кариорексисом с  $3,6 \pm 0,32$  в контроле до  $16,6 \pm 3,23$  в культуре с добавлением свинца. Хлорид натрия не вызвал подобного эффекта. Через 72 часа культивирования не отмечалось достоверных изменений данного показателя. Хлорид натрия вызвал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты клеток с кариорексисом с  $7,2 \pm 1,82$  в контроле до  $19,5 \pm 3,98$  в культуре с добавлением этой соли.

Не обнаружено достоверных изменений в содержании клеток с кариопикнозом на всех сроках фиксации.

В культурах лимфоцитов, фиксацию которых проводили через 2, 21 и 46 часов после начала инкубации, не обнаружено значимых изменений количества клеток с кариорексисом и кариопикнозом после воздействия хлоридом свинца и хлоридом натрия. В культурах лимфоцитов, фиксацию которых проводили через 72 часа после добавления хлорида свинца, выявлено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение количества клеток с кариорексисом и кариопикнозом с  $65,5 \pm 3,49$  в контроле до  $76,0 \pm 3,52$  в культуре с добавлением свинца. Хлорид натрия вызвал статистически недостоверное изменение этого показателя.

Добавление хлорида свинца и хлорида натрия не вызвали достоверных изменений в содержании клеток с кариолизисом на всех сроках фиксации.

Не выявлено статистически значимых отличий в содержании клеток с измененной поверхностью ядра, а также клеток с микроядрами, в культурах разного возраста после добавления в них хлоридов свинца и натрия. В культурах лимфоцитов, фиксацию которых проводили через 2, 21 и 46 часов после начала инкубации, не выявлено значимых изменений частоты клеток с ядрами, имеющими гладкую и рифленую поверхность (при тотальном анализе препаратов) после воздействия хлоридами свинца и натрия. В культуре возрастом 72 часа хлорид свинца также не вызвал значимых изменений.

Хлорид натрия вызвал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение количества клеток с ядрами, имеющими гладкую поверхность с  $7,9 \pm 1,09$  в контроле до  $13,1 \pm 2,25$  в культуре с добавлением хлорида натрия.

В культурах лимфоцитов через 2, 21 и 46 часов культивирования под воздействием изучаемых солей не произошло значительных изменений в количестве клеток, имеющих ядра с гладкой и рифленой поверхностью (при выборочном анализе морфологически интактных клеток). В культурах через 72 часа культивирования хлорид свинца не вызвал статистически значимых изменений, в то время как хлорид натрия вызвал достоверное изменение частоты встречаемости в культуре клеток с ядрами, имеющими гладкую поверхность - она ( $p < 0,05$ ) увеличилась (с  $28,6 \pm 4,08$  в контроле до  $53,4 \pm 3,17$  в культуре с добавлением соли).

При тотальном анализе культур не выявлено статистически значимых отличий частоты клеток с ядрами различной морфологии в культурах с  $PbCl_2$  и  $NaCl$ , фиксированных на разных сроках после начала культивирования. При выборочном анализе морфологически интактных клеток в культурах возрастом 2, 21 и 46 часов статистически значимых отличий также не выявлено. В культуре возрастом 72 часа только хлорид натрия вызвал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение количества клеток с круглыми ядрами с  $14,6 \pm 1,12$  в контроле до  $21,8 \pm 3,47$  в культуре с добавлением хлорида натрия.

#### **Кариопатологические изменения Т-лимфоцитов после воздействия хлоридом свинца на фоне введения цитохалазина В**

При выборочном анализе морфологически интактных клеток, выяснилось, что в культуре с добавлением цитохалазина В произошло статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты встречаемости митозов с  $2,8 \pm 0,76$  в контроле до  $7,7 \pm 2,86$  в культуре с добавлением хлорида свинца. В культуре лимфоцитов без добавления цитохалазина В также произошло статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение данного показателя с  $2,0 \pm 0,40$  в контроле до  $4,0 \pm 0,82$  в культуре с добавлением хлорида свинца. Кроме того, обнаружилось статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты встречаемости митозов в культуре с добавлением хлорида свинца и цитохалазина В по сравнению с культурой с добавлением хлорида свинца, но без цитохалазина В ( $7,7 \pm 2,86$  в культуре с добавлением  $PbCl_2$  и цитохалазина В и  $4,0 \pm 0,82$  в культуре с добавлением  $PbCl_2$ , но без цитохалазина В).

В культуре лимфоцитов без добавления цитохалазина В под влиянием хлорида свинца не произошло значимого изменения частоты бинуклеарных клеток. В интактной культуре под влиянием цитохалазина В произошло статистически значимое ( $p < 0,001$ ) увеличение количества бинуклеарных клеток с  $0,3 \pm 0,11$  в контроле без добавления цитохалазина В до  $4,9 \pm 1,45$  в контроле с добавлением цитохалазина В. В культурах лимфоцитов с добавлением хлорида свинца наблюдался подобный эффект, но разница была менее значительна ( $p < 0,01$ ). В культуре с  $PbCl_2$  и без цитохалазина В -

0,3±0,14, с добавлением PbCl<sub>2</sub> и с цитохалазином В - 2,3±1,20.

В культуре лимфоцитов с добавлением цитохалазина В и хлорида свинца частота клеток с кариорексисом оказалась статистически значимо ( $p < 0,05$ ) выше (19,9±12,98), чем в культуре с добавлением цитохалазина В, но без добавления PbCl<sub>2</sub> (1,3±0,40). В культуре без добавления цитохалазина В не выявлено статистически значимых отличий. Значимо ( $p < 0,05$ ) отличались по данному показателю культура с добавлением цитохалазина В (без PbCl<sub>2</sub>) и культура без добавления цитохалазина В (без PbCl<sub>2</sub>) (с цитохалазином В - 1,3±0,40, без цитохалазина В - 7,2±1,82).

В культуре лимфоцитов с добавлением цитохалазина В под влиянием хлорида свинца произошло статистически значимое ( $p < 0,01$ ) увеличение количества клеток с кариопикнозом и кариорексисом (64,3±7,04 в контроле и 92,6±2,11 в культуре после воздействия PbCl<sub>2</sub>). В культуре без добавления цитохалазина В число клеток с кариопикнозом и кариорексисом после воздействия хлоридом свинца также статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличилось (с 65,5±3,49 в контроле до 76,0±3,52 в культуре с добавлением свинца). Частоты встречаемости клеток с кариопикнозом и кариорексисом статистически значимо ( $p < 0,01$ ) отличались в культурах с добавлением хлорида свинца и цитохалазина В (92,6±2,11) и с добавлением хлорида свинца, но без цитохалазина В (78,3±5,07).

При учете клеток с кариолизисом, клеток с измененной поверхностью ядра, а также клеток с микроядрами значимых отличий в изучаемых культурах не обнаружено.

В результате тотального анализа препаратов выяснилось, что в культуре с цитохалазином В под влиянием хлорида свинца не произошло значительных изменений в содержании клеток, имеющих ядра с гладкой поверхностью. Количество клеток, имеющих ядра с рифленой поверхностью под влиянием PbCl<sub>2</sub> значительно ( $p < 0,05$ ) уменьшилось (с 28,2±6,08 в контроле до 4,9±2,02 в культуре с добавлением PbCl<sub>2</sub>). В культуре без добавления цитохалазина В значимых отличий не обнаружено. В культуре с добавлением цитохалазина В и хлорида свинца частота клеток, имеющих ядра с рифленой поверхностью оказалась статистически значимо ( $p < 0,05$ ) ниже (4,9±2,02), чем в культуре с добавлением хлорида свинца, но без цитохалазина В (15,3±2,68). При выборочном анализе морфологически интактных клеток в культуре с добавлением цитохалазина В и хлорида свинца по сравнению с культурой с цитохалазином В и без хлорида свинца наблюдалось значимо ( $p < 0,05$ ) большее содержание клеток, имеющих ядра с гладкой поверхностью (19,9±5,75 в контроле и 49,0±8,97 в культуре с PbCl<sub>2</sub>), а также значимо ( $p < 0,05$ ) меньшее содержание клеток, имеющих ядра с рифленой поверхностью (80,1±5,75 в контроле и 51,0±8,97 в культуре с PbCl<sub>2</sub>) (см. табл.29). В культурах без добавления цитохалазина В не обнаружено статистически значимых отличий.

В культурах с добавлением цитохалазина В под влиянием хлорида свинца статистически значимо ( $p < 0,05$ ) уменьшилось содержание клеток,

имеющих овальные ядра (с  $30,7 \pm 6,00$  в контроле до  $5,9 \pm 1,38$  в культуре с добавлением  $PbCl_2$ ) (проводился тотальный анализ). В культуре без добавления цитохалазина В под воздействием хлорида свинца не произошло значительных изменений. При сравнении культуры с  $PbCl_2$  и добавлением цитохалазина В и культуры с  $PbCl_2$  без добавления цитохалазина В, выяснилось, что в культуре с цитохалазином В доля клеток, имеющих круглые ядра ( $p < 0,05$ ) меньше ( $0,7 \pm 0,23$ ), чем в культуре без него ( $3,5 \pm 0,62$ ). Это относится и к содержанию клеток с овальными ядрами ( $p < 0,05$ ) ( $5,9 \pm 1,38$  в культуре с цитохалазином В и  $20,5 \pm 3,09$  в культуре без него). При выборочном анализе морфологически интактных клеток выяснилось, что цитохалазин В вызвал в контрольной культуре статистически значимое ( $p < 0,05$ ) уменьшение количества клеток с круглыми ядрами ( $14,6 \pm 1,12$  в культуре без цитохалазина В и  $8,3 \pm 1,44$  в культуре с цитохалазином В), значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение доли клеток с овальными ядрами ( $82,3 \pm 2,73$  в культуре без цитохалазина В и  $90,4 \pm 1,55$  в культуре с цитохалазином В), а также значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты клеток с лопастными ядрами ( $2,9 \pm 0,55$  в культуре без цитохалазина В и  $12,2 \pm 4,68$  в культуре с цитохалазином В).

**Кариопатологические изменения в стимулированных и нестимулированных фитогемагглютинином Т-лимфоцитах, при воздействии хлоридом свинца в условиях *in vitro***

В культурах без добавления ФГА митотическая активность во всех случаях равнялась нулю, что статистически значимо ( $p < 0,01$ ) отличало эти культуры от культур с добавлением ФГА.

Частота бинуклеарных клеток в культурах лимфоцитов без добавления ФГА во всех случаях также равнялась нулю.

В культурах лимфоцитов, стимулированных ФГА, не выявлено отличий в содержании клеток с кариопикнозом. В культурах лимфоцитов, не стимулированных ФГА, наблюдалась подобная картина. Отличия отмечены в контрольных культурах, стимулированных ФГА и не стимулированных этим агентом. В контрольной культуре без добавления ФГА частота клеток с кариопикнозом статистически значимо ( $p < 0,05$ ) выше ( $78,8 \pm 9,97$ ), чем в контрольной культуре с добавлением ФГА ( $58,4 \pm 3,06$ ). Подобная закономерность обнаружена и в культурах лимфоцитов после воздействия на них хлоридом натрия. Число пикнотических клеток также значимо ( $p < 0,05$ ) выше в культуре с хлоридом натрия без добавления ФГА ( $76,7 \pm 8,15$ ), чем в культуре с хлоридом натрия с добавлением ФГА ( $54,6 \pm 6,79$ ).

В культуре с добавлением ФГА под влиянием хлорида свинца не произошло значимого изменения числа клеток с кариорексисом. Хлорид натрия вызвал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение числа клеток с кариорексисом ( $7,2 \pm 1,82$  в контроле и  $19,5 \pm 3,98$  в культуре с добавлением этой соли). В культуре, не стимулированной ФГА, значительных изменений данного показателя не обнаружено. В культуре без добавления ФГА после

воздействия хлоридом свинца количество клеток с кариорексисом статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличилось ( $30,3 \pm 6,75$ ) по сравнению с культурой с добавлением ФГА после воздействия хлоридом свинца ( $13,0 \pm 3,25$ ). В контрольных культурах и в культурах с добавлением хлорида свинца этот показатель не отличался.

В культуре лимфоцитов с добавлением ФГА количество клеток с кариопикнозом и кариорексисом после воздействия хлоридом свинца статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличилось с  $65,5 \pm 3,49$  в контроле до  $78,3 \pm 5,07$  в культуре с добавлением свинца. Хлорид натрия вызвал статистически незначимое повышение данного показателя. В культурах лимфоцитов без добавления ФГА не наблюдалось значимых отличий.

В культурах лимфоцитов, стимулированных ФГА, не обнаружено отличий в содержании клеток с кариолизисом. В культурах без ФГА под влиянием хлорида свинца произошло статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение частоты клеток с кариолизисом с  $0,1 \pm 0,07$  в контроле до  $1,8 \pm 0,49$  в культуре с добавлением хлорида свинца. Хлорид натрия не вызвал подобного эффекта.

В культурах лимфоцитов, стимулированных ФГА, статистически значимых отличий в содержании клеток с изменениями оболочки ядра не обнаружено. В культурах лимфоцитов без добавления ФГА под воздействием хлорида свинца произошло статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение количества клеток, имеющих ядра с измененной оболочкой с  $4,7 \pm 0,58$  в контроле до  $8,8 \pm 1,96$  в культуре с добавлением хлорида свинца. Хлорид натрия не оказал подобного эффекта. В интактной культуре лимфоцитов, не стимулированной ФГА, исследуемый показатель оказался статистически значимо ( $p < 0,05$ ) выше ( $4,7 \pm 0,58$ ), чем в интактной культуре, стимулированной ФГА ( $1,6 \pm 0,47$ ). В культурах с добавлением хлорида свинца наблюдалась подобная закономерность ( $p < 0,05$ ) – в культуре с добавлением ФГА и хлорида свинца -  $1,4 \pm 0,70$ , без добавления ФГА с хлоридом свинца -  $8,8 \pm 1,96$ . Данный показатель также оказался достоверно ( $p < 0,05$ ) выше в культуре без ФГА с добавлением хлорида натрия ( $5,9 \pm 1,19$ ), чем в культуре с ФГА с добавлением хлорида натрия ( $0,3 \pm 0,10$ ).

В анализируемых культурах не обнаружено отличий в содержании клеток с микроядрами.

## ВЫВОДЫ

1. В периферической крови рабочих предприятия по производству свинца наблюдается достоверное увеличение числа клеток с цитогенетическими нарушениями и снижение активности эксцизионной ДНК-репарации по сравнению с лицами, занятыми в непромышленной сфере этого предприятия.

2. Установлено, что в периферической крови рабочих свинцового

производства по сравнению с контролем достоверно повышается число Т-лимфоцитов с кариопатологией, что сопровождается существенными изменениями соотношения субпопуляций иммунокомпетентных клеток.

3. Хлорид свинца при введении в культуры Т-лимфоцитов периферической крови, полученной от рабочих предприятия по производству свинца, вызывает резкое увеличение размеров интерфазных ядер, частоты митозов, количества клеток с нарушениями в числе и структуре хромосом, микроядрами, кариопикнозом и кариорексисом, а также бинуклеарных лимфоцитов. В аналогичном эксперименте с культурами Т-лимфоцитов крови здоровых доноров кариопатологический эффект свинца проявляется в меньшей степени.

4. В культурах Т-лимфоцитов периферической крови, полученной от рабочих свинцового производства, после введения хлорида свинца отмечено преимущественное поражение определенных районов хромосом, в основном 1,2,6,9,10,11 и 12, при этом практически отсутствуют нарушения в хромосомах 13, 21, 22 и Y.

5. Биологически активные вещества – фитогемагглютинин и цитохалазин В способны модифицировать cito- и кариопатологические последствия интоксикации культуры Т-лимфоцитов хлоридом свинца.

#### Список опубликованных по теме диссертации работ

1. Романова М.С. Влияние солей свинца на лимфоциты человека/ М.С. Романова// Экология Южной Сибири и сопредельных территорий: Материалы Международной научной школы-конференции студентов и молодых ученых 26-29 ноября 2003 г. в г. Абакане. – Абакан, 2003. – С. 45.

2. Цитологические изменения в культурах лимфоцитов человека, зараженных вирусом Эпштейна-Барр/ О.Н. Олонова, М.С. Романова, Л.Е. Мозгунова и др.// Актуальные проблемы медицины и биологии. – Томск, 2003. – С.135-136.

3. Романова М.С. Влияние хлорида свинца на ядерный аппарат лимфоцитов человека в условиях *in vitro*/ М.С. Романова// Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: Сб. научных работ – Томск, 2004.- Т. 3, №1. – С.61-62.

4. Романова М.С. Воздействие хлорида свинца на клетки культуры лимфоцитов периферической крови человека/ М.С. Романова// Эколого-экономические проблемы природопользования: Материалы юбилейной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых МФСХ 15 апреля 2004 г. в г. Томске. – Томск: Дельтаплан, 2004. - С. 47-53.

5. Романова М.С. Свинец как фактор экологического неблагополучия/ М.С. Романова// Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: Сб. научных работ – Томск, 2004. – Т. 4, №1. - С. 60-62.

6. Романова М.С. Изменения ядерной морфологии, возникающие под воздействием хлорида свинца в культурах Т-лимфоцитов, полученных от рабочих свинцового производства и здоровых доноров, не связанных со

свинцовым производством/ М.С. Романова, А.Г.Семенов, Н.Н. Ильинских// Естествознание и гуманизм: Сб. научных работ – Томск, 2005. – Т. 2, № 4. - С. 45.

7. Романова М.С. Микроядерный тест в определении генотоксичности хлорида свинца/ М.С. Романова, А.Г. Семенов, Н.Н. Ильинских// Бюллетень сибирской медицины. Приложение 1. – 2005. – Т. 4. - С. 131.

8. Романова М.С. Патогенное воздействие хлорида свинца на Т-лимфоциты человека/ М.С. Романова, А.Г. Семенов// Актуальные вопросы биологии и медицины: Материалы II межрегиональной межвузовской научной конференции молодых ученых и студентов 25-28 апреля 2005 г. в г. Ижевске – Ижевск: АНК, 2005. – С.6-8.

9. Романова М.С. Кариопатологические изменения в бинуклеарных и моноклеарных Т-лимфоцитах человека, подвергнутых воздействию цитохалазином В и солями свинца в условиях *in vitro*/ М.С. Романова, Н.Н. Ильинских, А.Г. Семенов// Бюллетень сибирской медицины. – Томск, 2005. – Т. 4, № 4. - С. 59-63.

10. Романова М.С. Влияние продолжительности воздействия хлорида свинца на степень кариопатологических изменений и митотический индекс в культурах Т-лимфоцитов человека/ М.С. Романова, А.Г. Семенов, Н.Н. Ильинских// Биология человека как основа профилактической медицины: Сб. научных трудов науч.-практ. конференции, посвященной 70-летию НГМУ и 100-летию со дня рождения профессора Н.М. Власенко, 10-11 ноября 2005 г. – Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 2006. – С. 49-50.