

На правах рукописи

НИГМАТОВ ДИНАР ХАМИТОВИЧ

**РЕПРОДУКТИВНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ДИОКСИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ
ВОЗДЕЙСТВИИ НА ЖИВОТНЫХ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

16.00.04 - ветеринарная фармакология с токсикологией

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Казань - 2005

Работа выполнена в ФГНУ «Всероссийский научно - исследовательский ветеринарный институт» (г. Казань).

Научный руководитель: Доктор ветеринарных наук
Новиков Валерий Александрович

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук
Гильмутдинов Рустам Якубович
Доктор ветеринарных наук, профессор
Папунди Константин Христофорович

Ведущее учреждение: **ФГОУ ВПО Чувашская государственная сельскохозяйственная академия**

Защита состоится « » 2005 г. в часов на заседании диссертационного совета Д - 220.012.01 при ФГНУ «Всероссийский научно - исследовательский ветеринарный институт» (420075, г.Казань, Научный городок-2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института
Автореферат разослан « ____ » _____ 2005 г.

Учёный секретарь диссертационного
совета, кандидат ветеринарных н
ст. науч. сотрудник



И . Степанов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Среди загрязнителей окружающей среды техногенного происхождения большую опасность представляют диоксины, которые поступают в биосферу в виде микропримесей с продукцией или отходами многочисленных технологий. Диоксины - это обобщенное название большой группы полихлорированных дибензодиоксинов, полихлорированных дибензофуранов, которые представляют собой гетероциклические полихлорированные соединения с очень близкими химическими свойствами. Самый известный, изученный и наиболее токсичный - 2,3,7,8-тетрахлордибензо-пара-диоксин (2,3,7,8-ТХДД), по отношению к которому часто применяется термин «диоксин» (Л.А. Федоров, Б.Ф. Мясоедов, 1990; J. McKinney et al., 1982).

Диоксины - универсальные клеточные яды, поражают все виды живых существ, чрезвычайно устойчивы к химическому и биологическому разложению, сохраняются в окружающей среде в течение десятков лет и легко переносятся по пищевой цепочке (Л.А. Федоров, 1993). Основная опасность их заключается не столько в острой токсичности, сколько в хроническом отравлении малыми дозами, кумулятивном действии и способности вызывать отдаленные последствия (Safe S., 1990).

Однако отдаленные последствия диоксинов оценены неоднозначно. Недостаточно работ по их эмбриотоксическому, тератогенному и гонадотоксическому действиям в условиях хронического отравления, противоречивы данные о мутагенности 2,3,7,8-ТХДД. В доступной литературе отсутствуют сведения о влиянии лечебных средств на эти процессы.

На основании известных данных по токсикологии диоксинов и патогенеза их отравлений во ВНИВИ на протяжении ряда лет проводится поиск антидотов среди серосодержащих соединений, иммуностимуляторов, антиоксидантов, а также средств, регулирующих метаболические процессы и др. Из испытанных потенциальных антагонистов диоксина определенный защитный эффект оказал димефосфон, пероральное введение которого повышало выживаемость животных при отравлении среднесмертельной дозой диоксина (Э.А. Галиев, 2000). В то же время не исследовано влияние димефосфона на воспроизводительную функцию животных при воздействии диоксина. Представляло интерес также сравнение его эффективности с препаратом, обладающим общепризнанным положительным действием на репродуктивную систему, в частности с витамином Е.

В последние годы во многих странах зарегистрировано снижение репродуктивной функции и неблагоприятное влияние на формирование половых органов плода у человека и животных (R. Sharpe, 1993). Не последнюю роль в этом играют диоксины, однако средства, способствующие повышению устойчивости воспроизводительной функции животных, отсутствуют и проблема их поиска является одной из важнейших в современной токсикологии.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось изучение возможности лечения нарушений воспроизводительной функции животных при хроническом отравлении диоксином. В соответствии с целью исследования и государственным заданием «Проведение исследований по разработке и освоению в условиях производства методов и средств предупреждения и ликвидации последствий поражения животных экотоксикантами» (№ госрегистрации 01200202603), поставлены следующие задачи:

1. Изучить эмбриотоксическое, тератогенное, гонадотоксическое и мутагенное действия диоксина при многократном поступлении его с кормом в организм животных в малых дозах.
2. Определить возможность корректирующего действия димефосфона и витамина Е на эмбриотоксичность, тератогенность и гонадотоксичность диоксина в опытах на белых крысах и кроликах.
3. Изучить влияние димефосфона и витамина Е на гематологические и биохимические показатели у животных с нарушением воспроизводительной функции при хроническом отравлении диоксином.
4. Провести сравнительную оценку воздействия димефосфона и витамина Е на воспроизводительную функцию при отравлении животных диоксином.

Научная новизна. Впервые установлено снижение димефосфоном и витамином Е репродуктивной токсичности диоксина. Пероральное введение димефосфона и витамина Е уменьшает эмбриотоксичность, тератогенность и гонадотоксичность диоксина при хроническом воздействии его на животных. Выявлено более выраженное лечебное действие димефосфона по сравнению с витамином Е при отравлении животных диоксином.

Практическая ценность работы. Разработан способ снижения эмбриотоксичности, тератогенности и гонадотоксичности диоксина путем перорального введения димефосфона и витамина Е. Димефосфон может быть использован в дальнейших исследованиях как базовый препарат для коррекции нарушений воспроизводительной функции животных при отравлении диоксином.

Основные положения, выносимые на защиту.

Средства, снижающие токсическое действие диоксина на воспроизводительную функцию животных и их сравнительная оценка.

- Обоснование более высокой эффективности лечебных действий димефосфона по сравнению с витамином Е при отравлении животных диоксином.

Сведения об апробации работы. Материалы, представленные в диссертации, доложены и обсуждены на ежегодных сессиях Ученого совета ФГНУ ВНИВИ по рассмотрению отчетов (Казань, 2002 - 2004 гг.), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины Ульяновской ГСХА (Ульяновск, 2003); Всероссийской научно-практической

конференции «Актуальные проблемы агропромышленного комплекса» (Казань, 2004); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии», посвященной 100-летию со дня рождения академика ВАСХНИЛ А.А.Полякова, М., 2004.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 112 стр., содержит 20 таблиц, иллюстрирована 14 рисунками, состоит из следующих разделов: общая характеристика работы, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, список литературы. Список литературы включает 175 библиографических источников, в т.ч. 95 - на иностранном языке.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена в лаборатории контроля и индикации техногенных экотоксикантов ВНИВИ с 2001 по 2004 год.

Эксперименты выполнены на белых мышах, белых крысах и кроликах. Животных получали из питомника ВНИВИ, после чего их содержали в условиях вивария, кормление осуществляли согласно общепринятым зоотехническим нормам. Группы животных подбирали по принципу аналогов с учетом породы, возраста, пола и массы тела. Условия проведения опытов, схемы, вид и количество используемых при этом животных, дозировки и кратность применения препаратов приведены в соответствующих разделах работы.

Для экспериментального исследования использовали 2,3,7,8-ТХДД, который давали животным многократно с кормом в виде масляного раствора в дозе 1/200 ЛД₅₀. В качестве лечебно-профилактических препаратов использовали димефосфон и витамин Е.

Димефосфон - диметилвый эфир (1,1-диметил-3-оксобутил фосфоновой кислоты), выпускается во флаконах в виде 15%-ного водного раствора и представляет собой прозрачную или слегка опалесцирующую жидкость со своеобразным запахом и горьким вкусом, рН раствора от 2,0 до 4,0. Он оказывает нормализующее действие на метаболические процессы, проявляет мембраностабилизирующий, противовоспалительный, антиоксидантный и иммуномодулирующий эффекты.

Витамин Е (α-токоферола ацетат), выпускают в форме 5, 10 и 30%-ых растворов во флаконах по 10, 20, 25 и 50 мл для применения внутрь и в ампулах по 1 мл для инъекций. Витамин Е использован нами в качестве препарата сравнения, обладающего выраженными антиоксидантными свойствами и стимулирующим действием на воспроизводительную функцию животных.

Гематологические исследования, включающие определение количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита, проводили общепринятыми методами (А.А. Кудрявцев, Л.А. Кудрявцева, 1974). При биохимических исследованиях устанавливали в сыворотке крови содержание общего белка на рефрактометре RL-1 и кальция титриметрическим методом с мурексидом (В.Я. Антонов, П.Н. Блинов, 1971). Содержание холинэстеразы в крови определяли по методике Хестрина в модификации А.Н. Панюкова (1966).

Порфирины в моче определяли по методу Л.И. Идельсона (1968).

Для изучения процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в митохондриях печени определяли содержание малонового диальдегида (МДА) по М.С. Гончаренко и А.М. Латиновой (1985). Митохондрии выделяли из ткани печени по методу Ю.В. Евдотиенко и Н.К. Моховой (1967).

Оценку эмбриотропного действия диоксина проводили согласно «Методическим указаниям по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию» (1986). Тератогенное действие исследовали по А.П. Дыбану (1974), топографию внутренних органов и оксификацию плодов по J. Wilson (1965) и A. Dawson (1926).

Оценку мутагенного действия диоксина осуществляли с помощью индукции доминантных летальных мутаций (ДЛМ) согласно «Методическим рекомендациям по определению мутагенной активности ветеринарных препаратов» (1983). Метод основан на выявлении мутаций, вызывающих гибель эмбрионов на самых ранних стадиях развития в результате хромосомных и геномных перестроек, которые приводят к гибели зигот до и после имплантации. Схема проведения эксперимента включает обработку исследуемым веществом самцов белых крыс или мышей с последующим спариванием их с интактными самками (А.М. Малащенко, 1977).

Гонадотоксическое действие диоксина определяли по И.В. Саночкому (1970). Гистологические исследования проводили совместно с доцентами к.в.н. Е. Л. Матвеевой и к.в.н. В. В. Титовым. Окраску гистопрепаратов производили гематоксилин-эозином по Ганзену (Г.А. Меркулов, 1996). После умерщвления животных посредством декапитации выделяли половые железы. Семенники фиксировали в 15% нейтральном формалине, заливали в парафин, делали поперечные срезы толщиной 8 мкм, которые после проведения через серию спиртов возрастающей крепости окрашивали гематоксилин - эозином. Затем осуществляли морфологический анализ семенников для установления качественных изменений всех типов зародышего эпителия.

Цифровой материал подвергался статистической обработке на ЭВМ по общепринятым методам вариационной статистики с вычислением критерия Стьюдента (t). Разница между сравниваемыми величинами считалась достоверной при уровнях Р меньше или равной 0,05.

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Влияние димефосфона и витамина Е на эмбриотоксичность и тератогенность диоксина при отравлении белых крыс

Известна высокая чувствительность репродуктивной функции к химическому фактору. Величина порога эмбриотоксического действия, как правило, меньше или равна величине порога общетоксического эффекта, что позволяет рассматривать этот метод исследования хронического воздействия в качестве объективного критерия оценки нарушений репродуктивной функции под действием ксенобиотиков (И.В. Саноцкий, В.Н. Фоменко, 1979).

Опыты были проведены на самках белых крыс половозрелого возраста, рожавших от 1 до 3 (но не более) раз, живой массой 180-220 г. Животных делили на 3 группы по 12 крыс в каждой. Первой группе, служившей биологическим контролем, в корм добавляли соответствующую дозу растительного масла, используемого в качестве растворителя диоксина. Крысам второй группы с кормом давали масляный раствор 2,3,7,8-ТХДД в дозе 0,3 мкг/кг массы тела (1/200 ЛД₅₀) с 1 по 17 сутки беременности. Животным третьей группы, помимо аналогичной заправки, в ходе всего эксперимента выпаивали лечебно - профилактический препарат димефосфон в дозе 90 мг/кг массы тела. Четвертой группе животных параллельно с введением диоксина в дозе 0,3 мкг/кг массы тела с кормом задавали витамин Е в дозе 1,5 мг/кг массы тела животного.

Гибель эмбрионов до имплантации по сравнению с интактной группой увеличилась у животных, получавших диоксин, на 35%, в группе, где наряду с токсикантом задавался препарат димефосфон - на 8%, а в группе животных, получавших витамин Е - на 16%.

Возросла гибель эмбрионов и после имплантации. Так, в 3 раза относительно биологического контроля, увеличилась смертность эмбрионов во второй группе, в третьей группе - на 86%, а в четвертой - на 166%. Общая эмбриональная смертность также была выше во второй группе и составила 38%, тогда как у леченых животных она равнялась 27% в третьей и 34% в четвертой группах, что больше показателя биологического контроля на 96; 37 и 75% соответственно. Процент выживаемости плодов во второй группе был ниже на 23%, в третьей группе этот показатель снизился всего на 9%, а в четвертой - на 18%.

Масса плода во второй группе была меньше, чем в группе биологического контроля на 8%, в третьей группе всего на 2% и на 3% в четвертой. Краниокаудальный размер плода сократился по сравнению с контролем на 7% во второй группе, на 4% - в третьей и на 7% - в четвертой.

Внешний осмотр извлеченных из матки плодов всех трех групп видимых морфологических изменений не выявил. Аномалий развития внутренних органов плодов, а также нарушений их топографии не установлено.

Топография костных и хрящевых закладок в скелете не нарушается. У плодов опытных групп отмечали задержку окостенения костей осевого скелета. Наблюдалось отставание в формировании хвостовых позвонков, пястных и плюсневых костей. У леченных животных эти процессы были менее выраженными

Во второй группе общее количество позвонков относительно биологического контроля было меньше на 3, в третьей группе - на 0,9, а в четвертой - на 2%; крестцовых позвонков на 7, 2 и 5%; хвостовых позвонков на 27, 9 и 18%, костей грудины на 27, 13 и 24%; пястных костей на 22, 8 и 11%; плюсневых костей на 18,9 и 14% соответственно.

Постнатальное развитие опытных крысят заметно отставало от крысят группы биологического контроля. В первую очередь это наглядно отражал суммарный показатель средней массы тела крысят за 28-дневный период. У животных второй группы он был ниже на 12%, у крыс, получавших на фоне затравки диоксином препарат димефосфон - на 7%, а в группе животных, которым параллельно с затравкой задавался витамин Е - на 8,5%.

У крысят второй группы в 4 раза выше был процент мертворождений, в то время как в третьей группе он повысился относительно показателя группы биологического контроля в 2 раза, а в четвертой - в 1,8 раза. Во второй группе наблюдался и самый высокий процент постнатальной смертности крысят к 28-му дню жизни, более чем в 5 раз превышавший данный показатель в группе биологического контроля, тогда как в третьей группе он увеличивался в 2 раза, а в четвертой - в 2,2 раза. По таким показателям, как время отлипания ушей, срок опушения, прозрения и прорезывания резцов значительных различий не отмечалось.

По прошествии месяца наблюдений во второй группе началась гибель крысят и к концу 2-го месяца она равнялась 80%, причем у одной из шести самок данной группы пал весь помет. Падеж приплода наблюдался и в третьей группе, но начало его пришлось на второй месяц жизни крысят, а количество павших составило 45%. Жизнеспособность потомства самок крыс, которым параллельно диоксиновой затравке задавался витамин Е, также была низкой. Отход крысят данной группы составил 72%. В группе биологического контроля падеж животных к третьему месяцу наблюдений составил лишь 6%. Кроме того, в опытных группах у выживших крысят наблюдался заметный дефицит массы тела в сравнении с контрольными.

При исследовании морфологических и биохимических показателей крови у самок белых крыс, убитых после затравки на 20-е сутки беременности.

существенных изменений в количественном содержании эритроцитов, гемоглобина, общего белка, кальция и содержания холинэстеразы в контрольных и опытных группах не выявлено.

Установлено повышение содержания МДА в митохондриях печени крыс второй группы, в сравнении с интактными животными на 379%, в меньшей степени в третьей и четвертой группах - на 281 и 232% соответственно (рис. 1).

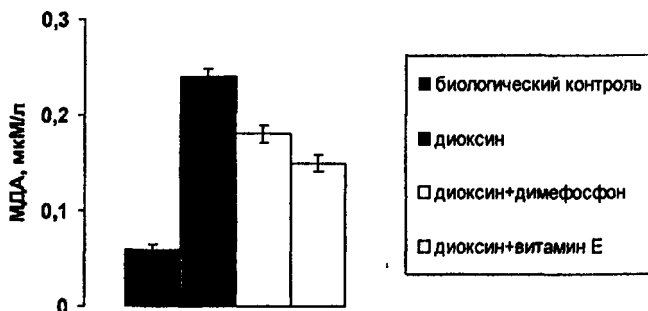


Рис. 1 - Концентрация МДА в митохондриях печени подопытных самок крыс

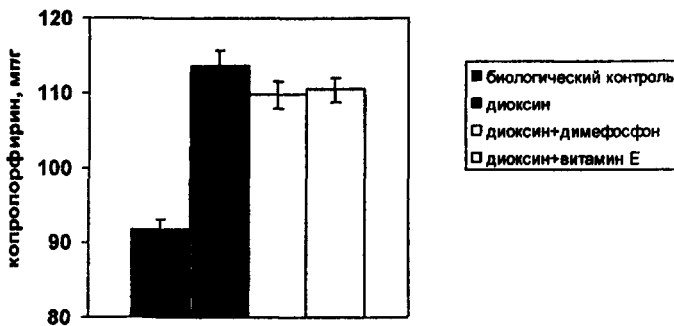


Рис. 2 - Содержание копропорфирина в моче подопытных самок белых крыс

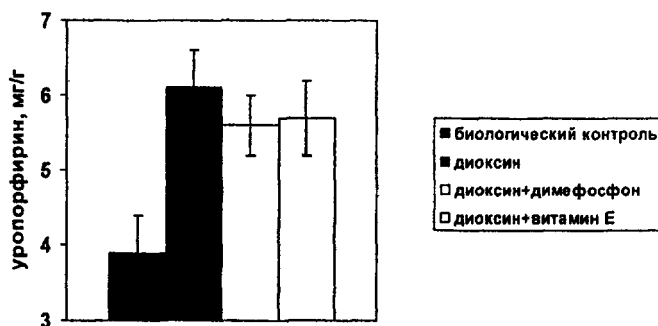


Рис. 3 - Содержание уропорфирина в моче подопытных самок белых крыс

У животных, отравленных диоксином, содержание копропорфирина увеличивалось на 24%, уропорфирина - на 57%. В группе белых крыс, получавших димефосфон на фоне отравления диоксином, повышение этих показателей составляло 19 и 44%, что на 5 и 13% ниже, чем у нелеченных животных. У животных, которым задавался витамин Е, данные показатели возросли на 20 и 46% соответственно, что на 4 и 11% ниже, чем у крыс второй группы (рис. 2 и 3).

Таким образом, диоксин в дозе $1/200$ ЛД₅₀ при пероральном введении белым крысам в течение 17 суток оказывает выраженное эмбриотоксическое и тератогенное действие, вызывает усиление процессов ПОЛ, повышение содержания порфиринов в моче отравленных животных.

Димефосфон уменьшает эмбриотоксическое действие диоксина и сокращает задержку внутриутробного развития плода, способствует более значительному приросту живой массы потомства и снижает падеж приплода, полученный от самок после отравления диоксином.

Для подтверждения данных исследований, полученных на белых крысах, продолжили изучение влияния димефосфона на эмбриотоксические и тератогенные свойства диоксина на кроликах.

2.2.2 Эмбриотоксичность и тератогенность диоксина при отравлении кроликов и использовании лекарственных средств

Для подтверждения результатов исследований, полученных на белых крысах, продолжили изучение влияния димефосфона на эмбриотоксические и тератогенные

свойства диоксина на кроликах. Опыты проводили на самках кроликов массой тела 3,2 - 4,0 кг. Кролики были разделены на четыре группы по 6 самок в каждой. Контрольной группе животных с кормом задавали растительное масло, самкам опытных групп давали масляный раствор 2,3,7,8-ТХДД в дозе 0,15 мкг/кг массы тела ($1/200 \text{ ЛД}_{50}$) ежедневно с 6 по 18 сутки беременности. Кроме того, кроликам третьей группы с водой выпаивали димефосфон в дозе 90 мг/кг массы тела, животным четвертой группы с кормом задавали витамин Е в дозе 1,5 мг/кг живой массы. На 28-й день беременности из каждой группы умерщвляли по 3 крольчихи для исследований. Другую половину животных оставляли до родов, чтобы проследить развитие потомства.

Гибель эмбрионов до имплантации по сравнению с интактной группой увеличилась у животных, получавших диоксин, на 38%, в группе, где наряду с токсикантом задавался димефосфон - на 20% и в группе, где кролики вместе с диоксином получали витамин Е - на 16%. Возросла гибель эмбрионов и после имплантации. Так, на 70% относительно биологического контроля увеличилась смертность эмбрионов во второй группе, в то время как в третьей и четвертой группах - на 53 и 166% соответственно. Общая эмбриональная смертность также была выше во второй группе и составила 40%, тогда как у леченных животных она равнялась 30% - в третьей и 33% - в четвертой, что больше показателя биологического контроля на 97, 37 и 65% соответственно. Выживаемость плодов во второй группе была ниже на 26%, в третьей группе этот показатель снизился всего на 7,5%, а в четвертой - на 18%. Масса плода во второй группе была меньше, чем в группе биологического контроля на 3,5%; в третьей группе - на 2,5% и на 3% в четвертой.

Внешний осмотр извлеченных из матки плодов всех трех групп видимых морфологических изменений не выявил. Аномалий развития внутренних органов плодов, а также нарушений их топографии, не установлено.

У опытных групп постнатальное развитие крольчат заметно отставало от группы биологического контроля. Отмечалось снижение сохранности крольчат к 20 суткам во второй, третьей и четвертой группах на 10,5 и 8% соответственно.

По таким показателям как срок опущения и прозрения значительных различий не отмечалось. Кроме того, в двух опытных группах у выживших крольчат наблюдался заметный дефицит массы тела в сравнении с контрольными животными.

Таким образом, результаты, полученные в опытах на кроликах, подтверждают данные исследований на белых крысах. Можно сделать заключение, что витамин Е в дозе 1,5 мг/кг массы тела уменьшает эмбриотоксическое и тератогенное действие диоксина (снижаются гибель эмбрионов до и после имплантации, общая эмбриональная смертность, падеж приплода).

Результаты исследований эмбриотоксических свойств диоксина на фоне применения димефосфона и витамина Е, наглядно отражают эффективность данных

лекарственных препаратов (рис.4) При этом димефосфон в сравнении с витамином Е оказал более высокое защитное действие, что видно на примере основных показателей эмбриогенеза. Так, постимплантационная гибель и общая эмбриональная смертность были ниже в группе животных, получавших димефосфон, чем в группе с применением витамина Е на 7%.

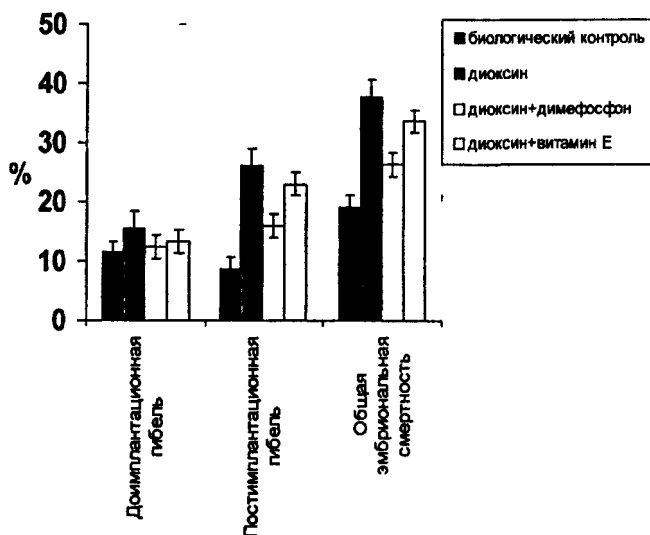


Рис. 4 - Показатели эмбриотоксичности диоксина на фоне применения лекарственных средств

2.23 Изучение мутагенного действия диоксина при введении его белым мышам

Исследования проведены на белых мышах в два срока затравки, которые длились в одном случае 10, а в другом 60 суток.

В первой серии опытов исследования проводили на 20 самцах и 300 самках белых мышей. Самцы были разделены на две группы, по 10 мышей в каждой. Животным первой группы перорально вводили масляный раствор диоксина в дозе 1 мкг/кг массы тела, что составляло $1/200$ ЛД₅₀. Затравку проводили ежедневно на протяжении десяти дней до начала скрещивания. Животным контрольной группы в корм добавляли соответствующую дозу растительного масла, используемого в качестве растворителя диоксина.

В стадии зрелых спермиев доимплантационная, постимплантационная и общая эмбриональная смертности были выше в опытной группе относительно

контроля на 33, 8 и 23% соответственно. В стадии сперматид аналогичные показатели опытной группы повышались на 128, 8 и 18% соответственно. Тенденция к увеличению исследуемых показателей сохранялась и в стадии сперматоцитов - на 13, II и 23% соответственно. В стадии покоящихся сперматоцитов и сперматогоний типа В доимплантационная и общая эмбриональная смертности у животных опытной группы, напротив, снижались, а постимплантационная гибель находилась на одном уровне с контрольной группой. Стадия сперматогоний типа А характеризовалась возрастанием процента доимплантационной смертности в опытной группе в сравнении с контролем на 19,4% и уменьшением как постимплантационной, так и общей эмбриональной смертности на 19,4 и 6,2% соответственно. Выживаемость плодов опытной и контрольной групп на всех стадиях сперматогенеза существенно не различалась.

Гибель эмбрионов большей частью происходила в предимплантационный период. Однако, по мнению некоторых авторов (И.В. Саноцкий, В.Н. Фоменко, 1979), повышение предимплантационной смертности может быть следствием токсического действия химического агента и определяться причинами, не связанными с генетическими повреждениями, такими, например, как снижение оплодотворяющей способности спермиев, гибель в сперматогенезе наиболее чувствительных клеток и др.

Более объективным критерием мутагенного действия является частота индуцированных доминантных леталей (М.Д. Померанцева, Л.К. Рамая, 1969), которая в соответствии со стадиями сперматогенеза равнялась: 1 стадия = 2,3%; 2 стадия = 3,5%; 3 стадия = 4%; 4 стадия = - 1,2%; 5 стадия = - 1,2%.

Во второй серии опытов 20 самцов также были разделены на опытную и контрольную группы по 10 мышей в каждой. Зatravka масляным раствором диоксина в дозе $1/200 \text{ ЛД}_{50}$ осуществлялась на протяжении двух месяцев (полный цикл сперматогенеза). К концу срока введения токсиканта 4 из 10 самцов опытной группы погибли, а оставшиеся в живых мыши выглядели вялыми и угнетенными. У них подсадке самок наблюдалось столь выраженное падение фертильности, что расчет показателей пренатальной смертности эмбрионов не представлялся возможным. Животные обеих групп были отделены от самок и умерщвлены с целью отбора половых желез.

Масса семенников у животных опытной группы была на 70% меньше, чем у группы контроля. Также у затравленных мышей снижались длина и ширина данного органа на 26,8 и 37,8% соответственно. При гистологическом исследовании семенников обнаружили полную десквамацию (слущивание) сперматогенного эпителия у животных, затравленных диоксином, в то время как у контрольных самцов наблюдали целостную картину сперматогенеза со всеми стадиями развития.

Таким образом, пероральное введение самцам белых мышей диоксина в дозе $1/200 \text{ ЛД}_{50}$ в течение 10 суток не оказывало выраженного мутагенного эффекта, о чем свидетельствует низкий процент частоты индуцированных доминантных леталей. Это согласуется с результатами исследований К. Khera и J. Ruddick (1973), в которых описывается отсутствие мутагенного эффекта ТХДД в тесте ДЛМ после ежедневного введения его крысам в дозах 4, 8 или 12 мкг/кг массы тела в течение 7 суток подряд.

Предполагается, что ТХДД относится к группе канцерогенов с негенотоксическим механизмом действия, а не к группе прямо действующих генотоксических соединений, но он может подавлять иммунитет и усиливать канцерогенное действие других ксенобиотиков (WHO, 1989).

В то же время, диоксин в дозе $1/200 \text{ ЛД}_{50}$, при введении его самцам белых мышей в течение 60 дней, вызывал гибель 40% животных. При этом у выживших мышей наблюдалось снижение массы семенников на 70% по сравнению с самцами биологического контроля и отмечалось слущивание сперматогенного эпителия при гистологическом исследовании, что свидетельствует о гонадотоксическом действии диоксина.

Основываясь на полученные данные, нами была поставлена задача исследовать гонадотоксическое действие диоксина на фоне воздействия димефосфона и витамина Е в опытах на белых крысах.

2.2.4 Влияние димефосфона и витамина Б на гонадотоксические свойства диоксина

Эксперименты проводили на самцах белых крыс массой 200 - 250 г. Животных делили на 4 группы по 24 крысы в каждой.

Опытным группам ежедневно скармливали корм, загрязненный масляным раствором диоксина в дозе 0,3 мкг/кг массы тела. Первой группе животных, служившей биологическим контролем, в корм добавляли адекватную дозу растительного масла. В третьей группе помимо затравки в ходе всего эксперимента выпаивали димефосфон в дозе 90 мг/кг массы тела. Четвертой группе крыс с загрязненным кормом задавали витамин Е в дозе 1,5 мг/кг массы тела.

Изучение патоморфологической картины семенников белых крыс, убитых после 30-ти суточной затравки диоксином в дозе $1/200 \text{ ЛД}_{50}$ позволило обнаружить выраженные нарушения сперматогенеза. Наблюдались участки десквамации сперматогенного эпителия и скопление его в просвете канальцев. Следует отметить заметное уменьшение количества клеток Сертоли. Оставшиеся суспенциты были лишены цитоплазматических выростов, в просвете канальцев спермин отсутствовали или были представлены массой детрита. На нарушение процесса сперматогенеза указывает также уменьшение плотности клеток сперматогенного

эпителия в семенниках опытных крыс по сравнению с контролем и наличие участков беспорядочного расположения сперматогенных клеток различных генераций в канальце.

Анализ микроструктуры паренхимы гонад опытных крыс, получавших в течение 30-ти суток диоксин в дозе $1/200 \text{ ЛД}_{50}$ вместе с димефосфоном, показал, что нарушения сперматогенеза заметно уменьшились. Количество канальцев со слушиванием сперматогенного эпителия снижалось по сравнению с таковым показателем предшествующей группы. Во многих канальцах наряду с явлениями дистрофии и деструкции наблюдали некоторое увеличение объема сперматогоний и сперматочитов. Появились канальцы с морфологически завершенным сперматогенезом. В них расположение клеток сперматогенного эпителия было упорядоченным.

У опытных крыс, которым одновременно с диоксином задавали витамин Е, наблюдали достаточно выраженные патоморфологические изменения в извитых канальцах семенников. Однако наряду с существенными явлениями дистрофии и деструкции в некоторых канальцах отмечался морфологически завершенный сперматогенез, в других присутствовали только генерации сперматогониев и сперматочитов, в третьих - зрелые формы сперматогенного эпителия в состоянии деструкции. Сохранились участки десквамации сперматогенного эпителия и заметное урежение плотности клеток. Существенных изменений в количестве эритроцитов, содержании гемоглобина, калция и общего белка не отмечалось. Наблюдалось снижение уровня холинэстеразы на 20 и 30 сутки соответственно на 18 и 29% во второй группе, на 9 и 20% - в третьей и на 14 и 27% в четвертой, что свидетельствует о постепенном поражении гепатоцитов (рис. 5).

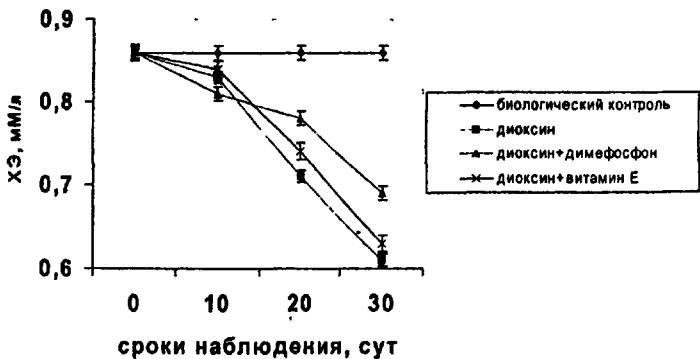


Рис.5 - Содержание холинэстеразы в крови самцов подопытных белых крыс

Концентрация МДА в митохондриях печени самцов крыс возрастала. Во второй группе животных к 10 дню она повысилась на 41%, к 20 - на 133%, к 30 - на

648% В третьей группе рост уровня МДА был менее интенсивным, он превысил фоновые величины на 10, 20 и 30 сутки с начала затравки на 25, 33 и 50%, в четвертой, где параллельно с затравкой диоксином применялся витамин Е: на 10, 17 и 39% соответственно (рис.6).

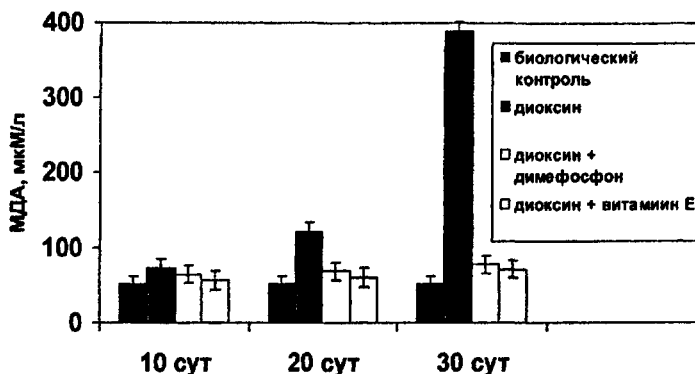


Рис. 6 - Содержание МДА в митохондриях печени самцов белых крыс

При изучении уровня порфиринов в моче животных выявлено повышение копропорфирина во второй группе крыс к 20 и 30 дню на 27 и 96%, в третьей на 20 и 58% соответственно; уропорфирина на 58, 145% во второй и на 45, 88% в третьей группе соответственно. В группе животных, получавших витамин Е, к 20 и 30 дню копропорфирин повысился на 22 и 81% соответственно, а увеличение уропорфирина выявлено - на 52 и 118%.

Полученные нами данные позволяют резюмировать, что по сравнению с витамином Е димефосфон более существенно снижает токсическое действие диосина на сперматогенез белых крыс.

Таким образом, нами впервые показано положительное действие димефосфона и витамина Е при хроническом отравлении животных диоксином на воспроизводительную функцию и биохимические показатели.

Результаты исследований подтверждают лечебно-профилактический эффект димефосфона при отравлении животных диоксином, который складывается из антиоксидантного, иммуномодулирующего, мембраностабилизирующего и антиацидотического действия препарата, стимулирования активности им некоторых ферментов, усиления метаболизма. Вероятно именно благодаря столь широкому спектру своего фармакологического действия он оказывает более выраженный

защитный эффект репродуктивной системы отравленных диоксином животных по сравнению с витамином Е.

ВЫВОДЫ

1. Диоксин в дозе 0,3 мкг/кг массы тела (1/200 ЛД₅₀) при пероральном ежедневном введении белым крысам в течение 17 суток оказывает выраженное эмбриотоксическое и тератогенное действие, проявляющееся увеличением гибели эмбрионов до- и после имплантации, общей эмбриональной смертности, задержкой окостенения осевого скелета, отставанием постнатального развития, гибелью 80% приплода.

Пероральное введение димефосфона в дозе 90 мг/кг массы тела уменьшает эмбриотоксическое и тератогенное действие диоксина: снижаются гибель эмбрионов до имплантации на 27%, после имплантации на 38%, общая эмбриональная смертность - на 59%, сокращается задержка внутриутробного развития плода. У крысят, родившихся от самок отравленных диоксином и получавших димефосфон, отмечается более значительный прирост массы тела к 28-му дню жизни, снижается падеж.

Результаты, полученные в опытах на кроликах, сопоставимы с данными исследований, проведенных на белых крысах.

2. Диоксин в дозе 0,3 мкг/кг при ежедневном введении самцам белых крыс в течение 30 суток, при отсутствии видимых признаков интоксикации, обладает выраженным гонадотоксическим действием, характеризующимся нарушением сперматогенеза (слущивание сперматогенного эпителия, уменьшение количества клеток Сертоли, наличие участков беспорядочно расположенных сперматогенных клеток различной генерации, дистрофические изменения в канальцах семенников).

Димефосфон в дозе 90 мг/кг массы тела снижает гонадотоксическое действие диоксина (улучшается сперматогенез: сокращается количество канальцев со слущиванием сперматогенного эпителия и увеличивается число канальцев с морфологически завершенным сперматогенезом), способствует нормализации гематологических и биохимических показателей самцов белых крыс, отравленных диоксином.

3. Витамин Е в дозе 1,5 мг/кг массы тела уменьшает эмбриотоксическое, тератогенное и гонадотоксическое действие диоксина (снижается гибель эмбрионов до имплантации - на 24%, после имплантации - на 12%, общая эмбриональная смертность - на 11%, уменьшается падеж приплода, улучшается сперматогенез).
4. Димефосфон, по сравнению с витамином Е, оказывает более выраженное лечебное действие на воспроизводительную функцию животных отравленных диоксином. Гематологические и биохимические показатели белых крыс при

отравлении диоксином нормализуются в статистически значимых пределах при применении димефосфона и в меньшей степени при использовании витамина Е.

5. Димефосфон, при отравлении белых крыс диоксином, проявляет антиоксидантные свойства, о чем свидетельствует ингибирующее влияние его на интенсивность перекисного окисления липидов (снижается содержание конечного продукта ПОЛ - малонового диальдегида в митохондриях печени).
6. Диоксин в дозе 1 мкг/кг массы тела (1/200 ЛД₅₀), при ежедневном пероральном введении в течение 10 суток самцам белых мышей не оказывает выраженного мутагенного эффекта, о чем свидетельствует низкая частота индуцированных доминантных леталей, которая в зависимости от стадии сперматогенеза находилась в пределах от - 1 до +4%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

В связи с тем, что димефосфон оказывает ингибирующее действие на интенсивность перекисного окисления липидов и проявляет защитные свойства при эмбриотоксическом, тератогенном и гонадотоксическом действии диоксина, рекомендуется использовать его, наряду с витамином Е, в качестве базового лекарственного препарата для коррекции воспроизводительной функции животных при отравлении данным токсикантом.

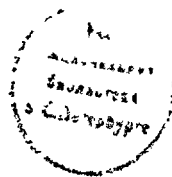
Результаты исследований использованы при разработке «Временного наставления по применению димефосфона при отравлении животных диоксином» и «Временных предельно допустимых концентраций диоксина для различных видов животных», утвержденных директором ФГНУ ВНИВИ в 2004 году.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Нигматов Д.Х. Эмбриотоксическое действие диоксина при хроническом отравлении животных // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины Ульяновской государственной с- х. академии 25-26 сентября 2003 г. - Ульяновск, 2003. - Т. 1. - С. 171-172.
2. Нигматов Д.Х. Гематологические показатели белых крыс при хроническом отравлении диоксином // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины Ульяновской государственной с- х. академии 25-26 сентября 2003 г. - Ульяновск, 2003. - Т. 1. - С. 184 -185.

3. Нигматов Д.Х. Влияние препарата Д-15 на постнатальное развитие потомства при отравлении диоксином // Материалы Всероссийской научно-практической конференции по актуальным проблемам агропромышленного комплекса. - Казань, 2004. - С. 145 -146.
4. Нигматов Д.Х., Новиков В.А. Коррекция препаратом Д-15 эмбриотоксического действия при отравлении белых крыс диоксином // Материалы Всероссийской научно-практической конференции по актуальным проблемам агропромышленного комплекса. - Казань, 2004. - С. 146-148.
5. Нигматов Д.Х., Новиков В.А. Оценка мутагенного действия диоксина при многократном введении его белым мышам // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. Сборник научных трудов ВНИИСГЭ. М., 2004.-т. 116.-С. 224-227.

15 ИЮН 2005



Подписано в печать 24.05.05. Заказ №. . . . Формат 60x84 1/16.

Тираж 100 экз. Отпечатано на офсетном участке ФГНУ ВНИВИ (г. Казань).

Адрес: 420075, г. Казань, Научный городок-2. _____