 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

**АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ**

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА**

**“ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ”**

**Іванова Любов Петрівна**

УДК 615.9+632.95+612.6+591.16

**ВІКОВА ЧУТЛИВІСТЬ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ ДО ДІЇ АНТИХОЛІНЕСТЕРАЗНИХ ІНСЕКТИЦИДІВ ДИМЕТОАТУ   
ТА КАРБОФУРАНУ**

**(експериментальні дослідження)**

14.03.06 – токсикологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

**Київ – 2009**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в ДП Інститут екогігієни і токсикології ім. Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров’я України.

**Науковий керівник**

доктор медичних наук, член-кореспондент АМН України, професор **Проданчук Микола Георгійович,** ДП Інститут екогігієни і токсикології ім. Л.І. Медведя МОЗ України, директор

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор **Овсяннікова Людмила Михайлівна,** Науковий Центр радіаційної медицини АМН України, провідний науковий співробітник лабораторії молекулярної біології;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Леоненко Ольга Броніславівна,** ДУ “Інститут медицини праці АМН України”, провідний науковий співробітник лабораторії медико-біологічних критеріїв професійних впливів.

Захист відбудеться “ 17 ” червня 2009 року о 1300 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ “Інститут фармакології та токсикології АМН України” (03680, м. Київ, вул. Ежена Потьє, 14).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ “Інститут фармако­логії та токсикології АМН України” (03680, м. Київ, вул. Ежена Потьє, 14).

Автореферат розісланий “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2009 р.

**Вчений секретар**

**спеціалізованої вченої ради,**

**кандидат біологічних наук І.В. Данова**

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** В останні десять років в Україні спостерігається погіршення демографічної ситуації, яка характери­зується зниженням народжуваності, підвищенням загальної смертності, високим рівнем безпліддя, дитячої і материнської смертності   
(В.Н. Запорожан та ін., 2002; А.І. Жабченко, 2003; Н.Г. Гойда, 2004;   
С.І. Мельник, 2006). Рівень депопуляції в Україні є одним з найвищих на Європейському континенті, при цьому динаміка дітородної активності населення продовжує погіршуватися.

Оскільки репродуктивне здоров’я людини є важливою передумовою сприятливих демографічних перспектив нації, розробка заходів, спрямованих на його покращення постає як одне з найактуальніших завдань системи охорони здоров’я сьогодення   
(Л.М. Піотрович, 2002; З.С. Гладун, 2005; С.М. Омельянець, 2005;   
К.Л. Шатилович, 2006).

Враховуючи важливість проблеми, в більшості розвинених країн світу вирішення питань, пов’язаних з профілактикою патології репродуктивної функції, висувається на рівень державних завдань, а їх виконання забезпечується державними програмами. Шляхи виходу з демографічної кризи в Україні передбачені Державною програмою “Репродуктивне здоров’я нації”, що передбачає створення умов безпечного материнства та формування репродуктивного здоров’я у дітей та молоді (**Постанова Кабінету Міністрів України №1849** від 27 грудня 2006 року).

Кожна нова сходинка досягнень людства, на жаль, тягне за собою й деякі негативні наслідки здобутків цивілізації, зокрема з кожним роком зростає навантаження сільськогосподарських угідь пестицидами та агрохімікатами, які поряд з цілеспрямованою дією, можуть чинити шкідливу дію на організм людини, впливаючи через повітря, воду та харчові продукти; серед них значну частину складають фосфорорганічні (ФОС) та карбаматні сполуки (П.Г. Жмінько, 2005;   
P. Wilsont et al., 2006; M. Yamamoto et al., 2007; И.В. Мудрый, 2008;   
Y. Yao et al., 2008; Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні, 2008).

Широке коло дослідників звертає увагу на те, що ці пестициди, навіть на рівні низьких концентрацій, можуть викликати зниження опірності організму до дії окремих екзогенних та ендогенних факторів, викликати функціональні, метаболічні, гематологічні та імунологічні порушення, спричиняти гонадотоксичну, ембріотоксичну, канцерогеннута мутагенну дію (R. Gupta, 2005; М.Г. Проданчук та ін., 2005; S. Padilla et al. 2006; Goldman L.R., 2007; Н.Д. Шихнабиева, 2008; J.F. Muniz et al., 2008; Е. Hodgson, R.L. Rose, 2008; D. Želježić et al., 2008).

Як в епідеміологічних, так і в експериментальних дослідженнях доведений зв’язок впливу пестицидів з порушеннями репродуктивної системи (Н.Р. Шепельская, 2006; М.Г. Проданчук та ін., 2007; S.C. Joshi, 2007; **H.R. Andersen** et al., 2008; R.J. Peiris-John, R. Wickremasinghe, 2008; G. [Toft](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Toft%20G%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus) et al., 2008).

В цьому сенсі найбільшу тривогу викликає контингент населення, що відноситься до груп ризику, зокрема діти та підлітки. Серед численних факторів, які зумовлюють особливості реакцій організму на вплив ксенобіотиків, вік займає одне з центральних місць. Інтерес до вивчення вікових аспектів чутливості організму до ксенобіотиків викликаний насамперед тим, що в зв’язку з наявністю фізіологічних особливостей організму, діти є більш чутливими до дії токсичних речовин в порівнянні з дорослою людиною (Є.О. Антонович,   
А.Є. Подрушняк, 1998; М.Г. Проданчук та ін., 2001; D.T. Weigle, 2003; І.М. Прищепа, 2006; В.И. Черний и др., 2007; C. Lu et al., 2008).

Питання щодо вікової чутливості організму ссавців до дії пести­цидів мало розроблені та неоднозначні, особливо це стосується вікової чутливості репродуктивної системи. Разом з тим, розвиток вікової токсикології необхідний для вдосконалення підходів до наукового обґрунтування токсиколого-гігієнічних регламентів та методології оцінки небезпечності пестицидних препаратів для захисту критичних груп населення (А.Г. Сухарев, 2002; І.М. Трахтенберг, 2006; Е.Л. Левицкий, 2006; J. Jurewicz, 2006; B. Gadagbui еt al., 2006; Т. Damstra, 2007).

Отже, зважаючи на те, що порушення репродуктивної функції людини є вкрай важливою медико-соціальною проблемою, в цій роботі в експерименті на щурах було вивчено репродуктивну токсичність окремих пестицидів (фосфорорганічного – диметоату та карбаматного – карбофурану) у віковому аспекті для вдосконалення методологічних підходів до оцінки безпечності їх застосування для здоров’я людини.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалась за основним планом науково-дослідних робіт ДП Інститут екогігієни і токсикології ім. Л.І. Медведя за проблемою “Екогігієна і токсикологія” в плані виконання загальної теми “Наукове обґрунтування безпечності для здоров’я людини нових технологій, речовин, матеріалів, виробів, об’єктів довкілля, харчових продуктів та продовольчої сировини; розробка відповідних медичних критеріїв і показників (санітарних та епідеміологічних); санітарно-хімічна, токсиколого-гігієнічна оцінка, регламентація, нормування” (державний реєстраційний №0100U000254), що виконувалась на замовлення МОЗ України: “Оцінка небезпечності пестицидів і агрохімікатів за критерієм ендокринних порушень” (державний реєстраційний №0106U001200) та “Розробка методичних підходів до оперативної екогігієнічної оцінки небезпеки та прогнозу ситуаційного ризику щодо формування асортименту та обсягів пестицидів в сільському господарстві України” (державний реєстраційний №0101U000802).

**Мета роботи.** Порівняльна оцінка чутливості репродуктивної системи самців та самок щурів лінії Wistar на різних етапах постнатального онтогенезу до діїантихолінестеразних інсектицидів диметоату та карбофурану.

**Задачі роботи:**

1. Вивчити токсичну дію диметоату та карбофурану на стан репродуктивної системи статевозрілих самців та самок щурів Wistar.

2. Оцінити токсичний вплив досліджуваних інсектицидів на стан репродуктивної системи ювенільних (статевонезрілих) самців та самок щурів Wistar.

3. Визначити безпечні рівні впливу карбофурану та диметоату на репродуктивну функцію самок та самців щурів Wistar різного віку з урахуванням дії на ендокринну функцію яєчників та сім’яників.

4. Провести порівняльний аналіз статевої та вікової чутливості репродуктивної системи лабораторних тварин до дії досліджуваних сполук.

5. Оцінити ступінь небезпечності пестицидів диметоату та карбофурану для репродуктивної системи людини на основі особливостей вікової чутливості та дати рекомендації щодо безпечного їх застосування.

*Об’єкт дослідження*. Репродуктивна токсичність пестицидів.

*Предмет дослідження*. Особливості чутливості в залежності від віку репродуктивної системи щурів лінії Wistar до токсичного впливу диметоату та карбофурану.

*Методи дослідження*. При виконанні роботи для оцінки впливу пестицидів на репродуктивну систему лабораторних тварин використані сучасні токсикологічні, фізіологічні, цитологічні, патоморфологічні, біохімічні та статистичні методи дослідження.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Отримані нові дані щодо вікової та статевої чутливості репродуктивної системи щурів лінії Wistar до токсичної дії диметоату та карбофурану. Вперше доведено, що при субхронічному впливі цих пестицидів в період, коли відбувається постнатальний розвиток та дозрівання статевої функції самців, відмічається підвищена чутливість репродуктивної системи до дії досліджуваних речовин порівняно з статевозрілими тваринами. У самок щурів вікової чутливості до токсичного впливу диметоату та карбофурану не виявлено.

Поглиблені уявлення про механізм токсичного впливу досліджуваних речовин на репродуктивну систему. Показано,що один із механізмів токсичного впливу диметоату на репродуктивну здатність дослідних тварин пов’язаний з його дією на гормональну **регуляцію статевої функції, що** викликає у самок – порушення нормального співвідношення естрадіолу і прогестерону плазми крові та спричиняє порушення процесів овуляції, зачаття і розвитку плодів; у самців – зниження рівня тестостерону плазми крові, що призводить до зменшення рухливості сперміїв, послаблюючи фертильність самців.

На підставі аналізу та співставлення морфо-функціональних особливостей розвитку статевої системи щурів та людини визначений віковий період лабораторних тварин, що відповідає пубертатному віковому періоду людини.

Вперше визначені безпечні рівні впливу диметоату та карбофурану на репродуктивну систему тварин різних вікових груп з урахуванням дії на ендокринну функцію яєчників самок та ендокринну функцію сім’яників самців.

**Практична значимість одержаних результатів.** За результатами проведених досліджень науково обгрунтована необхідність перегляду існуючих в Україні величин ДДД діючих речовин пестицидів диметоату та карбофурану з урахуванням токсичної дії на репродуктивну систему молодого організму.

Отримані дані щодо недіючих рівнів впливу диметоату та карбофурану на репродуктивну систему використані для оцінки ступеня потенційної небезпечності цих пестицидів для репродуктивного здоров’я людини та вирішення питань щодо умов державної реєстрації та застосування препаратів на їх основі в сільському господарстві України.

Науково обгрунтована доцільність проведення досліджень гонадотоксичності пестицидів на щурах одномісячного віку, які знаходяться в періоді розвитку та становлення статевої системи і є найбільш чутливими до впливу токсикантів.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес на кафедрах акушерства, гінекології та перинатології; неонатології; медицини невідкладних станів; гігієни та екології людини Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем здійснено літературний та патентний пошуки, проаналізована вітчизняна та зарубіжна література за темою дисертації, опановано методики, необхідні для реалізації завдань дисертаційної роботи. Викладені у дисертації результати експериментальних та теоретичних досліджень проведені автором особисто.

Автором самостійно проведено статистичну обробку, аналіз та узагальнення одержаних результатів роботи, сформульовані основні положення та висновки.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації викладені та обговорені на наукових форумах різного рівня: I з’їзді Токсикологів України (Київ, 2001); Х Інтернаціональному конгресі токсикологів “ICTX-2004” (Фінляндія, Тампере, 2004); II з’їзді Токсикологів України (Київ, 2004); ІХ Міжнародному медичному конгресі студентів і молодих учених (Тернопіль, 2005); 42-му Міжнародному Європейському конгресі токсикологів “EUROTOX-2006” (Хорватія, Цавтат, 2006), VІI міжнародній науково-практичній конференції “Актуальні проблеми токсикології. Безпека життєдіяльності людини» (Київ, 2007) та науково-практичній конференції “Вікові аспекти схильності організму до шкідливого впливу ксенобіотиків” (Чернівці, 2008).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 11 наукових робіт, з яких 4 статті – у фахових наукових виданнях, що входять до Переліку ВАК України та 7 – у матеріалах та тезах науково-практичних конференцій і з’їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертацію викладено на 148 сторінках. Вона складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, 4-х розділів результатів експериментальних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій та списку використаних джерел, що включає 271 роботу, з них 211 – в іноземних виданнях. Роботу проілюстровано 49 таблицями та 12 рисунками.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Матеріали та методи дослідження.** Матеріалом наших досліджень були обрані ФОС – диметоат і карбаматна сполука – карбофуран, що широко використовуються у сільському господарстві України як діючі речовини пестицидних препаратів з інсектицидною дією.

Вибір препаратів зумовлений їх здатністю на низьких рівнях доз токсично впливати на репродуктивну систему, а також неоднозначністю існуючих наукових даних стосовнонедіючих рівнів впливу на репродуктивну функцію. В літературі висвітлені в основному ефекти токсичності диметоату та карбофурану, які ґрунтуються на антихолінестеразній активності, а механізми впливу на репродуктивну систему є недостатньо вивченими.

Враховуючи важливість екстраполяції даних з лабораторних тварин на людину, була здійснена детальна оцінка існуючих літературних даних щодо періодів розвитку лабораторних щурів та проведено співставлення їх з такими у людини.

На основі аналізу данихщодо параметрів розвитку репродуктивної системи встановлено, що еквівалентним пубертатному віку людини (12-17 років) є вік білих щурів 40-90 днів, а віком настання їх статевої зрілості можна вважати 55 днів для самок та 90 днів для самців.

Дослідження були проведені на 500 статевозрілих (віком 90-100 днів) та 500 ювенільних – статевонезрілих (віком 30 днів) щурах лінії Wistar у відповідності з сучасними правилами роботи з лабораторними тваринами та згідно з міжнародними принципами біоетики.

Ювенільні та статевозрілі тварини отримували досліджувані речовини у вигляді свіжеприготованої водної суспензії щодня, крім суботи та неділі, в умовах субхронічного введення у такому дозовому режимі: диметоат в дозах: 0,01 мг/кг та 0,1 мг/кг маси тіла протягом 10 тижнів; карбофуран в дозах: 0,02 мг/кг та 0,1 мг/кг протягом 12-16 тижнів (самці) і 9 тижнів (самки). Контрольні тварини отримували воду з емульгатором ОП-7 в еквівалентних кількостях.

Введення робочих розчинів лабораторним тваринам здійснювали внутрішньошлунково за допомогою зонду. При вивченні впливу диметоату і карбофурану на рівень статевих гормонів плазми крові експеримент проводили за умов введення речовин з питною водою.

Протягом останніх 2-х тижнів періоду затравки у дослідних та контрольних самок вивчали циклічність і тривалість естрального циклу. Після|потім| закінчення періоду затравки самок та самців спарювали (у співвідношенні 1 самець до 2 самок|самиць|): дослідних самців із кожної групи спарювали з|із| інтактними| самками|самицями|, дослідних самок|самиці| – з|із| інтактними| самцями; контрольні самці та самки спарювались між собою. Тривалість періоду спарювання не перевищувала 3-х тижнів.

З першого дня підсаджування інтактних самців до дослідних самок та дослідних самців до інтактних самок, протягом всього періоду спарювання, щоранку готували вагінальні| мазки для кожної самки|самиці|, які досліджували на наявність сперматозоїдів для визначення моменту спарювання.

Після|потім| встановлення факту спарювання самку|самицю| відсаджували в окрему клітку|клітину|; день виявлення сперміїв у вагінальному| вмісті самки|самиці| приймали за нульовий день вагітності.

І|самиць|ІІІнтактних самок, спарених із дослідними самцями та дослідних самок, що завагітніли від інтактних самців, умертвляли на 20-й день вагітності шляхом розташування їх у камері з парами хлороформу. Потім, розтинаючи черевну порожнину і вилучаючи та розтинаючи матку, проводили для кожної самки реєстрацію показників, що характеризують стан функції відтворення.

Після закінчення запланованого періоду затравки самців (по 10 тварин з кожної групи), яких відбирали у довільному порядку, було використано для вивчення морфо-функціональних показників стану сім’яників та визначення маси сім’яників і придатків.

Для визначення рівня статевих гормонів плазми крові після закінчення запланованого періоду затравки проводили забір крові з вени стегна тварин (забір крові у самок проводили в стадію еструсу). Принцип методу полягає у конкуренції між адсорбованим на поверхні лунок планшета гормоном і вільним гормоном за активні центри зв’язування антитіл до відповідного гормону.

Оцінка впливу на репродуктивну систему зазначених пестицидів проводилась за допомогою сучасних фізіологічних, цитологічних, патоморфологічних та біохімічних методів шляхом:

– вивчення ознак загально-токсичної дії;

– цитологічного дослідження вагінальних| мазків з метою визначення циклічності та характеристики естрального циклу (тривалості всього естрального| циклу, а також частоти і тривалості його окремих фаз);

– визначення морфо-функціональних показників стану сім’яників (загальної кількості, кількості рухливих, нерухомих, патологічних форм сперматозоїдів, тривалості рухової активності сперміїв);

– оцінки показників, що характеризують стан функції відтворення: загальної|спільна| кількості жовтих тіл в яєчниках; кількості місць імплантації; кількості резорбованих| зародків і плодів; кількості мертвих плодів; кількості живих|жвавих| плодів; наявності грубих аномалій розвитку у|біля,в| плодів; середньої маси плодів;

– розрахунку |здібноіндексів спарювання, зачаття, вагітності і фертильності, величини прекоітального інтервалу;

– макроскопічного обстеження внутрішніх органів грудної і черевної порожнин та реєстрації виявлених змін і відхилень;

– визначення рівня статевих гормонів плазми крові.

1. Експериментальні дослідження виконувалися за класичною загальноприйнятою схемою проведення токсикологічних субхронічних досліджень на лабораторних тваринах (“Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов”, 1988) у відповідності до сучасних міжнародних вимог OECD (Guideline for testing of chemicals. One-generation reproduction toxicity study, 1983; Guideline for testing of chemicals. Two-generation reproduction toxicity study, 2001), EPA (Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, 1996) та WHO (Principles for evaluating health risks to progeny associated with exposure to chemicals during pregnancy, 1984).

Визначення вмісту тестостерону, естрадіолу та прогестерону проводили за допомогою конкурентного варіанту твердофазного імуноферментного аналізу. Для проведення досліджень були використані відповідні комерційні набори для кількісного визначення естрадіолу, прогестерону та тестостерону в біологічних рідинах тварин методом імуноферментного аналізу, виробництва Всеросійського державного науково-дослідного інституту контролю, стандартизації і сертифікації ветеринарних препаратів, Росія (ИФА – АФ – Эстрадиол ТУ №9388 – 009– 54919320– 01; ИФА – АФ – Прогестерон ТУ №9388 – 002 – 54919320 – 01; ИФА – АФ – Тестостерон ТУ №9388 – 010 – 54919320 – 01). Після закінчення ферментативної реакції оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі вертикального сканування Labsystems Multiscan PLUS при довжині хвилі 450 нм.

Отримані результати досліджень піддавали статистичному аналізу з визначенням середньої арифметичної величини (М), середнього квадратичного відхилення (σ), похибки середньої арифметичної (m), критерію Стьюдента (t) та показника достовірності (р); зміни вважали достовірними при р<0,05 [240, 241]. Статистична обробка проводилась за допомогою комп’ютерних програм Microsoft Excel та Statistica for Windows 4.5, StatSoft Inc., 1993.

**Результати досліджень та їх обговорення.** В результаті проведених досліджень показано, що у самок, які отримували диметоат в дозі 0,1 мг/кг у статевозрілому віці,спостерігався токсичний ефект на репродуктивну функцію, який виражався зниженням індексу зачаття (на 25%; р<0,02) та підвищенням (в 1,9 рази; р<0,05) рівня естрадіолу плазми крові дослідних тварин (рис. 1).

Рівень естрадіолу в плазмі крові

|  |  |
| --- | --- |
| Індекс зачаття  **\***  **Доза диметоату, мг/кг**  **%** | **\***  **Доза диметоату, мг/кг**  **пг/мл** |

Рис. 1. Вплив диметоату на репродуктивну функцію самок, що отримували речовину в статевозрілому віці (тут і далі в рис. 2-7:   
\* – р<0,05 – у порівнянні з контролем)

У самок цієї групи також відмічена тенденція до зниження індексу фертильності та кількості живих плодів у посліді.

У самців, при дії диметоату в дозі 0,1 мг/кг, тільки дещо збільшувалась довжина прекоітального інтервалу.

В результаті проведеного експерименту встановлено, що недіюча доза (NOЕL) для диметоату за критерієм репродуктивної токсичності для статевозрілих самців щурів Wistar становить – 0,1 мг/кг, а для самок – 0,01 мг/кг маси тіла.

Одночасно у тварин, що отримували диметоат з ювенільного віку в дозі 0,1 мг/кг, токсичний ефект на репродуктивну функцію спостерігається як у самців, так і у самок.

Цей ефект у самців проявлявся зниженням кількості рухливих сперміїв (в 1,4 рази; р<0,02), тривалості їх рухової активності (на 12%; р<0,01) та зниженням рівня тестостерону плазми крові в 2,9 рази; р<0,05 (рис. 2).

Рівень тестостерону в плазмі крові

Тривалість рухової активності сперміїв

Кількість рухливих сперміїв

**млн**

**хв.**

**нг/мл**

**\***

**\***

**\***

**Доза диметоату, мг/кг**

**Доза диметоату, мг/кг**

**Доза диметоату, мг/кг**

Рис. 2. Вплив диметоату на репродуктивну функцію самців, що отримували речовину з ювенільного віку

Негативний вплив диметоату (у дозі 0,1 мг/кг) на репродуктивну систему самців виражався також у зниженні індексів зачаття (на 22%; р<0,05) і фертильності (на 25%; р<0,05), збільшенням кількості доімплантаційної (на 11%; р<0,05) і післяімплантаційної (на 8,8%; р<0,05) загибелі зародків та зменшенні середньої кількості живих плодів (в 1,3 рази; р<0,05) у посліді інтактних самок, що з ними спарювались (рис. 3, 4).

Індекс фертильності

Індекс зачаття

**%**

**%**

|  |  |
| --- | --- |
| **\***  **Доза диметоату, мг/кг** | **\***  **Доза диметоату, мг/кг** |

Рис. 3. Вплив диметоату на індекси, що характеризують репродуктивну функцію інтактних самок, спарених з самцями, що отримували речовину з ювенільного віку

Кількість живих плодів у посліді

Постімплантаційна загибель плодів

Доімплантаційна загибель плодів

**%**

|  |  |
| --- | --- |
| **Доза диметоату, мг/кг**  **\*** | **\***  **Доза диметоату, мг/кг**  **\***  **%**  **Доза диметоату, мг/кг** |

Рис. 4. Вплив диметоату на кількість плодів у посліді інтактних самок, спарених з самцями, що отримували речовину з ювенільного віку

Безпосередня токсична дія на репродуктивну систему самок, що отримували диметоат до настання статевої зрілості в дозі 0,1 мг/кг, виражалась зменшенням індексів зачаття (на 30%; р<0,01) і фертильності (на 25%; р<0,05), а також підвищенням (в 2,6 рази; р<0,05) рівня естрадіолу плазми крові (рис. 5).

Індекс фертильності

Індекс зачаття

Рівень естрадіолу в плазмі крові

**пг/мл**

**%**

**%**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **\***  **Доза диметоату, мг/кг** | **Доза диметоату, мг/кг**  **\*** | **\***  **Доза диметоату, мг/кг** |

Рис. 5. Вплив диметоату на репродуктивну функцію самок, що отримували речовину з ювенільного віку

Крім того, у самок цієї групи зареєстровано збільшення довжини прекоітального інтервалу і тенденція до зниження кількості живих плодів у посліді.

Тобто, в умовах проведеного експерименту NOЕL за параметрами репродуктивної токсичності для ювенільних самок і самців щурів Wistar знаходився на рівні 0,01 мг/кг маси тіла.

Порівнюючи результати досліджень, проведених нами на самцях і самках щурів лінії Wistar, що зазнали впливу ***диметоату*** з 3-х місячного та 1-місячного віку (в дозах 0,01 мг/кг та 0,1 мг/кг протягом 10 тижнів), можна зазначити, що у самок обох вікових груп, при дії диметоату в дозі 0,1 мг/кг спостерігались однонаправлені патологічні зміни репродук­тивної функції. Оцінюючи характер отриманих даних,слід відмітитиоднаковий ступінь вираженості цих змін. Отже, в зазначених умовах досліджень на самках їх вікова чутливість до дії диметоату була відсутня.

На відміну від самок, у самців щурів Wistar спостерігалась чутливість до впливу диметоату тільки у тих особин, що отримували диметоат з першого місяця життя, тобто в ювенільному періоді; виявлений токсичний ефект мав чітку залежність «доза-ефект».

Оцінюючи результати досліджень щодо дії другої досліджуваної речовини – карбофурану на тварин можна зазначити, що у щурів, які отримували карбофуран у статевозрілий період в дозі 0,1 мг/кг, спостерігалась лише тенденція до зниження фертильності самців. Тому, в умовах проведеного експерименту недіюча доза (NOEL) для карбофурану за репродуктивною токсичністю для статевозрілих щурів (самців і самок) встановлена на рівні 0,1 мг/кг маси тіла.

При аналізі даних щодо ведення карбофурану самцям з ювенільного віку встановлена токсична дія на репродуктивну функцію в дозі 0,1 мг/кг, яка полягала в достовірному збільшенні кількості патологічних форм сперматозоїдів (в 3,4 рази; р<0,05) та зниженні тривалості рухової активності сперміїв на 10%, р<0,02 (рис. 6), а також зниженні індексу зачаття (на 16%; р<0,05) та збільшенні кількості загиблих до імплантації зародків (в 2,1 рази; р<0,01)в групі інтактних самок, що з ними спарювалась (рис. 7).

Тривалість рухової активності сперміїв

Кількість патологічних форм сперматозоїдів

|  |  |
| --- | --- |
| **хв**  **\***  **Доза карбофурану, мг/кг** | **\***  **%**  **Доза карбофурану, мг/кг** |

Рис. 6. Вплив карбофурану на репродуктивну функцію самців, що отримували речовину з ювенільного віку

Кількість загиблих до імплантації зародків

Індекс зачаття

|  |  |
| --- | --- |
| **Доза карбофурану, мг/кг**  **%**  **\*** | **Доза карбофурану, мг/кг**  **\*** |

Рис. 7. Вплив карбофурану на репродуктивну функцію інтактних самок, спарених з самцями, що отримували речовину з ювенільного віку

Також у цій групі інтактних самок зареєстрована тенденція до зниження середньої кількості живих плодів у посліді.

Статистично достовірних змін показників стану репродуктивної функції дослідних самок, що зазнали впливу карбофурану, в даному експерименті не виявлено. Однак спостерігалась тенденція до зниження індексів зачаття і фертильності та кількості живих плодів у посліді.

За підсумками даного експерименту недіючою дозою (NOЕL) за репродуктивною токсичністю для ювенільних (статевонезрілих) щурів Wistar можна вважати дози: 0,02 мг/кг для самців та 0,1 мг/кг – для самок.

Отже, аналізуючи отримані дані щодо субхронічного впливу ***карбофурану*** на самців та самок щурів Wistar в двох серіях досліджень, де в одному експерименті використані тварини, що досягли одномісячного віку (ювенільний період), а в іншому карбофуран в тому ж режимі отримували тварини з тримісячного віку (статевозрілий період), можна зробити висновок, що в зазначених умовах експерименту карбофуран не чинить токсичної дії на репродуктивну систему статевозрілих самців та самок. При дії карбофурану в тих самих дозах (0,02 мг/кг та 0,1 мг/кг) на самців та самок з ювенільного віку виявлена токсична дія речовини в дозі 0,1 мг/кг на репродуктивну функцію самців; порушень репродуктивної функції самок не виявлено.

Таким чином, дослідження токсичного впливу диметоату та карбофурану на репродуктивну функцію тварин різних вікових груп показало, що при дії у віковий період, коли відбувається постнатальний розвиток та дозрівання статевої функції самців, відмічається підвищена чутливість репродуктивної системи до впливу досліджуваних речовин порівняно з статевозрілими тваринами. Це дозволяє рекомендувати використовувати ювенільних самців лабораторних щурів в токсикологічних експериментах для найбільш вірогідного встановлення впливу пестицидів на організм, зокрема репродуктивної токсичності.

Поясненням можливого механізму підвищеної чутливості незрілих самців може бути те, що **за** літературними **даними,** формування сперматогоній відбувається у тестікулах ще у внутрішньоутробному періоді, а процес подальшого дозрівання сперматозоїдів є багатостадійним процесом і відбувається циклічно кожні 70 днів як у дорослих, так і у ювенільних особин. Тестикулярні ж клітини Сертолі і Лейдіга, що відповідають за продукцію чоловічого статевого гормону, трофіку та формування мікрооточення гермінативних клітин і, таким чином, відіграють ключову роль у забезпеченні репродуктивної здатності самців, активно диференціюються в тестикулах в препубертатний та пубертатний періоди [R.M. Sharpe et al., 1998,   
L. O’Donnell et al., 2001; S.M.L.C. Mendis-Handagama, H.B.S. Ariyaratne, 2001].

Аналіз даних щодо постнатального розвитку репродуктивної системи самців щурів, дає підставу вважати, що первинною мішенню токсичної дії досліджуваних сполук на незрілі гонади є не сперматогенні клітини, а тестикулярні клітини Сертолі і Лейдіга. Це призводить до їх пошкодження, викликаючи зміну функціонального стану статевих залоз і сприяючи тим самим гормональній та гермінативній недостатності сім’яників, що проявляється у зниженні фертильності самців.

Одержані нами дані дозволяють надати науково обґрунтовані рекомендації щодо безпечних рівнів впливу диметоату та карбофурану на репродуктивну функцію людини з урахуванням вікового аспекту та рекомендувати величини ДДД диметоату на рівні 0,0001 мг/кг, (виходячи з NOЕL – 0,01 мг/кг та коефіцієнту запасу 100); ДДД карбофурану – 0,0002 мг/кг (виходячи з NOЕL – 0,02 мг/кг та коефіцієнту запасу 100).

**ВИСНОВКИ**

У дисертаційній роботі в умовах субхронічного експерименту досліджено характер впливу пестицидів диметоату та карбофурану на репродуктивну систему, встановлено виражену залежність дії досліджуваних речовин від віку та статі, визначені безпечні рівні впливу цих пестицидів за критеріями гонадоксичності, поглиблені уявлення про механізм їх токсичності, що дозволило науково обґрунтувати необхідність перегляду існуючих величин допустимих добових доз діючих речовин диметоату і карбофурану, які широко застосовуються в сільському господарстві України.

1. Диметоат при субхронічному впливі на статевозрілих самок у дозі 0,1 мг/кг спричиняє токсичний ефект на репродуктивну функцію, який виражається зниженням індексу зачаття на 25% і підвищенням рівня естрадіолу плазми крові в 1,9 рази; при введенні в ювенільний період призводить до зменшення індексу зачаття на 30%, індексу фертильності на 25% і підвищення рівня естрадіолу плазми крові в 2,6 рази, що свідчить про відсутність вікової чутливості самок до дії диметоату.

2. Диметоат не чинить токсичної дії на репродуктивну систему статевозрілих самців; у тварин, які зазнавали дії досліджуваної речовини у дозі 0,1 мг/кг з ювенільного віку, токсичний вплив проявляється: у самців – зниженням кількості рухливих сперміїв в 1,4 рази, тривалості їх рухової активності на 12%, рівня тестостерону плазми крові в 2,9 рази; у спарених з ними інтактних самок – зниженням індексу зачаття на 22%, індексу фертильності на 25%, збільшенням кількості доімплантаційної на 11% і післяімплантаційної на 8,8% загибелі зародків та зменшенням кількості живих плодів в 1,3 рази, що вказує на підвищену чутливість до дії диметоату репродуктивної системи ювенільних самців порівняно з статевозрілими щурами.

3. Субхронічне надходження карбофуранув організм самок щурів не порушує вивчені показники репродуктивної функції тварин обох вікових груп, тобто чутливість репродуктивної системи самок до його токсичної дії не залежить від віку.

4. Встановлено, що карбофуран не викликає патологічних змін показників стану репродуктивної системи статевозрілих самців; в той час, як у тварин, що отримували речовину за умов субхронічного введення з ювенільного віку, токсична дія в дозі 0,1 мг/кг призводить до збільшення кількості патологічних форм сперматозоїдів в 3,4 рази і зниженні тривалості їх рухової активності на 10%, а також у зниженні індексу зачаття на 16% і збільшенні кількості загиблих до імплантації зародків в 2,1 рази у спарених з ними інтактних самок, що вказує на різну вікову чутливість репродуктивної системи самців, а саме підвищення гонадотоксичної дії карбофурану в період розвитку та дозрівання статевої системи.

5. Недіюча (підпорогова) доза (NOЕL) диметоату для статевозрілих самців щурів становить 0,1 мг/кг, для самок – 0,01 мг/кг; для ювенільних самців і самок – 0,01 мг/кг.

6. NOЕL карбофурану для статевозрілих щурів (самців і самок) становить 0,1 мг/кг; для ювенільних самок – 0,1 мг/кг і для самців –   
0,02 мг/кг.

7. За результатами проведених експериментальних досліджень нау­ково обгрунтована необхідність перегляду існуючих в Україні величин ДДД діючих речовин пестицидів диметоату та карбофурану з ураху­ванням токсичної дії на репродуктивну систему молодого організму.

**ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

1. При ідентифікації токсичних властивостей та встановленні ДДД диметоату та карбофурану репродуктивна токсичність повинна розглядатись як лімітуючий показник.

2. З метою вдосконалення методичних підходів до вивчення токсичності пестицидів та запобігання негативного впливу на критичні групи населення рекомендується використовувати розроблену і науково обґрунтовану модель експериментальної оцінки на щурах ювенільного віку, що враховує вікову чутливість репродуктивної системи до дії пестицидів.

СПИСОК РОБІТ, опублікованих ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Петрашенко Л.П. Вплив інсектициду карбофурану на функцію гонад та фертильність щурів Wistar / Н.Р. Шепельська, С.Д. Сапожнікова, Л.П. Петрашенко // Современные проблемы токсикологии. – 2001. – №3. – С. 40-45 (дисертант брала участь у проведенні експерименту, статистичній обробці та аналізі результатів, написанні основних розділів статті).

2. Іванова Л.П. Ідентифікація небезпечності для репродуктивної системи інсектициду диметоату / М.Г. Проданчук, Н.Р. Шепельська, Л.П. Іванова [та ін.] // Современные проблемы токсикологии. – 2007.   
– №1. – С. 30-36 (дисертант брала участь у проведенні експерименту, аналізі та узагальненні результатів досліджень, підготовці статті до друку).

3. Іванова Л.П. Експериментальне дослідження впливу інсектициду диметоату на репродуктивну систему самців і самок щурів Wistar раннього віку / Л.П. Іванова, Н.Р. Шепельська, Г.І. Петрашенко // Современные проблемы токсикологии. – 2007. – №3. – С. 53-58 (дисертантом проведено експериментальну частину дослідження, здійснено аналіз та узагальнення результатів, виконано оформлення статті).

4. Іванова Л.П. Вивчення впливу інсектициду карбофурану на репродуктивну систему щурів ювенільного віку / Л.П. Іванова // Современные проблемы токсикологии. – 2008. – №2. – С. 55-60.

5. Петрашенко Л.П. Проблема моделирующего действия пестицидов на эндокринную систему / Н.Р. Шепельська, Л.П. Петрашенко // I з’їзд токсикологів України, 11-13 жовт. 2001 р.: тези доп. – К., 2001.   
– С. 25-26.

6. Petrashenko Lubov. The study of insecticide dimethoate effect on reproductive system in Wistar rats / Mycola Prodanchuk, Lubov Petrashenko, Ninel Shepelskaya // Toxicology and Applied Pharmacology: abstracts.   
– Tampere, 2004. – Vol. 197, №3. – Р. 340-341.

7. Петрашенко Л.П. Експериментальне дослідження ролі статевих гормонів в механізмі репродуктивної токсичності пестициду диметоату / Л.П. Петрашенко // II з’їзд токсикологів України, 12-14 жовт. 2004 р.: тези доп. – К., 2004. – С. 63-64.

8. Іванова Любов. Оцінка ризику застосування диметоату для споживачів сільгосппродукції / Любов Іванова // 9-й Міжнародний медичний конгрес студентів і молодих учених, 21-22 квіт. 2005 р.: матеріали конгресу. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2005. – С. 244.

9. Ivanova Lubov. **Age-dependent** reproductive **toxicity of** dimethoate **in** female rats / Lubov Ivanova, Ninel Shepelskaya, Igor Lepeshkin [et al.]/ Toxicology Letters: 43rd Congress of the European Societies of Toxicology, 20-24 September 2006: abstracts. – Cavtat, Croatia, 2006. – Vol. 164S.   
– Р. 249.

10. Иванова Л.П. Анализ результатов сравнительного изучения репродуктивной токсичности ряда образцов диметоата, воспроизво­димых различными фирмами КНР / Н.Р. Шепельская, С.Д. Сапожникова, Л.П. Иванова // Актуальні проблеми токсикології. Безпека життєдіяльності людини: VІII між­на­род. наук.-практ. конф., 4-9 червня 2007 р.: тези доп. – К., 2007. – С. 74.

11. Іванова Л.П. Порівняльна оцінка впливу пестициду карбофурану на репродуктивну систему щурів різного віку / Л.П. Іванова // Вікові аспекти схильності організму до шкідливого впливу ксенобіотиків: наук.-практ. конф., 18-19 вересня 2008 р.: тез. доп.   
– Чернівці: Медик, 2008. – С. 65-66.

АНОТАЦІЯ

***Іванова Л.П.*** *Вікова чутливість репродуктивної системи до дії антихолінестеразних інсектицидів диметоату та карбофурану (експериментальне дослідження). – Рукопис.*

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.06 – токсикологія. – ДУ “Інститут фармакології і токсикології АМН України”, Київ, 2009.

Робота присвячена експериментальному вивченню дії диметоату та карбофурану на організм у віковому аспекті, а саме на його важливу ланку – репродуктивну систему, що диктується значним погіршенням репродуктивного здоров’я населення України за останні роки.

Встановлена залежність чутливості репродуктивної системи лабораторних тварин до токсичної дії диметоату і карбофурану від віку: у самців пубертатного періоду виразно спостерігається підвищена чутливість до токсичного впливу диметоату та карбофурану порівняно з статевозрілими тваринами; у самок така залежність не була виявлена.

Показано, що найбільш чутливими до токсичного впливу на репродуктивну систему вивчених пестицидів є статевонезрілі щури чоловічої статі, що дозволяє науково обґрунтувати доцільність їх використання в експерименті з вивчення гонадотоксичності ксено­біотиків для найбільш вірогідного встановлення впливу пестицидів на репродуктивну систему.

За результатами проведених експериментальних досліджень науково обгрунтована необхідність перегляду існуючих в Україні величин ДДД діючих речовин пестицидів диметоату та карбофурану з урахуванням токсичної дії на репродуктивну систему молодого організму.

**Ключові слова:** пестициди, диметоат, карбофуран, репродук­тивна токсичність, вікова чутливість, період статевого дозрівання.

АННОТАЦИЯ

***Иванова Л.П.*** *Возрастная чувствительность репродуктивной системы к действию антихолинэстеразных инсектицидов диметоата и карбофурана (экспериментальное исследование). – Рукопись.*

Диссертация на соискание ученой|снискание| степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.06 – токсикология. – ГУ “Институт фармакологии и токсикологии АМН| Украины”, Киев, 2009.

Диссертация посвящена| экспериментальному изучению действия пестицидов диметоата| и карбофурана| на организм, а именно на одно из важнейших звеньев – репродуктивную систему. Это связано|повязал| с остротой данной проблемы – значительным ухудшением демографической ситуации в Украине, которая выражается в росте бесплодия, невынашивания беременности и врожденных|урожденных| аномалий развития. Наименее исследованным является период развития и дозревания половой системы – тот период, когда можно ожидать наибольшую ее уязвимость.

Выбор исследованных пестицидов, обусловлен их способностью на низких уровнях доз оказывать токсическое действие на репродуктивную систему, а также неоднозначностью существующих научных данных касательно недействующих уровней влияния на репродуктивную функцию. В литературе освещены в основном эффекты токсичности диметоата и карбофурана, которые базируются на антихолинэстеразной активности, а механизмы воздействия на репродуктивную систему являются недостаточно изученными.

Исследования проведены на ювенильных (половонезрелых – возраст 30 дней) и половозрелых (возраст 90-100 дней) крысах линии Wistar. Животные обеих возрастных групп получали вещества в условиях ежедневного внутрижелудочного, субхронического введения в аналогичных дозовых режимах: диметоат в дозах 0,01 мг/кг и 0,1 мг/кг массы тела в течение 10 недель; карбофуран в дозах 0,02 мг/кг и 0,1 мг/кг массы тела в течение 12-16 недель (самцы) и 9 недель (самки).

Показано, что у самок крыс Wistar|, которые|какие| подверглись влиянию диметоата| с одномесячного|лунного| и трехмесячного|лунного| возраста|века|, происходят однонаправленные патологические изменения|смена| репродуктивной функции (снижение индексов зачатия и фертильности, количества живых плодов в помете), то есть в приведенных условиях исследований возрастная чувствительность самок к|до| действию диметоата| отсутствует.

Установлено, что в отличие от самок, у самцов наблюдается чувствительность к|до| влиянию диметоата| только у тех особей, которые получали диметоат| с первого месяца|луны| жизни, т.е. в периоде полового созревания. Токсический эффект диметоата у ювенильных самцов имеет четкую зависимость “доза-эффект” и проявляется снижением количества подвижных сперматозоидов, длительности их двигательной активности, снижением уровня тестостерона плазмы крови, а также снижением индексов зачатия и фертильности, увеличением количеств погибших зародышей и уменьшением среднего количества живых плодов в помете и увеличением длительности прекоитального интервала у интактных самок, которые с ними спаривались.

Под воздействием диметоата у самок выявлено наличие зависимости между повышением уровня эстрадиола| в плазме крови и нарушением других репродуктивных параметров (снижением индексов фертильности| и зачатия)|. Полученные данные дают основание считать, что механизм токсического влияния диметоата| на репродуктивную способность самок связан|повязал| с его действием на гормональную **регуляцию половой функции** через|из-за| гипоталамо-гипофизарно-яичниковую| ось.

Обнаружено|выявляет,проявляет|, что при воздействии карбофурана| на самцов и самок разного|различного| возраста|века|, пестицид не оказывает|оказывает,совершает,чинит| токсического действия на репродуктивную систему половозрелых животных. При действии карбофурана| в тех же дозах на животных ювенильного возраста|века| проявляется токсическое действие вещества на репродуктивную функцию самцов; нарушений репродуктивной функции самок не зарегистрировано.

Токсическое действие карбофурана на репродуктивную систему половонезрелых самцов проявляется в увеличении количества патологических форм сперматозоидов и снижении длительности двигательной активности спермиев, а также снижении индекса зачатия, увеличении абсолютного и относительного количества погибших до имплантации зародышей, тенденции к снижению среднего количества живых плодов в группе интактных самок, которые с ними спаривались.

Таким образом, выявлена различная|различная| возрастная чувствительность репродуктивной системы самцов к|до| действию карбофурана|, а именно чувствительными|чуткими| к|до| его действию являются животные только|только| в период развития и дозревания.

Доказано, что наиболее чувствительными|чуткими| к|до| токсическому влиянию на репродуктивную систему изученных|выученных| пестицидов являются половонезрелые|неполовозрелые| крысы мужского пола, что позволяет научно обосновать целесообразность их использования|употребления| в эксперименте по|с| изучению гонадотоксичности| ксенобиотиков для наиболее достоверного установления влияния пестицидов на репродуктивную систему.

На основании результатов проведенных экспериментальных исследований, научно обоснована необходимость пересмотра существующих в Украине величин ДСД действующих веществ пестицидов диметоата и карбофурана с учетом токсического действия на репродуктивную систему молодого организма.

**Ключевые слова:** пестициды, диметоат, карбофуран, репродуктивная токсичность, возрастная чувствительность, период полового созревания.

**SUMMARY**

***Ivanova L.Р. Reproductive system age-depended sensitivity to pesticides dimethoate and carbofuran toxic effect****. – The Manuscript.*

The Dissertation on the receiving of Candidate of Medical Sciences degree in speciality 14.03.06 – toxicology. – State Institute “Institute of Pharmacology and Toxicology of АМS of Ukraine”, Kyiv, 2009.

The Dissertation covers the experimental investigation of toxic effect of such pesticides as carbofuran and dimethoate on organism of experimental animals (rats) being under different age condition in view of the importance of existing in Ukraine deterioration of human population reproductive function observed recently. The relation of experimental animals reproductive system sensitivity to toxic effect of carbofuran as well as dimethoate with age of animals is defined. The puberty age rat males are more sensitive to the pesticides toxic effect to compare with sexually mature animals while the absence of such dependence for rat females is shown.

The proved fact of greater sensitivity of immature rat male to gonadotoxic effect allows to substantiate their use as a model for xenobiotic gonadotoxic effect assessment. It will allow to clarify the pesticide influence to reproductive system of mammals.

According to the obtained result of carried out study the necessity of established in Ukraine values of ADI for both pesticides carbofuran and dimethoate revision is scientifically proved because of need to consider the revealed pesticides toxic effect on reproductive system of mammals.

**Key words:** pesticides, dimethoate, carbofuran, reproductive system, age-depended sensitivity, puberty.

 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>