

# ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ АНТИОКСИДАНТОВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС-САМЦОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПОСТУПЛЕНИИ КЛОПИРАЛИДА

Украинская медицинская стоматологическая академия, Полтава

Пестициды — одна из наиболее распространенных групп химических веществ, используемых в промышленности, сельском хозяйстве и быту. В последние годы широко применяются производные пиридинкарбоновой кислоты — клопиралид (3,6-дихлор-2-пиридинкарбоновая кислота) и его соли: триэтиламин, триизопропиламин, моноэтиламин, отличающиеся высокой эффективностью [1].

Общий механизм повреждающего воздействия пестицидов различных групп — нарушения окислительно-восстановительных процессов, в частности повышение свободнорадикального перекисного окисления (СРПО) липидов, прежде всего, в мембранах клеток гонад, что в конечном итоге может привести к их деструкции на протяжении всего репродуктивного периода. Кроме того, они оказывают гонадотоксическое действие, приводящее к снижению стероидогенеза, и как следствие — к нарушению сперматогенеза [5].

Важная роль СРПО липидов в нарушении целостности биомембран и развитии цитолитического синдрома — основание для применения антиоксидантов в качестве гонадопротекторных средств, среди которых наиболее перспективными представляются комбинация антиоксидантных соединений различной химической природы [2]. Одним из таких комплексных препара-

тов является азупростат, включающий:  $\alpha$ -токоферола ацетат, экстракт эхинацеи пурпурной, ретинол пальмитат и  $\beta$ -ситостерол.

**Цель работы** — изучение протективных свойств  $\alpha$ -токоферола ацетата и азупростата в отношении показателей СРПО липидов, морфологических и функциональных изменений в семенниках белых крыс при токсическом воздействии пестицида клопиралид.

## Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 40 крысах-самцах линии Вистар массой 190–205 г. Животным контрольной группы ежедневно *per os* вводился клопиралид в дозе 150 мг/кг массы тела животного, что составило 0,33 LD<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub> — 5000 мг/кг). Воздействие токсиканта проводилось 56 дней, с учетом длительности сперматогенеза у крыс и времени созревания сперматозоидов в придатке семенника. Животные экспериментальных групп на фоне введения клопиралид получали *per os*  $\alpha$ -токоферола ацетат в дозе 10 мг/кг; азупростат в дозе 30 мг/кг массы тела.

Определяли содержание диеновых конъюгатов (ДК) в плазме крови и тканях семенников [3], ТБК-реактантов — в крови и тканях семенников [3], величину спонтанного гемолиза эритроцитов [3], активность антиоксидантных ферментов

крови: супероксиддисмутаза (СОД) [3], каталазы [3], церулоплазмина [3].

Изучение количественного и функционального состояния спермы проводили по методу М. А. Базарновой [4]. Жизнеспособность сперматозоидов изучали при помощи эозинового теста. Определяли патологические формы сперматозоидов с помощью окрашивания по методу Романовского — Гимзы. Морфологически исследовали состояние сперматогенного эпителия. Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

## Результаты исследования и их обсуждение

При введении животным клопиралид масса их тела уменьшилась на 13 %, активность снизилась, отмечалось значительное выпадение шерсти. Наблюдалось снижение массы семенников на 13 %: правого ( $P \leq 0,02$ ) и левого ( $P \leq 0,05$ ), однако их массовые коэффициенты по сравнению с нормой существенно не изменились.

Отмечалось усиление процессов СРПО липидов, о чем свидетельствует достоверное возрастание количества ДК в сыворотке в 1,6 раза ( $P \leq 0,01$ ), промежуточных продуктов СРПО липидов — ТБК-реактантов в сыворотке крови в 3,6 раза по сравнению с интактными ( $P \leq 0,01$ ). Такой же высокий уровень ТБК-реактантов



отмечался и в тканях семенников крыс, получавших клопиралид, превысив показатель интактных животных в 1,5 раза ( $P \leq 0,001$ ). Наблюдалось снижение активности антиоксидантных ферментов. Активность каталазы крови достоверно снизилась в 2,5 раза ( $P \leq 0,05$ ), подобное снижение наблюдалось и в отношении церулоплазмينا — в 1,4 раза ( $P \leq 0,01$ ). Активность СОД крови, напротив, возросла в 1,9 раза по сравнению с интактной группой ( $P \leq 0,001$ ) (таблица).

Исследования спермограмм показали, что введение клопиралида вызывало возрастание абсолютного количества мертвых и патологических форм. Количество сперматозоидов снизилось на 36 %: ( $30,6 \pm 3,5$ ) при норме ( $48,0 \pm 0,7$ ) ( $P \leq 0,01$ ), причем количество мертвых сперматозоидов стало в 1,8 раза больше, чем у интактных животных, а количество патологических форм сперматозоидов — в 2,4 раза выше нормы ( $P \leq 0,001$ ). Изменилась подвижность сперматозоидов по сравнению с интактными крысами под влиянием клопиралида. Так, количество спер-

матозоидов с нормокинезисом снизилось в 3,3 раза — до ( $26,8 \pm 3,2$ ) по сравнению с нормой — ( $89,0 \pm 4,2$ ) ( $P \leq 0,001$ ); количество сперматозоидов с гипокинезисом увеличилось в 2,9 раза — ( $27,1 \pm 1,3$ ) по сравнению с нормой — ( $9,5 \pm 1,2$ ) ( $P \leq 0,001$ ); с акинезисом возросло в 3,1 раза — до ( $29,3 \pm 1,8$ ) по сравнению с нормой — ( $9,4 \pm 0,9$ ) ( $P \leq 0,001$ ); с дискинезисом увеличилось в 10 раз — до ( $9,2 \pm 1,5$ ) по сравнению с нормой — ( $0,9 \pm 0,4$ ) ( $P \leq 0,001$ ).

Выявлены морфологические изменения семенного эпителия: количество нормальных сперматогониев снизилось на 23 % — с ( $68,2 \pm 5,8$ ) до ( $52,9 \pm 3,8$ ) ( $P \leq 0,02$ ), отмечалось увеличение в 4,4 раза по сравнению с нормой количества канальцев со слущенным эпителием — с ( $1,8 \pm 0,9$ ) до ( $7,91 \pm 1,30$ ) ( $P \leq 0,05$ ), в 2 раза возросло количество канальцев с атрофичным или поврежденным эпителием — с ( $7,0 \pm 1,4$ ) до ( $14,3 \pm 2,1$ ) ( $P \leq 0,02$ ), а количество канальцев с 12-й стадией мейоза составило ( $1,87 \pm 0,60$ ), уменьшившись в 1,8 раза по сравнению с показателем нормы ( $3,4 \pm 0,4$ ), проявив тенденцию к достовер-

ности. Вышеописанные изменения в конечном итоге привели к снижению фертильности.

При микроскопическом исследовании тканей семенников выявлены нарушения в виде дистрофических и дисрегенераторных изменений, которые проявляются компенсаторной гиперплазией. Отмечалось развитие дистрофических изменений в сосудах микроциркуляторного русла, которые усиливали дегенеративные изменения сперматогенного эпителия. Клетки Сертоли (фолликулярные клетки) разбухшие, они значительно превосходят по размерам аналогичные клетки в норме. Интерстициальные клетки Лейдига содержат ядра базофильного окраса с широкой полосой эозинофильной цитоплазмы. Сосуды интерстиция расширены и гиперемированы, их стенки утолщены и покрыты фиброзными прослойками. Отмечается опустошение семенных канальцев, повреждение сперматогенного эпителия, особенно на конечных этапах сперматогенеза, что характеризуется снижением индекса сперматогенеза. Одновременно с этим отмечает-

Таблица

**Биохимические показатели в крови и тканях семенников крыс, получавших препараты антиоксидантов на фоне длительного поступления клопиралида**

Показатель	Интактные, n=10	Введение клопиралида, n=10	Клопиралид + $\alpha$ -токоферола ацетат, n=10	Клопиралид + азупростат, n=10
ДК, мкМ/л	$36,37 \pm 2,14$	$56,60 \pm 4,96$ $P_1 \leq 0,01$	$43,41 \pm 1,19$ $P_2 \leq 0,05$	$37,48 \pm 1,64$ $P_3 \leq 0,01$
ТБК-реактанты, мкМ/л: кровь	$4,13 \pm 0,95$	$14,95 \pm 3,00$ $P_1 \leq 0,01$	$5,95 \pm 1,69$ $P_2 \leq 0,05$	$4,87 \pm 0,29$ $P_3 \leq 0,01$
семенник	$138,20 \pm 2,00$	$213,35 \pm 2,73$ $P_1 \leq 0,001$	$155,83 \pm 4,53$ $P_2 \leq 0,001$	$140,21 \pm 3,85$ $P_3 \leq 0,001$
Спонтанный гемолиз эритроцитов, %	$4,23 \pm 0,45$	$7,02 \pm 0,98$ $P_1 \leq 0,05$	$4,83 \pm 0,21$ $P_2 \leq 0,05$	$4,62 \pm 0,29$ $P_3 \leq 0,05$
СОД (кровь), усл. ед.	$0,87 \pm 0,06$	$1,61 \pm 0,14$ $P_1 \leq 0,001$	$1,14 \pm 0,16$ $P_2 \leq 0,05$	$1,03 \pm 0,11$ $P_3 \leq 0,01$
Каталаза (кровь), усл. ед.	$1,53 \pm 0,33$	$0,62 \pm 0,25$ $P_1 \leq 0,05$	$1,47 \pm 0,11$ $P_2 \leq 0,02$	$1,56 \pm 0,18$ $P_3 \leq 0,02$
Церулоплазмин, мг/л	$579,93 \pm 40,32$	$405,43 \pm 33,92$ $P_1 \leq 0,01$	$572,75 \pm 33,30$ $P_2 \leq 0,01$	$574,41 \pm 24,05$ $P_3 \leq 0,01$

*Примечание.*  $P_1$  — степень достоверности при сравнении контрольной и интактной групп;  $P_2$  — степень достоверности при сравнении леченных  $\alpha$ -токоферола ацетатом и контрольной группы;  $P_3$  — степень достоверности при сравнении леченных азупростатом с контрольной группой.



ся увеличение размера сперматогоний, сперматоцитов I и II порядка. В адлюминальном слое семенника наблюдается инверсия формы клеток и вакуолизация цитоплазмы. Значительно увеличивается количество канальцев со слущенным эпителием.

Введение  $\alpha$ -токоферола ацетата на фоне интоксикации клопиралидом привело к снижению СРПО липидов в крови и тканях семенников. Содержание ДК в сыворотке крови достоверно снизилось на 23 % по сравнению с контролем ( $P \leq 0,05$ ). Концентрация ТБК-реактантов в крови снизилась в 2,5 раза ( $P \leq 0,05$ ), по сравнению с контролем, при этом достоверно не отличаясь от показателей нормы. В семенниках содержание ТБК-реактантов снизилось на 27 % по сравнению с показателями животных, получавших клопиралид ( $P \leq 0,001$ ), существенно не отличаясь от нормы. При интоксикации клопиралидом  $\alpha$ -токоферола ацетат способствовал восстановлению системы антиоксидантной защиты организма, о чем свидетельствует достоверное снижение спонтанного гемолиза эритроцитов в 1,5 раза ( $P \leq 0,05$ ). Изучение активности антиоксидантных ферментов в крови показало, что активность СОД достоверно снизилась на 29 % по сравнению с контролем ( $P \leq 0,05$ ), каталазы — увеличилась в 2,5 раза ( $P \leq 0,01$ ), а церулоплазмина — на 44 % ( $P \leq 0,01$ ) по сравнению с группой контроля. Причем все показатели достоверно не отличались от величин нормы (см. таблицу).

При исследовании морфометрических показателей установлено увеличение массы животных на 12 % по сравнению с контролем. Существенных изменений в массовых коэффициентах семенников не обнаружено.

$\alpha$ -Токоферола ацетат привел к норме общее количе-

ство сперматозоидов — ( $46,1 \pm 2,6$ ) при норме ( $48,0 \pm 3,7$ ) (у крыс, получавших клопиралид, — ( $30,6 \pm 3,5$ );  $P \leq 0,002$ ). Количество мертвых сперматозоидов составило ( $13,4 \pm 1,4$ ), что достоверно на 24 % ниже величин контрольной группы — ( $17,5 \pm 1,1$ ) ( $P \leq 0,05$ ), при этом в 1,4 раза превысило показатель нормы — ( $9,6 \pm 0,8$ ) ( $P \leq 0,05$ ). Подобная ситуация наблюдается и в отношении патологических форм сперматозоидов — ( $14,8 \pm 1,2$ ), их количество снизилось на 22 % по сравнению с величинами контроля — ( $19,0 \pm 0,9$ ) ( $P \leq 0,02$ ), хотя и не достигло нормы — ( $8,0 \pm 0,9$ ) ( $P \leq 0,001$ ). Изучение кинезисграммы показало, что количество сперматозоидов с нормокинезисом под влиянием витамина Е составило ( $77,3 \pm 8,5$ ) (в 2,9 раза повысилось по сравнению с контролем — ( $26,8 \pm 3,2$ );  $P \leq 0,001$ ), но не достигло величин интактных животных — ( $89,0 \pm 4,2$ ) ( $P \leq 0,05$ ). Количество сперматозоидов с гипокинезисом ( $13,8 \pm 1,3$ ) достоверно снизилось в 2 раза по сравнению с контролем — ( $27,1 \pm 1,3$ ) ( $P \leq 0,001$ ), хотя их величины на 45 % ниже нормы — ( $9,5 \pm 1,2$ ) ( $P \leq 0,05$ ). Количество сперматозоидов с акинезисом — ( $14,9 \pm 1,2$ ), в 2 раза ниже показателей контроля — ( $29,3 \pm 1,8$ ) ( $P \leq 0,001$ ), при этом все же превышало на 58 % величины нормы — ( $9,4 \pm 0,9$ ) ( $P \leq 0,02$ ). Количество сперматозоидов с дискинезисом существенно снизилось — в 2,3 раза по сравнению с величинами контроля ( $P \leq 0,01$ ), но при этом достоверно превышало в 4,4 раза значения интактных животных ( $P \leq 0,001$ ).

Морфологические исследования семенного эпителия выявили, что индекс сперматогенеза под влиянием витамина Е соответствовал величинам интактных крыс. Количество нормальных сперматогониев ( $67,1 \pm 5,1$ ) возросло в 1,3 раза по сравнению с величинами, характерными для

контроля, — ( $52,9 \pm 3,8$ ) ( $P \leq 0,05$ ), оно не отличалось от величин нормы — ( $68,2 \pm 5,8$ ). Количество канальцев с 12-й стадией мейоза ( $4,5 \pm 1,0$ ) достоверно было выше в 2,4 раза по сравнению с величинами, характерными для контроля — ( $1,87 \pm 0,6$ ) ( $P \leq 0,05$ ), не отличаясь от величин нормы. Количество канальцев с атрофическим или поврежденным эпителием ( $7,2 \pm 1,9$ ) достоверно снизилось в 2 раза от величины контроля — ( $14,3 \pm 2,1$ ) ( $P \leq 0,02$ ), не отличаясь от величин интактных животных — ( $7,0 \pm 1,4$ ).

При микроскопическом исследовании тканей семенников выявлено, что морфологические характеристики семенного эпителия приближались к норме. Отмечалось восстановление сперматогониев I и II порядка, отсутствие опустошенных канальцев. Наблюдалось утончение соединительнотканых оболочек.

Исследование влияния азупростата на биохимические показатели крови при интоксикации клопиралидом показало, что содержание ДК снизилось на 34 % по сравнению с контролем ( $P \leq 0,01$ ) и не отличалось от величин нормы. Концентрация ТБК-реактантов в крови снизилась в 3 раза по сравнению с контролем ( $P \leq 0,01$ ), достоверно не отличаясь от нормы. В тканях семенников содержание ТБК-реактантов снизилось в 1,5 раза по сравнению с контролем ( $P \leq 0,01$ ). Прирост ТБК-реактантов в семенниках оказался в 2 раза ниже показателей группы с интоксикацией клопиралидом.

Отмечалась нормализация показателя спонтанного гемолиза эритроцитов и активности СОД в крови опытных животных, которая снизилась на 36 % по сравнению с контролем ( $P \leq 0,01$ ). Активность каталазы, напротив, возросла в 2,5 раза по сравнению с контролем ( $P \leq 0,02$ ). Активность



церулоплазмина возросла в 1,4 раза относительно контроля ( $P \leq 0,01$ ) (см. таблицу).

Изучение массовых показателей семенников показало увеличение массы правого на 16 %, левого — на 19 % ( $P \leq 0,05$ ), при этом значимых изменений массовых коэффициентов не выявлено.

В группе животных, леченных азупростатом, общее количество сперматозоидов составило ( $48,2 \pm 3,5$ ), что достоверно на 58 % превышало показатель контроля — ( $30,6 \pm 3,5$ ) ( $P \leq 0,01$ ). Количество мертвых сперматозоидов ( $9,9 \pm 0,4$ ), снизилось в 1,8 раза по сравнению с показателями крыс, получавших клопиралид, — ( $17,5 \pm 1,1$ ) ( $P \leq 0,001$ ). Количество патологических форм сперматозоидов составило ( $9,1 \pm 1,0$ ) — достоверно уменьшилось в 2 раза по сравнению с контролем — ( $19,0 \pm 0,9$ ) ( $P \leq 0,001$ ). Количество мертвых сперматозоидов ( $9,9 \pm 0,4$ ) оказалось в 1,8 раза ниже, чем в группе интоксикации — ( $17,5 \pm 1,1$ ), и соответствовало норме — ( $9,6 \pm 0,8$ ). При клопиралидной интоксикации азупростат существенно повлиял на подвижность сперматозоидов. Так, количество сперматозоидов с нормокинезисом достигло ( $86,2 \pm 9,8$ ), что в 3,2 раза выше, чем в контроле — ( $26,8 \pm 3,2$ ) ( $P \leq 0,001$ ) (при норме ( $89,0 \pm 4,2$ )). Количество сперматозоидов с гипокинезисом нормализовалось до ( $10,3 \pm 1,4$ ), что в 2,6 раза ниже величины контроля — ( $27,1 \pm 1,3$ ) ( $P \leq 0,001$ ). Количество сперматозоидов с акинезисом составило ( $10,1 \pm 1,2$ ), что в 2,9 раза ниже, чем в группе контроля — ( $29,3 \pm 1,8$ ) ( $P \leq 0,001$ ). Процент сперматозоидов с дискинезисом составил ( $1,5 \pm 1,0$ ), что в 6,1 раза ниже по сравнению с контролем — ( $9,2 \pm 1,5$ ) ( $P \leq 0,01$ ). Все показатели существенно не отличались от величин интактных животных.

При клопиралидной интоксикации азупростат нормализовал индекс сперматогенеза

до ( $3,24 \pm 0,10$ ), увеличив его на 14 % по сравнению с контролем — ( $2,82 \pm 0,06$ ) ( $P \leq 0,01$ ). Количество нормальных сперматогониев составило ( $69,2 \pm 4,5$ ), увеличившись на 31 % по сравнению с контролем — ( $52,9 \pm 3,8$ ) ( $P \leq 0,05$ ). Количество канальцев со слущенным эпителием ( $2,3 \pm 0,9$ ) уменьшилось в 3,4 раза по сравнению с контролем — ( $7,91 \pm 1,3$ ) ( $P \leq 0,01$ ). Процент канальцев с 12-й стадией мейоза составил ( $4,7 \pm 0,6$ ), т. е. в 2,5 раза возрос по сравнению с величинами контроля — ( $1,87 \pm 0,60$ ) ( $P \leq 0,01$ ). Количество канальцев с атрофическим и поврежденным эпителием ( $7,4 \pm 1,2$ ) снизилось в 1,9 раза по сравнению с показателями крыс, получавших клопиралид, — ( $14,3 \pm 2,1$ ) ( $P \leq 0,02$ ).

При гистологическом исследовании семенников крыс, получавших азупростат, на фоне введения клопиралид значительно улучшились морфологические показатели, которые существенно не отличались от структуры интактных крыс.

Таким образом, введение  $\alpha$ -токоферола ацетата при длительном поступлении клопиралид привело к торможению процессов СРПО липидов, повышению антиоксидантной обеспеченности организма, нормализации активности антиоксидантных ферментов.  $\alpha$ -Токоферола ацетат оказал нормализующее действие на состояние сперматогенного эпителия, однако не повлиял на количество канальцев в стадии созревания, а также количество мертвых и патологических форм сперматозоидов.  $\alpha$ -Токоферол стимулировал деление половых клеток, хотя и не повлиял на качество спермиев.

Введение азупростата при токсическом воздействии пестицида клопиралид способствовало не только значительному снижению СРПО липидов в крови и тканях семенни-

ков, но и нормализации состояния сперматогенного эпителия, количественных показателей спермы крыс, нормализации подвижности сперматозоидов. В условиях интоксикации клопиралидом азупростат влияет не только на уровень деления клеток сперматогенного эпителия, но при этом улучшает и качество спермы, способствуя восстановлению подвижности сперматозоидов.

Исследование морфологических изменений в семенниках и функциональной готовности спермы показали, что наиболее значимые изменения регистрировались при лечении клопиралидной интоксикации азупростатом, что подчеркивает его более выраженное гонадопротективное действие, чем при введении  $\alpha$ -токоферола ацетата. Полученные результаты в целом свидетельствуют о целесообразности использования препаратов антиоксидантного действия в качестве гонадопротекторов при хроническом поступлении пестицидов — производных пиридинкарбонной кислоты.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева С. А. Лонтрел в насаждениях земляники, плодовом питомнике и молодых садах // Сб. науч. тр. Сев.-Кавк. НИИ горн. и предгорн. садоводства. — 1995. — Вып. 5. — С. 170-171.
2. Катцунг Б. Г. Базисная клиническая фармакология: Пер. с англ. — Т. 2. — М. — СПб.: Бинном; Невский Диалект, 1998. — 669 с.
3. Посібник експериментальних і клінічних досліджень біології та медицини / Під ред. І. П. Кайдишева, О. В. Катрушева, В. М. Соколенко. — Полтава, 1997. — 271 с.
4. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / Под ред. М. А. Базарновой, В. Т. Морозовой. — К.: Вища шк., 1988. — 318 с.
5. Ivanescu M., Simionescu L. Testosterone in sera of workers exposed to acrylonitrile // Rev. Roum. Endocrinol. — 1990. — Vol. 28, N 3-4. — P. 187-192.

