

ДОСЛІДЖЕННЯ ГОНАДОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЦИПРОКОНАЗОЛУ НА САМЦЯХ І САМИЦЯХ ЩУРІВ W1STAR HAN

ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки
імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України» (м. Київ)

kolyanchuk.yana@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота виконана в рамках НДР ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України» за темою «Наукове обґрунтування сучасних нормативних вимог до застосування пестицидів і агрохімікатів: прогнозування віддалених ефектів дії (канцерогенної, мутагенної, тератогенної активності, репродуктивної токсичності, хронічних інтоксикацій)», № державної реєстрації 0108U007458.

Вступ. Основним завданням превентивної токсикології є запобігання шкідливому впливу ксенобіотиків, що надходять в організм людини з різних об'єктів навколишнього середовища. Такими об'єктами можуть служити продукти харчування, харчові добавки та вода, забруднені залишковими кількостями хімічних засобів захисту рослин. В усьому світі використовуються синтетичні пестициди, кількість яких швидко зростає за останні п'ятдесят років завдяки інтенсифікації сільського господарства. Вирішення цієї проблеми зводиться до мінімізації забруднення пестицидами, а також до оцінки ризику їх застосування, яка неможлива без адекватної і надійної ідентифікації небезпеки хімічних сполук, як показали кілька недавніх досліджень [1,2].

Репродуктивне здоров'я людини є однією з основних проблем в галузі здоров'я, що свідчить про зниження рівня репродуктивного здоров'я чоловічої статі та збільшення кількості безплідних чоловіків [2]. Глобальна величина проблеми відображена в тому, що кожен рік 60-80 мільйонів пар виявляють безпліддя і це підкреслює необхідність проведення досліджень у цій галузі для вивчення стану репродуктивного здоров'я та впливу екологічних андрогенів, що відзначено у роботах Шепельської Н.Р. та Моклячук Л.І. із співавторами (WHO 1996) [2,3].

Ідентифікація небезпеки репродуктивної токсичності пестицидів є однією з найактуальніших в процесі оцінки ризику їх застосування. У зв'язку з цим методологія дослідження репродуктивної та гонадотоксичності, зокрема, є детермінуючим фактором в отриманні релевантних даних. Bolognesi С. та Naharashi Т. [4,5] розглянули та проаналізували оцінку ризиків, які ґрунтуються на отриманих результатах досліджень від батьківського покоління та потомства, що охоплюють всі етапи онтогенезу.

Хоча деякі пестициди викликають репродуктивну токсичність на високих дозах у моделях тварин, несприятливі наслідки для здоров'я людей важко оцінити [2, сб.1]. Деякі фунгіциди, як відомо, порушують

ендокринні системи і може призвести до вад репродуктивної функції та розвитку плоду. Ряд пестицидів, таких як вінклозолін, дикофолу, атразин та інші, відносяться до важливих класів хімічних речовин, що руйнують ендокринну систему, які, як відомо, перешкоджають синтезу, транспорту, зв'язуванню, дії, елімінації природних гормонів в організмі, які відповідалі за підтримання гомеостазу, регулювання процесів розвитку та обміну речовин, про що стверджує ряд авторів [6-9].

Деякі фунгіциди впливають на відтворення різних механізмів дії, ендокринні порушення: екзогенні речовини перешкоджають нормальному процесу відтворення та розвитку [10,11]. У чоловіків нормальна репродуктивна функція передбачає взаємодію гіпоталамо-гіпофізарного зв'язку з гонадами та щитовидної залози. У самок збільшується концентрація естрогенів, що можуть впливати на функцію яєчників через порушення механізму зворотного зв'язку в гормональному ланцюзі.

В статті Nidhi Mathur та ін. [9,12] розповідає про оцінку тератогенних ефектів трьох триазольних фунгіцидів (триадимефон, тебуконазол, ципроконазол) на ембріонах щурів. Ця робота вказує на те, що випробувані триазоли володіли тератогенною активністю у гризунів та викликали аномалії розвитку.

Наприклад, феноаримол, прохлораз та хлоратолоніл викликають безпліддя у самців та самиць щурів через інгібування ферментів, які беруть участь в метаболізмі стероїдів, зміні сексуальної диференціації через антагонізм рецепторів андрогенів. Склад авторів із Suresh С. [13] показав, що фунгіцид вінклозалін викликає ендокринно-модулюючі ефекти у плодів самців, після експозиції під час останнього триместру вагітності. Виявлені морфологічні зміни статевих органів, зменшення аногенітальної відстані та інші пороки розвитку у нащадків.

З експериментальних досліджень було зроблено висновок, що фунгіциди можуть порушувати процеси розмноження і розвитку у обох статей через вплив на ендокринні сигнали в організмі, непрямої вплив під час пренатального або раннього постнатального життя. Такі ефекти при розвитку плоду можуть бути незворотними, як вказує у своєму методологічному підході RefD.B. із співавторами [14].

Тому метою даної роботи було ідентифікувати небезпеку і оцінку ризику гонадо- та репродуктивної токсичності впливу п'яти генеричних пестицидів ципроконазолів різних виробників та концентрацій на самців і самиць щурів Wistar Han та порівняти отримані дані.

Об'єкт і методи дослідження. Для вивчення гонадо- та репродуктивної токсичності синтетичного триазольного фунгіциду ципроконазолу (ЦИП) було проведено дослідження п'яти генеричних активних діючих речовин пестициду різних виробників. Чистота досліджуваних сполук становила: С1-95 %, С2-95.48 %, С3-95.8 %, С4-95.98 % та С5-96.3 %. В дослідженнях використовували самців та самиць щурів лінії Wistar Han масою 80-100 г. Тварини були отримані з SPF розплідника ДП „Науковий токсикологічний центр імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України”. Адаптаційний період продовжувався п'ять днів. Протягом цього часу проводили щоденні спостереження за їх фізіологічним станом для виявлення ознак патологій. Щури рандомізувались за масою тіла. При значному відхиленні від середньої маси тварин вибраковували. Паралельно з контрольними і піддослідними тваринами утримувались інтактна група самиць для спарювання.

Для кожної тестової субстанції ЦИП, тварини були розподілені на три групи по 20 самців щурів в кожній. Експериментальним тваринам вводилась тестова субстанція *extempore* щодня, окрім суботи і неділі, внутрішньошлунково за допомогою зонду двом групам тварин в дозах 0,2 та 2 мг/кг маси тіла протягом 10-11 тижнів самцям та 9-10 тижнів самицям. Контрольна група самців та самиць отримувала дистильовану воду з емульгатором (ОП-10) в еквівалентних кількостях. Розчини вводили із розрахунку 0,5 мл на 100 грам маси тіла тварин. Для корекції об'єму розчину, що вводився, відповідно до збільшення маси тіла тварини щотижня зважувалися.

Дослідження на тваринах проведені згідно до вимог та положень Комісії з етики медичних та біологічних досліджень «Наукового центру превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України» та «Європейської конвенції про захист тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 18.03.1986) ETS №123, “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (National Academies Press, USA, 2011) [15,16].

Умови утримання тварин: тварини були розміщені в конвенційному віварії. Кімната була забезпечена примусовою вентиляцією (12 об'ємів в годину), яка виключала рециркуляцію повітря. Температура і відносна вологість повітря реєструвалися щодня, коливання температури 19 до 24°C, вологості – від 30 до 70%. Освітлення було штучним, цикл 12 годин «день-ніч».

Забезпечення водою: тварини отримували деіонізовану, незаражену УФ-опроміненням і очищену зворотним осмосом, фільтровану питну воду *adlibitum* з пластикових пляшок об'ємом 0,5 літра через металеві наконечники.

Раціон: упродовж всього експерименту щури отримували *adlibitum* збалансований гранульований корм зі зниженим вмістом природних фітоестрогенів виробництва Альтромін (Німеччина).

Тип кліток і кількість тварин в клітці: тварини були розміщені в клітках типу М4 впродовж усього періоду досліджень. Корпус клітки (40x30x15 см) виготовлений з міцного пластмасового матеріалу, згори накритий металевими з'ємними решітками.

Підстилка з стерилізованого, не хлорованого харчового паперу змінювалася 1 раз на тиждень.

Ознаки загальнотоксичної дії: усіх тварин упродовж усього періоду дослідження обстежували з метою реєстрації будь-яких видимих ознак реакції на дію сполуки, що вивчалася.

Маса тіла: піддослідних тварин зважували щотижня протягом усього періоду експозиції. Інтактних самиць зважували на 0 та 20 день вагітності. Піддослідних та контрольних тварин зважували на 0, 6, 13 і 20 дні *postcoitum*.

Естральний цикл. Упродовж останніх 2-х тижнів періоду експозиції у піддослідних самиць щодня брались вагінальні мазки з метою визначення тривалості всього естрального циклу, частоти і циклічності його окремих стадій. Мазки також робили з першого дня підсаджування інтактних самців до піддослідних самиць для визначення моменту спарювання.

Морфо-функціональні показники стану сім'яників: після закінчення терміну експозиції з піддослідних груп відбирали 10 самців розподілених по масі, які піддавалися дослідженню морфо-функціонального стану статевих залоз. Визначали загальну кількість сперматозоїдів і кількість спермій, що рухаються та кількість аномальних сперматозоїдів. Підрахунок проводили мікроскопічно у 20 великих квадратах камери Горяєва.

Процедура спарювання: після запланованого періоду експозиції ЦИП, 10 піддослідних самців з кожної групи спарювали з інтактними самицями, а піддослідні самиці злучалися з інтактними самцями (в співвідношенні 1 самець до 2 самиць). Кожен ранок протягом періоду спарювання брались вагінальні мазки для кожної самиці, які досліджували на наявність сперматозоїдів. День знайдення спермій у вагінальному вмісті самиці приймалися за 0 день вагітності. Після встановлення факту спарювання самицю відсаджували в окрему клітку і припиняли взяття мазків. Тривалість періоду спарювання не перевищувала 3-х тижнів.

Прекоітальний інтервал: визначали час, що пройшов від моменту підсаджування самців до самиць до встановлення факту запліднення. Значення прекоітального інтервалу вираховується за формулою:

$$\Sigma(\text{День періоду спарювання}) \cdot (\text{к-ть самиць, спарених в цей день})$$

Загальна кількість спарених самиць

Показники репродуктивної здатності: на 20-й день вагітності у контрольних, піддослідних та інтактних самиць, спарених з піддослідними самцями вивчали репродуктивні показники: загальну кількість жовтих тіл в яєчниках; кількість місць імплантації; кількість резорбованих зародків і плодів; кількість мертвих та живих плодів; наявність грубих аномалій розвитку; середню масу плодів; загальну масу приплоду.

Термінальні дослідження: піддослідні та інтактні самці після закінчення періоду спарювання виводилися з експерименту. Всіх самиць, які завагітніли, піддавали евтаназії на 20-й день вагітності, а спарених, але не вагітних самиць, на 20-й день припустимої вагітності.

Самиць, у яких впродовж 3-х тижнів спарювання факт запліднення так і не був зареєстрований, у разі

відсутності явних ознак вагітності розтинали і досліджували. Евтаназія тварин здійснювалась за допомогою CO₂-камери.

Макроскопія: усі піддослідні тварини, що розтиналися в ході експерименту, піддавалися макроскопічному обстеженню. Реєстрували виявлені зміни і відхилення. Сім'яники і придатки від 10 піддослідних і контрольних самців виділяли і зважували.

Здатність до спарювання і плодючість: для кожної групи і статі тварин були визначені індекси спарювання, зачаття, фертильності та вагітності за наступними формулами:

$$\begin{aligned} \text{Індекс спарювання} &= \frac{\text{кі-сть спарених самоць}}{\text{кі-сть, що спарювалась}} \times 100 \\ \text{Індекс зачаття} &= \frac{\text{кі-сть, що завагітніли}}{\text{кі-сть спарених самоць}} \times 100 \\ \text{Індекс фертильності} &= \frac{\text{кі-сть, що завагітніли}}{\text{кі-сть, що спарювалась}} \times 100 \\ \text{Індекс вагітності} &= \frac{\text{кі-сть, самоць з живими плодами}}{\text{кі-сть, що завагітніли}} \times 100 \end{aligned}$$

Статистична оцінка: статистична різниця між групових відмінностей ($P < 0,05$) оцінювалась за допомогою ANOVA.

Дослідження проведені згідно стандартних операційних процедур «Наукового центру превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України», розроблених у відповідності до рекомендацій та вимог Належної лабораторної практики (GLP).

Результати дослідження та їх обговорення. Досліджувані тестові субстанції ЦИП у всіх вивчених дозах не впливали на загальний фізіологічний стан піддослідних самців і не викликали їх смертності.

У групі самців мінімальної дози 0,2 мг/кг за дії всіх п'ятьох тестових субстанцій достовірних змін динаміки маси тіла не спостерігалось впродовж всього терміну експозиції. Після впливу максимальної дози 2 мг/кг, тільки С2 проявив загальнотоксичний ефект: зафіксовано вірогідне зниження маси тіла піддослідних тварин в порівнянні з контрольною групою починаючи з 2-го і до 10-го тижня експозиції на 4.9 %, 5.3 %, 5.7 %, 6.7 %, 6.4 %, 6.5 %, 6.4 %, 6.1%, 6.1%, відповідно (**рис. 1**).

Всі п'ять тестових субстанцій в максимальній дозі в дослідженні на самцях володіли репродуктивною токсичністю та мали виражену антиандрогенну дію,

що проявилась змінами морфо-функціональних показників стану статевих залоз (**рис. 2**):

- вірогідне зменшення кількості рухливих сперматозоїдів при дії С1-С5 на 15.6 %, 28.2%, 30.3 %, 32.3 %, 27.5 %, відповідно;

- достовірне зниження відсотка рухливих сперматозоїдів у С1-С5 на 12.9 %, 17 %, 20.8 %, 23.7 %, 12.6 %, відповідно;

- вірогідне зменшення загальної кількості сперми для С2-С5 на 13 %, 12.3 %, 12.1 %, 17.9 %, відповідно;

- відмічене значне вірогідне збільшення патологічних форм спермій при дії С1(на 134 %) та С3 в 4,5 рази.

Тестові субстанції в дозі 2 мг/кг проявили шкідливий вплив на фертильність самоць, яку оцінювали за показниками стану репродуктивної функції завагітнівших від них інтактних самоць. Зміни їх репродуктивних показників представлені у **таблиці 1** засвідчують:

- вірогідне зниження кількості жовтих тіл в яєчниках на 9.7 % при дії С3;

- достовірне збільшення кількості (на 88.2 %) та відсотка (на 143.9 %) преімплантаційної загибелі ембріону за дії С1 та кількості (на 134.4 %) і відсотка (142.9 %) постімплантаційної загибелі плодів після впливу С5;

- достовірне зменшення кількості живих плодів та маси приплоду на 16.24 %, 16.2 %, відповідно;

- вірогідне зниження середньої маси тіла плодів на 6.7 % при дії С2.

Досліджувані тестові субстанції ЦИПу всіх вивчених дозах не впливали на загальний фізіологічний стан піддослідних самоць і не викликали їх смертності.

У групі самоць мінімальної дози за дії всіх тестових субстанцій достовірних змін динаміки маси тіла не спостерігалось впродовж всього терміну експозиції. Після впливу максимальної дози С1, С4 та С5 також не проявили загальнотоксичний ефект. У той час як у самоць, котрі отримували С2 було відзначено вірогідне зниження динаміки маси тіла з 6 по 9 тижні експозиції на 5.4 %, 6.7 % та 7.5 %, відповідно. Впродовж вагітності самоць приріст маси тіла залишався вірогідно нижчим в порівнянні з контролем (**рис. 1**): на 0-й день вагітності (на 10.1 %), 6-й (на 8.8 %), 13-й (на 8.2 %) і 20-й (на 7.2 %). При дії С3 було відмічене вірогідне зменшення динаміки маси тіла лише на 20-й день вагітності самоць на 4.6 %. З вище

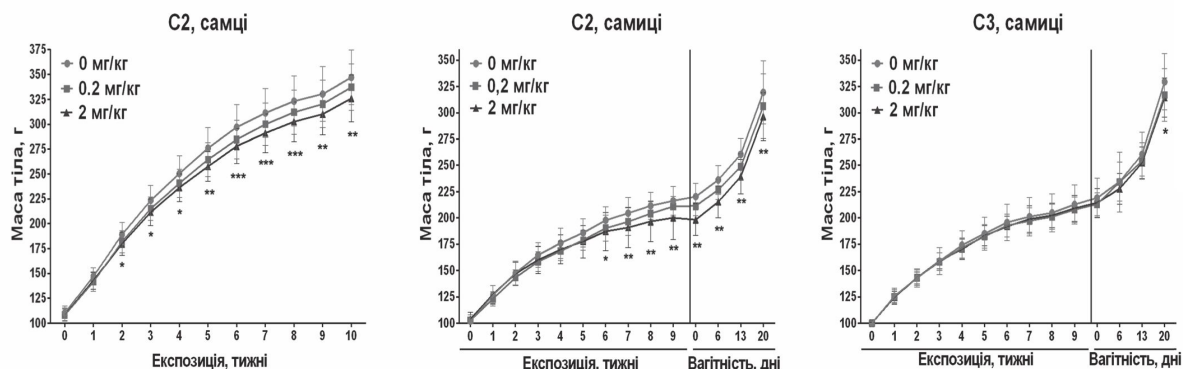


Рис. 1. Динаміка маси тіла самців та самоць щурів в період експозиції, а також під час вагітності самоць.
Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ порівняно з відповідним контролем.

описаного можна припустити, що тільки С2 та С3 володіли загальнотоксичним ефектом.

При дослідженні естрального циклу у самиць, які отримували ЦІП в максимальній дозі, зафіксовані наступні достовірні зміни:

- при дії С4 зниження тривалості естрального циклу та стадії дієструс на 8.9 % і 28.7 %, відповідно;
- збільшення тривалості стадії дієструс на 24.3 % за дії С2 та на 16 % після впливу С5;

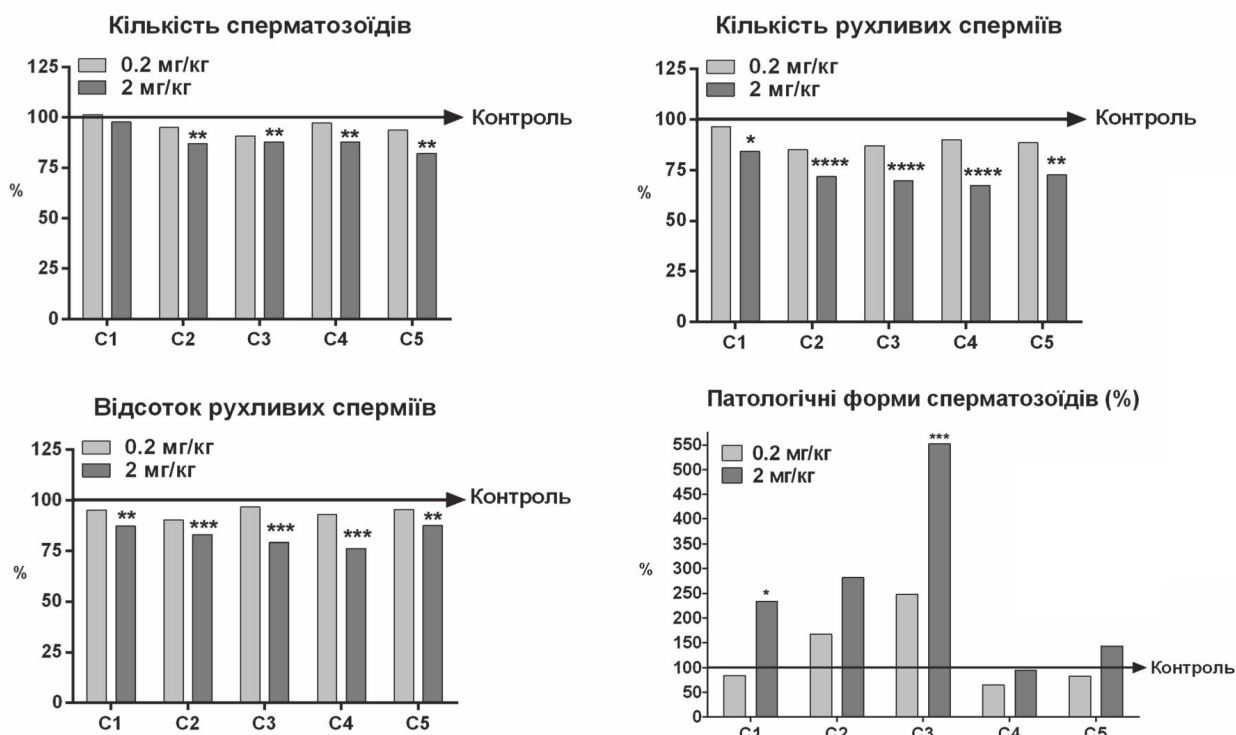


Рис. 2. Загальні морфо-функціональні показники сперми самців (зміни представлені у відсотках від контролю). Примітка: * – P≤0,05; ** – P≤0,01; *** – P≤0,001; **** – P≤0,0001 порівняно з відповідним контролем.

Таблиця 1.

Репродуктивні показники інтактних самиць

Тестові субстанції	Дози, мг/кг	Середня к-сть жовтих тіл (M ± m)	Середня к-сть живих плодів (M ± m)	Преймплантаційна загибель зародків		Постімплантаційна загибель зародків, плодів		Загальна маса приплоду, г (M ± m)	Середня маса плодів, г (M ± m)
				К-сть (M ± m)	% (M ± m)	К-сть (M ± m)	% (M ± m)		
C1	0	14,8±0,5	11,7±0,5	1,7±0,3	11,3±1,9	1,5±0,3	9,5±2,2	43,8±1,7	14,8±0,5
	0.2	14,6±0,4	11,1±0,4	2,45±0,5	16,1±3,2	1,0±0,3	6,9±2,1	43,0±1,6	14,6±0,4
	2	15,5±0,5	11,6±0,6	3,2±0,5**	20,6±3,4*	0,8±0,2	4,8±1,4	43,6±2,4	15,5±0,5
C2	0	12,7±0,4	11,0±0,6	1,2±0,4	10,1±3,2	0,5±0,2	3,6±1,4	40,9±2,0	3,7±0,0
	0.2	13,7±0,4	11,8±0,5	1,4±0,3	9,6±2,4	0,5±0,2	4,0±1,6	42,6±1,9	3,6±0,0
	2	13,3±0,4	11,4±0,5	1,3±0,4	9,8±3,3	0,7±0,2	5,0±1,2	39,8±2,0	3,5±0,1***
C3	0	13,8±0,4	12,3±0,4	0,8±0,16	5,2±1,1	0,8±0,2	5,5±1,1	46,4±1,6	3,8±0,1
	0.2	13,0±0,4	11,5±0,4	0,9±0,31	6,01±2,0	0,7±0,2	5,1±1,1	42,6±1,3	3,7±0,0
	2	12,4±0,5*	10,3±0,6**	1,3±0,4	10,9±3,4	0,9±0,2	7,0±1,3	38,9±2,3**	3,8±0,1
C4	0	14,2±0,5	10,6±0,8	2,6±0,8	18,4±5,0	0,8±0,3	5,7±2,2	39,4±2,9	3,8±0,1
	0.2	12,9±0,5	10,4±0,6	1,6±0,4	12,0±3,1	0,8±0,2	6,7±1,8	38,4±2,1	3,7±0,1
	2	13,3±0,4	11,6±0,7	1,1±0,5	8,2±4,2	0,7±0,2	5,6±1,6	43,4±2,6	3,7±0,1
C5	0	13,6±0,4	11,7±0,6	1,6±0,6	11,3±4,2	0,3±0,1	2,2±0,9	41,7±2,1	3,6±0,1
	0.2	13,9±0,4	12,5±0,4	0,9±0,2	6,2±1,7	0,6±0,2	3,8±1,2	43,4±1,6	3,5±0,1
	2	13,9±0,4	11,9±0,6	1,3±0,4	9,0±2,9	0,8±0,2*	5,4±1,2*	43,8±2,2	3,7±0,0

Примітка: * – P≤0,05; ** – P≤0,01; *** – P≤0,001 порівняно з відповідним контролем.

Репродуктивні показники контрольних та піддослідних самоць

Тестові субстанції	Дози, мг/кг	Середня к-сть жовтих тіл	Середня к-сть живих плодів	Преімплантаційна загибель зародків		Постімплантаційна загибель зародків, плодів		Загальна маса приплоду, г	Середня маса плодів, г
		(M ± m)	(M ± m)	К-сть	%	К-сть	%		
		(M ± m)	(M ± m)	(M ± m)	(M ± m)	(M ± m)	(M ± m)		
C1	0	14,8±0,5	11,7±0,5	1,7±0,3	11,3±1,9	1,5±0,3	9,5±2,2	43,8±1,7	14,8±0,5
	0.2	14,7±0,3	11,6±0,6	2,1±0,5	14,5±3,7	1,1±0,2	7,3±1,5	42,1±1,8	3,8±0,2
	2	13,8±0,5	11,4±0,4	1,7±0,5	11,0±3,3	0,8±0,2	5,8±1,5	43,5±1,4	3,9±0,1
C2	0	12,7±0,4	11,0±0,6	1,2±0,4	10,1±3,2	0,5±0,2	3,6±1,4	40,9±2,0	3,7±0,0
	0.2	12,3±0,4	9,8±0,6	1,5±0,3	11,4±2,7	1,0±0,2	8,4±2,2	36,1±2,1	3,7±0,1
	2	12,5±0,5	9,7±0,4	1,6±0,3	12,0±2,4	1,2±0,3*	9,4±2,0*	35,2±1,6*	3,6±0,0*
C3	0	13,8±0,4	12,3±0,4	0,8±0,16	5,2±1,1	0,8±0,2	5,5±1,1	46,4±1,6	3,8±0,1
	0.2	12,7±0,4	10,8±0,7	1,3±0,5	10,4±3,8	0,5±0,2	4,3±1,3	41,7±2,5	3,9±0,1
	2	13,0±0,3	11,0±0,4*	1,6±0,3*	12,1±2,4**	0,5±0,2	3,9±1,3	40,5±1,6**	3,7±0,1
C4	0	14,2±0,5	10,6±0,8	2,6±0,8	18,4±5,0	0,8±0,3	5,7±2,2	39,4±2,9	3,8±0,1
	0.2	13,7±0,4	10,9±0,6	1,9±0,5	14,5±4,6	0,9±0,2	6,1±1,3	39,5±2,4	3,6±0,1
	2	14,2±0,4	12,2±0,3	1,4±0,4	9,3±2,4	0,6±0,2	4,0±1,1	44,8±1,6	3,7±0,1
C5	0	13,6±0,4	11,7±0,6	1,6±0,6	11,3±4,2	0,3±0,1	2,2±0,9	41,7±2,1	3,6±0,1
	0.2	14,1±0,5	12,0±0,7	1,3±0,4	9,8±2,9	0,8±0,2	5,8±1,6	42,77±2,3	3,6±0,1
	2	14,4±0,4	11,6±0,7	1,5±0,3	11,3±3,1	1,3±0,4*	8,9±2,6*	41,2±2,3	3,6±0,04

Примітка: * – P≤0,05; ** – P≤0,01 порівняно з відповідним контролем.

- зменшення тривалості фази проеструсу на 17.1 % при дії C5.

Тривалість циклу та окремих його стадій у піддослідних самоць після експозиції C1 та C3 в усіх досліджуваних дозах вірогідно не змінювались (рис. 3).

Встановлені зміни, такі як зменшення тривалості естрогензалежної стадії проеструсу, а також збільшення стадії дієструсу у самоць, на нашу думку, можуть вказувати на дисбаланс статевих гормонів. Тому можна припустити, що ЦИП володіє ендокрин дизрапорними властивостями.

При макроскопічному обстеженні внутрішніх органів самоць ніяких змін, пов'язаних з впливом ЦИП, не виявлено.

Тестові субстанції C2, C3 та C4 вплинули на показники стану репродуктивної функції в піддослідних групах самоць в дозі 2 мг/кг, які проявились в наступних достовірних змінах:

- зниження загальної маси приплоду на 13.9 % і 12.7 % при дії C2 і C3, відповідно;

- зменшення кількості живих плодів на 10.6 % за дії C3;

- зниження середньої маси тіла плодів після впливу C2 на 3.2 %;

- збільшення кількості та відсотка преімплантаційної загибелі ембріону за дії C3 на 106.7 %, 147.6 %;

- підвищення кількості та відсотка післяімплантаційної загибелі плодів при дії C2 на 148.9 % та 163.7 %, відповідно, а після впливу C5 в 4 рази відносно контролю.

Тестові субстанції C1 та C4 не порушували параметри фертильності самоць такі, як кількість жовтих тіл в яєчниках; число і процентне співвідношення плодів, загиблих до і після імплантації; кількість живих плодів, а також середня маса плодів і загальна маса приплоду (табл. 2).

Після впливу C4 на рівні максимальної дози у експериментальних самоць встановлено вірогідне зниження індексів зачаття та фертильності на 20 %. Тенденція ж до зменшення цих індексів у самоць відмічалась за дії C1, C2 та C5 (рис. 4).

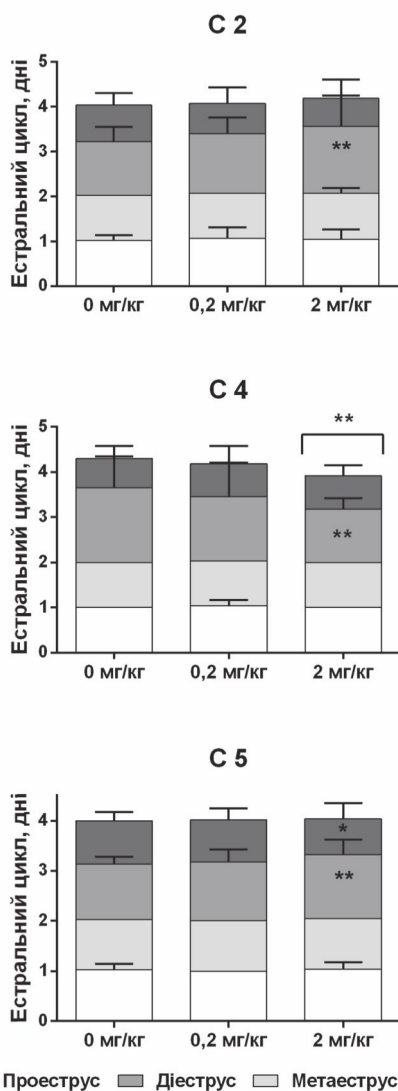


Рис. 3. Естральний цикл та тривалість окремих його стадій. Примітка: * – P≤0,05; ** – P≤0,01 порівняно з відповідним контролем.

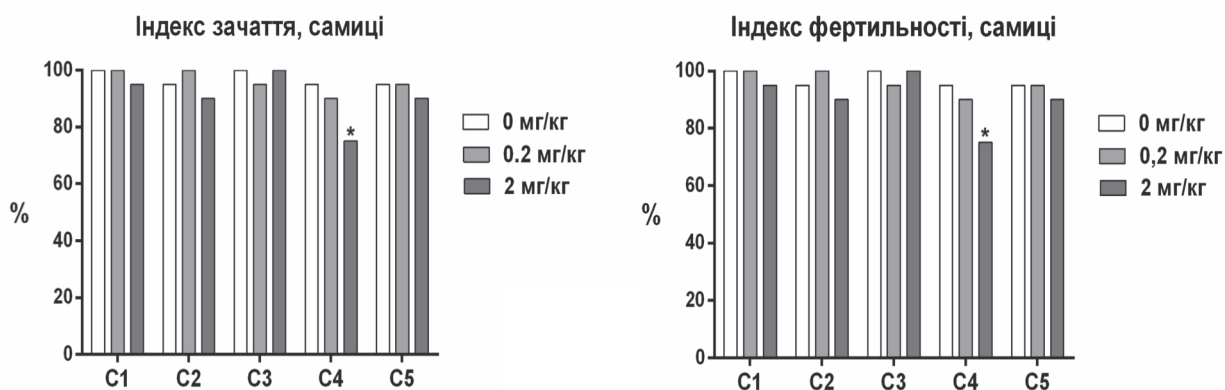


Рис. 4. Індекси зачаття та фертильності контрольних та піддослідних самиць.

Примітка: * – $P \leq 0,05$ порівняно з відповідним контролем.

Підсумовуючи результати досліджень ізольованого впливу генериків ЦІП на гонади та репродуктивну функцію щурів Wistar Han, показано, що зміни досліджуваних параметрів при дії певних тестових субстанцій були більш та менш виражені й проявлялись статеву чутливістю. На нашу думку, при вивченні генеричних пестицидів, домішки можуть по різному проявляти токсичну дію. Оцінюючи отримані результати та порівнюючи їх з чистотою активної діючої речовини кожного з ЦІП (C1-95 %, C2-95.48 %, C3-95.8 %, C4-95.98 % та C5-96.3 %), підтверджено, що концентрація додаткових інгредієнтів продемонструвала різні прояви репродуктивної токсичності. Тому, дослідження генеричних пестицидів є необхідною складовою в процесі токсикологічної оцінки їх ризику та ідентифікації небезпеки.

Висновки

Усі досліджені тестові субстанції генеричного ципроконазолу на високому рівні доз володіють гондотоксичною активністю, яка була відмічена в обох статей.

В дозі 2 мг/кг маси тіла встановлено загальнотоксичний ефект у самців та самиць впродовж експозиції C2, а також у самиць під час вагітності після впливу C2 та C3.

Усі тестові субстанції ЦІП чинять виражену антиандрогенну дію, що проявляється змінами морфо-

функціональних показників стану статевих залоз у піддослідних групах самців.

Тестові субстанції C2, C3 та C4 вплинули на показники стану репродуктивної функції в піддослідних групах самиць в дозі 2 мг/кг.

Встановлені достовірні зміни тривалості естрального циклу та окремих його стадій у самиць, які отримували C2, C4 та C5 в максимальній дозі. Ідентифіковані в даному експерименті зміни, свідчать про наявність ендокрин дизрапторних властивостей ципроконазолу.

Вивчаючи запліднюючу здатність та плодючість самиць в дозі 2 мг/кг, зафіксовано зниження індексів зачаття та фертильності але вірогідні зміни встановлені тільки при дії C4.

Встановлена для всіх досліджуваних субстанцій не діюча доза (NOEL) – 0,2 мг/кг маси тіла.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи отримані результати, подальші дослідження з оцінки репродуктивної токсичності триазольного фунгіциду ципроконазолу, полягають в комплексній оцінці їх впливу на гормональний фон самців та самиць. Планується визначити кількісний вміст чоловічого статевого гормону тестостерону у самців, тиреоїдного гормону і Т4 у обох статей з метою оцінити ендокрин дизрапторний потенціал ЦІП.

Література

- Weston DP, You J, Lydy MJ. Distribution and Toxicity of Sediment-Associated Pesticides in Agriculture-Dominated Water Bodies of California's Central Valley. *Environ. Sci. Technol.* 2004;38:2753-95.
- Shepelskaya NR. Pischevyye kontaminanty: metodologicheskie podhodyi k izucheniyu ih reproduktivnoy toksichnosti. *Problemi harchuvannya.* 2013;1:59-64. [in Russian].
- Mokliachuk LI, Lishchuk AM, Matusevych HD, Melnychuk OP. Ekotoksikologichni osoblyvosti zastosuvannya kompleksiv suchasnykh herbitsydiv v ahrotekhnolohiyakh vyroshchuvannya zernovykh kultur. *Zbalansovane pryrodokorystuvannya.* 2015;2:131-5. [in Ukrainian].
- Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. *Mutation Research.* 2003;543:251-72.
- Naharashi T, Zhao X, Ikeda T, Nagata K, Yeh JZ. Differential actions of insecticides on target sites: Basis for selective toxicity. *Human Experimental Toxicology.* 2007;26:361-6.
- Boobis AR, Ossendorp BC, Banasiak U, Hamey PY, Sebestyen I, Moretto A. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicology Letters.* 2008;180:137-50.
- Bolognesi C, Merlo FD. Pesticides: Human Health Effects. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology.* 2011;438:1-8.
- Pelo IM, Bardov VH, Vavrinevych OP, Omelchuk ST, Antonenko AM. Toksykolohe-hihienichna otsinka bakovykh sumishei pestytsydiv ta vstanovlenniyakh limituyuchykh komponentiv dlia optymizatsii sanitarnoho nahliadu. *Medychna nauka Ukrainy.* 2015;11(3-4):99-107. [in Ukrainian].
- Pestytsydy. Klasyfikatsiya za stupenem nebezpechnosti: DSanPiN 8.8.1.002-98 [Zatv. 28.08.98]. *Zb. Vazhlyvykh ofitsiynykh materialiv z sanitarnykh i protyepidemichnykh pytan.* 2000;9(1):249-66. [in Ukrainian].
- KahanYuS. Obshchaia toksykologhiya pestytsydiv. *Zdorove;* 1981. 174 s. [in Russian].
- Usenko TV. Problem of assessment of hematotoxicity of pesticides. *Medical and Clinical Chemistry.* 2018;4:129-37.
- Nidhi Mathur, Pandey G, Jain GC. Pesticides: a review of the male reproductive toxicity. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology.* 2010;4(1):1-8.
- Suresh C, Joshi A, Preeti Sharma A. Male reproductive toxicity of organophosphorous compounds: are view. *Toxicological & Environmental Chemistry.* 2011;93(7):1486-507.

14. Thomas B. Knudsen, Matthew T. Martin, Robert J. Kavlock, Richard S. Judson, David J. Dix, Amar V. Singh. Profiling the activity of environmental chemicals in prenatal developmental toxicity studies using the U.S. EPA's ToxRefDB. *Reproductive Toxicology*. 2009;28:209-19.
15. Guide for the care and use of laboratory animals. LAR Publication, National Academy Press; 1996. 140 p.
16. OECD Principles of Good Laboratory Practice. ENV/MC/CHEM(98)17. Environment Directorate Organisation for Economic Cooperation and Development; 1998. 41 p.

ДОСЛІДЖЕННЯ ГОНАДОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЦИПРОКОНАЗОЛУ НА САМЦЯХ І САМИЦЯХ ЩУРІВ WISTAR HAN

Колянчук Я. В.

Резюме. Метою даної роботи було ідентифікувати небезпеку і оцінку ризику гонадо- та репродуктивної токсичності впливу п'яти генеричних пестицидів ципроконазолів різних виробників та концентрацій на самців і самиць щурів Wistar Han та порівняти отримані дані. Діючі речовини ципроконазолу вводились щодня (5 днів на тиждень), внутрішньошлунково двом групам тварин, по 20 самців та самиць в кожній, в дозах 0,2 і 2 мг/кг маси тіла впродовж 10-11 тижнів для самців та 9-10 тижнів для самиць. Після закінчення експозиції досліджувалися функціональні показники стану гонад і здатність тварин до відтворення потомства. Дослідження проведені згідно рекомендацій комісії біоетики та стандартних операційних процедур Центру, розроблених у відповідності до рекомендацій та вимог Належної лабораторної практики (GLP). Всі п'ять тестових субстанцій в максимальній дозі 2 мг/кг маси тіла володіють репродуктивною токсичністю та чинять виражену антиандрогенну дію, що проявляється в змінах морфо-функціональних показників стану статевих залоз у піддослідних групах самців та репродуктивних показників у самиць. Встановлена не діюча доза (NOEL) по гонадо- та репродуктивній токсичності для самців та самиць щурів Wistar Han – 0,2 мг/кг маси тіла.

Ключові слова: триазольні фунгіциди, пестициди, репродуктивна токсичність, методологічні підходи.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГОНАДОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИПРОКОНАЗОЛА НА САМЦАХ И САМКАХ КРЫС WISTAR HAN

Колянчук Я. В.

Резюме. Целью данной работы было идентифицировать опасность и оценку риска гонадо- и репродуктивной токсичности воздействия пяти генерических пестицидов ципроконазол различных производителей и концентраций на самцов и самок крыс Wistar Han и сравнить полученных данные. Действующие вещества ципроконазол вводились ежедневно (5 дней в неделю), внутривенно двум группам животных, по 20 самцов и самок в каждой, в дозах 0,2 и 2 мг/кг массы тела в течение 10-11 недель для самцов и 9-10 недель для самок. После окончания экспозиции исследовались функциональные показатели состоянию гонад и способность животных к воспроизводству потомства. Исследования проведены согласно рекомендациям комиссии биоэтики и стандартных операционных процедур Центра, разработанных в соответствии с рекомендациями и требованиями Надлежащей лабораторной практики (GLP). Все пять тестовых субстанций в максимальной дозе 2 мг/кг массы тела обладают репродуктивной токсичностью и оказывают выраженное антиандрогенное действие, что проявляется в изменениях морфо-функциональных показателей состоянию половых желез у подопытных групп самцов и репродуктивных показателей у самок. Установлена не действующая доза (NOEL) по гонадо- и репродуктивной токсичности для самцов и самок крыс Wistar Han – 0,2 мг/кг массы тела.

Ключевые слова: триазольные фунгициды, пестициды, репродуктивная токсичность, методологические подходы.

THE STUDY OF CYPROCONAZOLE GONADOTOXICITY ON MALE AND FEMALE WISTAR HANNOVER RATS

Kolianchuk Y. V.

Abstract. There are various factors associated with abnormalities of reproductive system, including nutrition, environment, socio-economic status, lifestyle and stress. There is every reason to suppose that pesticides also significantly contribute to reproductive disorders. Therefore, *the purpose of this study* was to identify the hazard and risk assessment gonado- and reproductive toxicity influenced by five generic pesticides cyproconazole of different manufacturers and in various technical grades on male and female Wistar Han rats and compare the results.

Methods. The active substances of cyproconazole were administered daily by oral gavage for 5 days/week, in two groups of animals, 20 males and females in each, at doses of 0.2 and 2 mg/kg body weight for 10-11 weeks for males and 9-10 weeks for females. Control animals received equivalent amount of vehicle. Intact females, intended for mating, were kept at the same time with control and experimental animals. Functional indicators of gonad state and the animals ability to reproduction were examined after the end of exposure period. The duration and the frequency of each stage of the estrous cycle in female rats and the number of motile sperm, the total amount of sperm and the number of abnormal forms of germ cells of the male rats were studied. The reproductive function state in females was evaluated on day 20th of pregnancy. Thereby the number of corpora lutea in the ovaries, number of alive, dead and resorbed fetuses and embryos, the fetus weight, total weight of litters, the occurrence of malformations. The indices of pairing, conception, fertility, pregnancy, and the length of pre-coital interval were taken into account were registered. The studies were conducted in accordance with the recommendations of the Bioethics Commission and the standard operating procedures of the Center, within the Good Laboratory Practice (GLP) requirements.

Results. All five test substances in high dose of 2 mg/kg body weight cause reproductive toxicity (antiandrogenic activity), which manifests in the changes of morpho-functional state of the gonads in experimental groups of males

and reproductive parameters in females. In addition, there was adverse influence on males and females fertility, which was assessed by the indexes of conception and fertility.

Conclusions. Comparing the obtained data, it may be concluded that all the test substances does not cause the general toxic effects and not induce any adverse effects on the reproductive function of male and female Wistar Han rats in the low dose 0.2 mg/kg/bw (NOEL).

Key words: triazole fungicides, pesticides, reproductive toxicity, methodological approaches.

*Рецензент – проф. Катрушов О. В.
Стаття надійшла 06.05.2018 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2018-2-144-114-117

УДК 633.34:604:543.645.6

¹Кулик Я. М., ²Чорнолата Л. П.

НАЯВНІСТЬ НЕПРИРОДНИХ ПЕПТИДІВ У БІЛКУ БОБІВ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНОЇ РАУНДАПОСТІЙКОЇ СОЇ

¹Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова (м. Вінниця)

²Інститут кормів та сільського господарства Поділля НААН (м. Вінниця)

kulikmf@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дана робота є фрагментом НДР «Вивчити вплив довготривалого згодовування трансгенної раундапостійкої сої на відтворювальну здатність свиней і курей», № державної реєстрації 0117U002236.

Вступ. Присутність ГМО в продуктах харчування підтверджується шляхом виявлення генетичних вставок 3SS, NOS і FMV. Можливо в майбутньому з'являться й інші векторні системи. При виявленні 3SS проби перевіряються на природну контамінацію вірусом мозаїки цвітної капусти з допомогою ПЛР-систем CaMV. Крім цього, ефективність виділення ДНК повинна підтверджуватися за допомогою ПЛР системи на рослину ДНК.

Якщо досліджувані проби виявилися ГМО-позитивними проводиться ідентифікація і класифікація ГМО, щоб з'ясувати чи дозволений чи ні цей трансгенний організм. У Європі, продукти, що містять заборонені ГМО, не дозволені для ввезення в Євро-союз, крім того ці продукти не можна виробляти і переробляти на території Європи. Для дозволенних ГМО головним є кількісне визначення в діапазоні до 0,9 % у зразках харчових продуктів. Вміст ГМО в кількості копій ДНК може бути визначена кількісно в залежності від рослинної матриці та результати подаються у відсотках.

Щодо такої оцінки генетично модифікованої (ГМ) раундапостійкої сої нами звернута увага на наявність неприродних пептидів у її білку і, можливий, негативний вплив цих пептидів на організм людини при використанні такої сої в продуктах харчування. Так, при боротьбі з бур'янами, тобто, обприскування ГМ раундапостійкої сої Roundup (гліфосат) впливає на метаболічний процес шикимової кислоти в рослинах бур'янів, блокуючи синтез деяких незамінних ароматичних амінокислот, зокрема, фенілаланіну, тирозину і триптофану [1], перед усім у точках росту стебла і кореня [2]. За таких умов блокування синтезу зазначених ароматичних амінокислот стебло рослини засихає. При обприскуванні певна частина гліфосату попадає і на листову поверхню і стебло ГМ сої. Це фаза бутонізації. Рослина сої продовжує розвиватися і гліфосат не блокує синтез незамінних ароматичних амінокислот через наявність в її гене-

тичній структурі ферменту 5-енолпіруватшкімат-3-фосфатази (EPSPS). Рослина сої продовжує ріст і формуються боби (зерно) з високим вмістом білка. Гліфосат – це молекула гліцину з метилфосфонільною групою, зв'язаною з атомом азоту. Як аналог гліцину він може мати місце в процесах синтезу білка соєвих бобів. За таких умов утворюються неприродні пептиди в бобах (зерні) ГМ раундапостійкої сої.

Гліцин, найменша амінокислота, яка має унікальні властивості та здатність приєднуватися до плазматичної мембрани або цитоскелету в організмі людей і тварин. Глибокий аналіз літературних джерел виявив ряд класів білків, які залежать від природних (консервативних) залишків гліцину для виконання належної функції. Заміна гліфосатом природних (консервативних) гліцинів пояснює зв'язок із діабетом, ожирінням, астмою, набряком легень, наднирковою недостатністю, безпліддям та іншими захворюваннями [3].

Мета досліджень. Визначити наявність неприродних пептидів у білку бобів ГМ раундапостійкої сої порівняно з не ГМ соєю на здатності ароматичних амінокислот (триптофан, тирозин та фенілаланін) поглинати ультрафіолетове світло в діапазоні 280 нм, так як проведеними нами дослідженнями на основі реакції Паулі встановлено, що гліфосат при кип'ятінні вступає у взаємодію, тобто, утворює сполуки з ароматичними амінокислотами не ГМ сої і більш виражено з такими ж амінокислотами ГМ раундапостійкої сої.

Об'єкт і методи досліджень. Боби (зерно) ГМ раундапостійкої сої і не ГМ сої. В один скляний термостійкий стакан поміщали 2 г дрібно подрібненої на лабораторному млинку ГМ раундапостійкої сої, а в другий такий же стакан 2 г не ГМ сої. В обидва стакани добавляли по 150 мг дистильованої води і кип'ятили впродовж 30 хвилин. Мета кип'ятіння – інактивація антипоживних речовин і перехід у водний розчин водорозчинних білків, пептидів і вільних амінокислот. Після кип'ятіння в кожний стакан добавляли дистильовану воду до мітки – 150 мл, тобто добавляли воду, яка випаровувалася при кип'ятінні, а потім окремо з кожного стакану відбирали середню пробу 10 мл водного розчину сої і добавляли 20 мл 6,0 % розчину трихлороцтової кислоти (ТХО) для осадження білків і фільтрували крізь паперовий