

М.А. Крижова, Н.Л. Сивидицька, О.Ю. Лихонька
ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

МОРФОЛОГІЧНІ ТА МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ У ТКАНИНАХ СІМ'ЯНИКІВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

У експерименті на білих щурах моделювали хронічну інтоксикацію введенням пестициду 2,4-ДА впродовж 30 діб. Введення пестициду викликало активацію процесів ВРПО ліпідів у крові та сім'яниках. При морфологічних дослідженнях виявлене порушення гістоструктури тканин сім'яників: зміни елементів генеративного епітелію та судин мікроциркуляторного русла, зниження кількості сперматозоїдів, порушення стратифікації сперматогенного епітелію, явища запалення в інтерстиції, яке має вільнорадикальний механізм. Це слугує підставою подальшого дослідження застосування препаратів з антиоксидантною дією для профілактики морфофункціональних змін при тривалому надходженні пестициду 2,4-ДА.

Ключові слова: пестициди, антиоксиданти, вільно радикальне перекисне окислення ліпідів.

Робота є фрагментом планової наукової-дослідної роботи „Дослідження специфічної фармакологічної активності біологічно-активних речовин рослинного походження; № держреєстрації 0101V001130.

Зростаюче збільшення кількості хімічних сполук, які використовують у промисловості, сільському господарстві, медицині та побуті створює принципово нову, небезпечну екологічну ситуацію для суспільства та оточуючих його флори та фауни. Не останнє місце серед екологічних забруднювачів займають засоби хімічного захисту сільськогосподарських культур: щорічна кількість пестицидів, які використовують в Україні, становить близько 270 найменувань [8, 11]. Здатність пестицидів та агрохімікатів к циркуляції в об'єктах довкілля (вода, ґрунт) та їх наявність в сільськогосподарській продукції обумовлює можливість їх хронічного негативного впливу на живий організм. Багато діючих речовин пестицидів, насамперед хлорорганічних сполук, важких металів володіють здібністю до матеріальної кумуляції – накопиченню в біосередовищах людини. Пестициди – єдині небезпечні речовини, які свідомо вносяться людиною до навколишнього середовища; їх накопичення у продовольчих продуктах у залишкових кількостях, вищих за максимально дозволені, пов'язане зі техногенним забрудненням довкілля, зниженою агротехнічною культурою та порушенням агрохімічних технологій [6]. На даний час перелік пестицидів, які використовуються для захисту сільськогосподарських рослин нараховує декілька сотень сполук, що випускаються в вигляді тисяч препаративних форм [14]. Непрофесійне використання пестицидів може призвести до шкідливого впливу на організм людей, які контактують з ними та на тих, що вживають продукти, оброблені пестицидами [7]. Пестициди є метаболічними отрутами та, в першу чергу, оказують мембранопшкоджуючу дію [2, 5]. При хронічних хімічних навантаженнях виникають системні зміни функціонального стану на всіх рівнях інтеграцій – тобто синдром екологічно зумовленого зниження резистентності організму. Результатом цього є ефект хімічної модифікації, тобто збільшення числа і погіршення перебігу захворювань різноманітних органів на тлі зниження імунних показників і порушення захисно-адаптаційних можливостей [10]. Одним з найбільш поширених пестицидів, що застосовується в сільському господарстві є похідні 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти, а саме амінна сіль 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти (2,4-ДА). Більшість пестицидів цієї групи відносяться до малотоксичних засобів зі середньо вираженими кумулятивними властивостями - при щоденному введенні 1/10 LD₅₀ коефіцієнт кумуляції дорівнює 1-2 [2, 10]. Але при довготривалому контакті з пестицидами, особливо при порушенні техніки безпеки та недотриманні заходів індивідуального захисту можуть виникати морфофункціональні зміни різних органів та систем [1, 13], що, на думку деяких авторів, зумовлено активацією вільнорадикального перекисного окислення (ВРПО) ліпідів.

Метою роботи було дослідження метаболічних та морфологічних змін у тканинах сім'яників щурів при хронічному надходженні пестициду 2,4-ДА.

Матеріал та методи дослідження. Експеримент проведено на 2 групах щурів-самців лінії Вістар вагою 190-210 г. 20 щурів склали інтактну групу, яка протягом експерименту утримувалася в умовах віварію по 5 тварин в клітках (1 група). 20 щурів-самців 2-ї групи протягом 30 діб отримували внутрішньошлунково пестицид 2,4-ДА в дозі 120 мг/кг. Евтаназію щурів здійснювали під гексеналовим наркозом (50мг/кг маси тіла) шляхом забору крові з серця до його зупинки. Проводилася оцінка загальносоматичних показників - ваги, стану шерсті, рухливості, біохімічні та морфологічні дослідження тканин сім'яників. В крові визначали рівень спонтанного гемолізу еритроцитів (СГЕ), для чого досліджували фізико-хімічні властивості еритроцитів при інкубації в фосфатному буфері (рН – 7,4) на протязі 4 годин при температурі 37⁰С. Рожева окраска, яка реєструється, обумовлена гемоглобіном еритроцитів, внаслідок перекисного окислення фосfolіпідів мембран, що дозволяє судити про забезпеченість мембран еритроцитів гідрофобними антиоксидантами АО [12]. Рівень ВРПО оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів [3], принцип метода базується на їх властивості поглинати світлове випромінювання в ультрафіолетовому відрізку спектра та за рівнем продуктів, що реагують із 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реактанти) [4]. Принцип оснований на здібності маленового діальдегіду

реагувати із ТБК з утворенням триметинового комплексу, який має рожеву окраску, інтенсивність окраски пропорційнальна концентрації ТБК-реактивів.

Шматочки сім'яників для морфологічних досліджень відділяли за допомогою леза та послідовно фіксували в 2% розчині глютарового альдегіду та 1% розчині OsO_4 , обезводнювали, а потім заключали в епон-812. З полімеризованих блоків виготовляли полутонкі зрізи за допомогою ультрамікротому УМТП-4. Потім їх фарбували метиленовим синім та досліджували за допомогою мікроскопу МБІ-15 [8].

Результати дослідження та їх обговорення. Хронічне надходження пестициду 2,4-ДА щурам-самцям обумовило зміни загальносоматичних показників: тварини 2 групи повільно набирали вагу (з 180,0 до 189,0, $p < 0,1$), в них знизився апетит, спостерігалась агресивність, кваліть, тьмяна, волога шерсть, її значне випадіння. За час проведення експерименту загинуло 3 тварини.

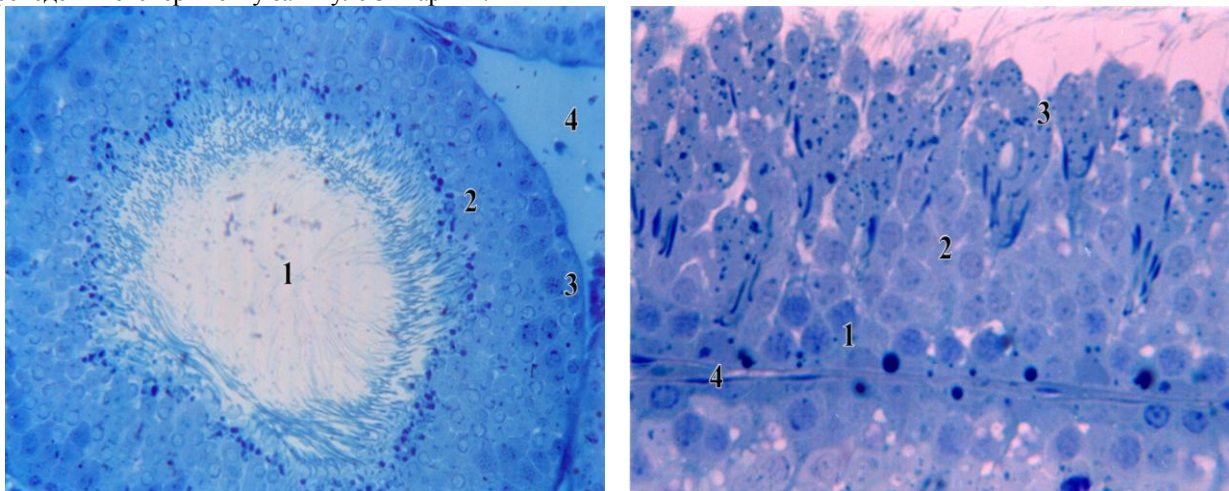


Рис. 1. Сім'яники інтактних щурів. Напівтонкий зріз. Заб. метиленовим синім: а) об $9\times$ ок. $20\times$; 1 – сперматогонія; 2 – сперматоцит ІІ; 3 – сперматиди; 4 – капіляр; б) об $10\times$ ок. $20\times$; 1- просвіт канальця; 2 - сперматиди; 3 - сперматогонії; 4 - набряк інтерстицію.

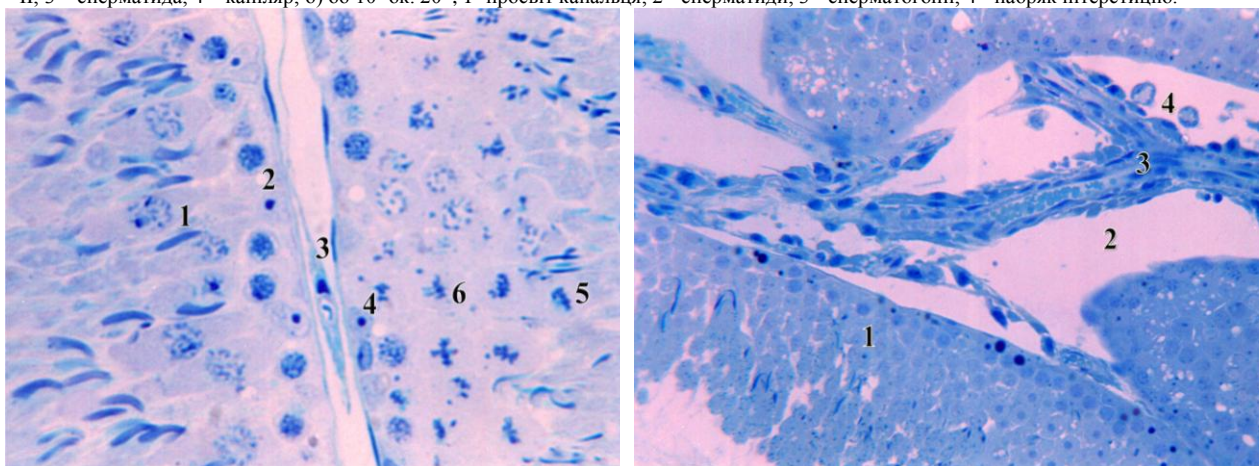


Рис. 2. Зиготий сім'яний каналець щурів 2 групи (введення 2,4-ДА). Напівтонкий зріз. Заб. метиленовим синім: а) об $40\times$ ок. $10\times$; 1 - сперматоцит І; 2 – сперматогонія В; 3 – інтерстиціальний фібробласт; 4 – сперматогонія А; 5 – сперматоцит ІІ; 6 – фігура мітозу; б) об $20\times$ ок. $10\times$; 1 – стінка канальця; 2 – набряк інтерстиція; 3 – явище повнокров'я у мікросудинах; 4 - інтерстиціальні клітини

Гістологічні дослідження тканини сім'яників у щурів інтактної групи виявило типові риси структури органу. Паренхіма сім'яника утворена сукупністю звивистих, прямих сім'яних канальців та канальців сітки. Тонкі сполучнотканинні перетинки розділяють сім'яник на дольки. У кожному сім'янику число часточок дорівнює до 200. На вершині дольки виті канали перетворюються на прямі та утворюють сітку сім'яника. Основну масу паренхіми органа складають сім'яні виті канали, в яких розвиваються чоловічі статеві клітини – сперматозоїди. Стінку сім'яного каналу утворює оболонка, яка складається з 3 шарів: внутрішнього – базального, середнього - м'якого та зовнішнього – волокнистого. До базального шару прилягає базальна мембрана епітелію – сперматогенного шару, у складі якого визначається дві популяції клітинних елементів – підтримуючі клітини (суспендоцити, клітини Сертолі) та сперматогонні клітини на різних стадіях диференціювання (рис. 1).

При морфологічному дослідженні тканин сім'яників у щурів на тлі введення пестициду 2,4-ДА протягом 30 днів виявляються структурні порушення. На поперекових зрізах сім'яних канальців визначаються ділянки відшарування базальної мембрани від базального шару стінки. В ядрах сперматогоній мітотичні фігури практично не зустрічаються (рис. 2).

Пошарове розташування клітин сперматогенного епітелію у більшості випадків порушене за рахунок появи багатьох щілиноподібних ділянок просвітлення, які відділяють окремі групи клітин. У сперматоцитах фігури мітозу практично відсутні, у багатьох сперматидях ядра не відзначаються. У міжчасточкових сполучнотканинних шарах спостерігається підвищення гідратації, у периваскулярних просторах знаходяться малочислені лімфоцити, серед яких зустрічаються плазмоцити. У просвіті кровоносних мікросудин визначається скупчення еритроцитів, місцями з явищами сладж-феномену. Морфологічні зміни у тканинах сім'яників прямо корелюють з рівнем ВРПО ліпідів: встановлено прямий кореляційний зв'язок між рівнем ТБК-реактивних порушеннями мітотичної активності сперматогенного епітелію, $r=+0,82$; присутній також кореляційний зв'язок між рівнем дієвих кон'югатів та змінами типовою структурою клітин сперматогенного епітелію: $r=+0,80$.

Дискусія

Проведені дослідження свідчать, що хронічне введення пестициду 2,4-ДА призводить до змін загальносоматичних та біохімічних показників, а саме: у щурів прогресувало випадіння шерсті, знижувалась рухлива активність, апетит, підвищилася агресивність. Біохімічні дослідження свідчать за активізацію процесів ВРПО ліпідів у крові та тканинах сім'яників – зростає рівень дієвих кон'югатів та вміст ТБК-реактивних порушеннями мітотичної активності сперматогенного епітелію, $r=+0,82$; присутній також кореляційний зв'язок між рівнем дієвих кон'югатів та змінами типовою структурою клітин сперматогенного епітелію: $r=+0,80$.

Проведені морфологічні дослідження свідчать, що тривале введення пестициду 2,4-ДА до порушення гістоструктури тканин сім'яників: виявлені зміни елементів генеративного епітелію та судин мікроциркуляторного русла, різко знизилась кількість сперматозоїдів, порушена стратифікація сперматогенного епітелію, спостерігаються явища запалення в інтерстиції.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження біохімічних показників і морфологічних змін у щурів, які отримували пестицид 2,4-ДА та виявлені кореляційні зв'язки дозволили припустити, що токсичне пошкодження гістоструктури тканин сім'яників мають вільнорадикальні механізми. Це може стати підставою для подальшого дослідження застосування препаратів з антиоксидантною дією для профілактики морфофункціональних змін при тривалому надходженні пестициду 2,4-ДА.

Література

1. Абелгузіна Р. Р. Исследование влияния производных 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на систему крови / Р. Р. Абелгузіна, С. И. Имельбаева // Пат. физиология и эксп. терапия. – 2004. - № 2. – С. 20-22.
2. Бобирьов В.М. Показники вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів у щурів при хронічному надходженні пестициду – аміної солі 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти / Бобирьов В.М., Цветкова Я.А. // Актуальні проблеми сучасної медицини. – Полтава. – 2005. - №1-2. – С. 6-9.
3. Воскресенський О.М., Дельва В.А., Дудченко М.А. Методи діагностики метаболічних порушень при атеросклерозі та диференційоване застосування препаратів з антиатеросклеротичною дією: Методическі рекомендації. – Полтава. – 1982. – 26 с.
4. Гаврилов В. Б. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Л. М. Мажуль // Вопросы мед. химии. – 1987. – Т. 33, № 1. – С. 188-122.
5. Геращенко С. Б. Морфо-функціональний стан гепатоцитів під впливом пестициду 2,4-Д / С. Б. Геращенко, О. І. Дельцова, Г. Б. Кулинич // Вісник проблем біології і медицини. – 2006. – Вип. 2. – С. 196-198.
6. Загрязнение пестицидами территории Российской Федерации как потенциальная опасность для здоровья населения / В. И. Чибураев, Я. Г. Двоскин, И. В. Брагина [и др.] // Гигиена и санитария. – 2003. - № 3. – С. 68-71.
7. Кірсенко В. В. Методичні підходи до гігієнічної оцінки умов праці при застосуванні пестицидів в сучасних умовах / В. В. Кірсенко, Т. А. Яструб // Довкілля і здоров'я. - 2004. - № 4(31). - С. 51-55.
8. Костиленко Ю. П. Методы работы с полутонкими эпоксидными срезами в гистологической практике / Ю. П. Костиленко, Е.В. Ковалев // Арх. анат. -1978. -№ 12. – С. 68-72.
9. Онищенко Г. Г. Гигиенические аспекты обеспечения экологической безопасности при обращении с пестицидами и агрохимикатами / Г. Г. Онищенко // Гигиена и санитария. - 2003. - № 3. - С. 3-6.
10. Пестициды: Справочник / [Мартыненко В. И., Промоненко В. К., Кукаленко С. С. и др.] – М.: Агропромиздат, 1992. – 368 с.
11. Проданчук М. Г. Методологічні підходи до оперативної екогігієнічної оцінки асортименту та обсягів застосування пестицидів у сільському господарстві / М. Г. Проданчук, В. І. Великий, Ю. А. Кучак // Довкілля та здоров'я. - 2004. - №2. - С. 75-78.
12. Спиричев В.В., Матиус И.И., Кронштейн Л.М. Витамин Е // Экспериментальная витаминология. Минск: Наука и техника. – 1979. – С. 18-57.
13. Цветкова Я.А. Метаболічні та морфологічні зміни в організмі експериментальних тварин при хронічному надходженні аміної солі 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти / Цветкова Я.А., Костиленко Ю.П. // Світ медицини та біології. – 2010. - №1. – С. 67-70.
14. An immunochromatographic assay of 2,4-dichlorophenylacetic acid and simazine using monoclonal antibodies labeled with colloidal gold / I. A. Lyubavina, A. A. Zinchenko, I. S. Salomatina [et al.] // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2004. – Vol. 30, № 2. – P. 178-183.

Резюме

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ СЕМЕННИКОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Цветкова Я.А., Свинцицкая Н.Л., Тихонова О.А.

В эксперименте на белых крысах вводили пестицид 2,4-ДА на протяжении 30 суток. Введение пестицида вызывало активацию процессов ВРПО липидов в крови и семенниках. При морфологических исследованиях обнаружено нарушение гистоструктуры тканей семенников, которое имеет свободнорадикальный механизм. Это служит основанием последующего исследования препаратов с антиоксидантным действием при длительном поступлении пестицида 2,4-ДА.

Ключевые слова: пестициды, антиоксиданты, свободнорадикальное перекисное окисления липидов.

Стаття надійшла 8.06.2011 р.

MORPHOLOGICAL AND METABOLIC CHANGES ARE IN FABRICS OF CIM'ЯНИКІВ OF EXPERIMENTAL RATS AT THE TERMS OF CHRONIC INTOXICATION

Cvetkova J.A., Svincicka N.L., Tikhonova O.O.

In experiment the pesticide 2,4-DA in dose 1/10 from LD₅₀ was administered white rats during of 30 days. The activation of the processes FRPO of lipids exists under influence of the chronic administered of the pesticide 2,4-DA in blood and in tissues of testis. At morphological researches found out violation of structure of testis, which has a free-radical mechanism. This investigation is basis for research of agents with antioxidant activity at chronic intoxication of 2,4-DA.

Key words: pesticides, antioxidant, free radical peroxide oxygenation of lipids.

УДК 615.828.3:547.828.3

О.М. Шорбак, І.Х. Кудрява, В.В. Ісаєвич, Т.О. Волков
ДН «Інститут мікробіології та біології ім. І.І. Мечнікова АМН України», м. Харків

ЧУТЛИВІСТЬ ДРІЖДЖЕПОДІБНИХ ГРИБІВ РОДУ CANDIDA ДО НОВИХ ПОХІДНИХ 4Н-ПІРИДО [4',3':5,6]ПІРАНО [2,3-D]ПІРИМІДИНУ

За допомогою методу двократних серійних розведень встановлена висока антифунгальна активність похідних 4Н-піридо [4',3':5,6]пірано [2,3-d]піримідину щодо музейних та клінічних штамів грибів роду *Candida*. Результати дослідження свідчать про перспективність подальшого вивчення властивостей похідних 4Н-піридо [4',3':5,6]пірано [2,3-d]піримідину з метою створення на їх основі ефективних засобів для профілактики та лікування захворювань грибкової етіології.

Ключові слова: похідні 4Н-піридо[4',3':5,6]пірано[2,3-d] піримідину, гриби роду *Candida*, протигрибкова активність.

Робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Протимікробна активність новосинтезованих конденсованих нітрогеновмісних сполук та перспективи створення на їх основі профілактичних і лікувальних засобів» АМН 99/2011.

Серед найпоширеніших збудників мікозів одне з провідних місць займають умовно-патогенні дріжджеподібні гриби роду *Candida* [1, 4, 9]. Вони обумовлюють широкий діапазон інфекцій - від захворювань шкіри та слизових оболонок, що не загрожують життю, до інвазивних процесів, з ушкодженням внутрішніх органів [1, 3, 9]. Відомо, що найчастішим збудником кандидозу у людини є *Candida albicans* [4], що залишається головним патогеном при орофарингеальному та шкіряному кандидозі [1, 4, 5]. В той же час, non-*albicans* різновиди *Candida* все частіше стають етіологічним чинником при інвазивному кандидозі [1, 8]. За останні два десятиріччя гриби роду *Candida* стали одним з головних опортуністичних мікроорганізмів, які викликають нозокоміальні інфекції [8], та знаходяться на четвертому місці серед мікроорганізмів, які виділяють із крові хворих при септичних станах [1, 8]. Дріжджеподібні гриби роду *Candida* є збудниками 15% внутрішньолікарняних інфекцій. Більш ніж 72% усіх нозокоміальних мікозів становлять кандидози [1].

Найбільш широко у лікуванні різних клінічних форм кандидозу застосовують азольні протигрибкові препарати [1, 3, 4, 6, 9]. В останні роки *C. albicans* залишаються досить чутливими до флуконазолу, але, у зв'язку із широким застосуванням цього препарату з профілактичною метою, накопичені численні дані щодо виділення від хворих резистентних до нього штамів *C. albicans* [1, 8, 9]. Окрім того, збільшення частоти виділення видів *Candida* non-*albicans* із властивою їм зниженою чутливістю до азолів, створює нові терапевтичні проблеми [1]. Вважається, що резистентність *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* або частини цих штамів може бути генетично детермінована [7]. У зв'язку зі зміною спектру збудників кандидозу та появою штамів *Candida*, стійких до лікарських препаратів, що найбільш широко застосовуються, виникає необхідність пошуку нових стратегічних підходів [1, 9]. У даному аспекті все більшої актуальності набуває створення нових антимікотиків, які не матимуть структурної подібності до вже існуючих протигрибкових препаратів.