

Т. В. Усенко, В. Г. Шуляк
НАУКОВИЙ ЦЕНТР ПРЕВЕНТИВНОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ, ХАРЧОВОЇ ТА ХІМІЧНОЇ БЕЗПЕКИ
ІМЕНІ АКАДЕМІКА Л. І. МЕДВЕДЯ МОЗ УКРАЇНИ, КИЇВ

ВПЛИВ ЕПОКСИКОНАЗОЛУ НА ГЕМАТОЛОГІЧНІ ТА ЦИТОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЩУРІВ W1STAR HANNOVER

Вступ. Епоксиконазол – високоефективний фунгіцид широкого спектра дії класу триазолів. Він входить до складу багатьох сучасних препаратів для боротьби з фітопатогенами. Його широко застосовують у сільському господарстві світу та України зокрема. Попри свої гепатотоксичні характеристики, даний фунгіцид порушує гематологічні параметри крові.

Мета дослідження – вивчити вплив генеричного триазольного фунгіциду епоксиконазолу 95 % на гематологічні та цитохімічні показники периферичної крові щурів Wistar Hannover за умов гострого експерименту.

Методи дослідження. Дослідження проведено на 10 статевозрілих щурах-самцях Wistar Han, поділених на контрольну (0 мг/кг) та експериментальну групи. Тваринам експериментальної групи було введено токсичну дозу 1580 мг/кг маси тіла (1/2 від ЛД₅₀) одноразово внутрішньошлунково через зонд. Периферичну кров досліджували на 0 та 1, 3, 7 і 14 доби після експозиції. Вивчали гематологічні показники: кількісний вміст еритроцитів, концентрацію гемоглобіну, рівень гематокриту, еритроцитарні індекси (середній об'єм еритроцита, середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті, середню концентрацію гемоглобіну в одному еритроциті), кількість лейкоцитів та тромбоцитів. Гемограму з оцінкою морфологічних змін клітин крові та відсоткового співвідношення різних видів лейкоцитів досліджували в мазках периферичної крові. Цитохімічний статус лейкоцитів оцінювали на основі визначення ферментативної активності нафтол-AS-D-хлорацетатестерази в нейтрофілах, сукцинатдегідрогенази та кислої фосфатази в лімфоцитах.

Результати й обговорення. Еритроцитоз у відповідь на інтоксикацію пестицидом зі зменшенням середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті, зниження концентрації гемоглобіну до кінця експерименту на фоні активної поліхромазії свідчать про анемізуючу дію епоксиконазолу. Реактивний нейтрофілоз, стимуляцію лімфоцитопоезу та моноцитопоезу, появу в периферичній крові макрофагів, збільшення активності нафтол-AS-D-хлорацетатестерази, сукцинатдегідрогенази та кислої фосфатази розцінено як компенсаторні механізми. Відмічено зворотні кількісні зміни у співвідношенні субпопуляцій лімфоцитів за активністю кислої фосфатази.

Висновок. Аналіз результатів дослідження гематотоксичної дії генеричного триазольного фунгіциду епоксиконазолу 95 % за умов гострого експерименту на щурах-самцях Wistar Hannover показав розвиток прихованої анемії, що проявилась у пізній термін дослідження; активізацію моноцитопоезу; збільшення макрофагів у судинному руслі; зміни імунної відповіді організму і появу атипичних нормоцитів та лімфоцитів з аномаліями ядер.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: епоксиконазол; гематотоксичність; анемія; сукцинатдегідрогеназа; кисла фосфатаза; нафтол-AS-D-хлорацетатестераза; макрофаги; “хвостаті” лімфоцити.

ВСТУП. Епоксиконазол (ЕПО) – високоефективний фунгіцид широкого спектра дії класу триазолів. Він входить до складу багатьох сучасних препаратів для боротьби з фітопатогенами: збудниками борошнистої роси, іржі, плямистостей колоса і листя зернових культур [1]. Його активно застосовують у сільському господарстві світу та України зокрема. Згідно з висновками регуляторних органів (EPA US, EFSA Europe), ключовим органом-мішенню є печінка. Але попри

© Т. В. Усенко, В. Г. Шуляк, 2018.

свої гепатотоксичні характеристики, даний фунгіцид порушує гематологічні параметри крові [2]. Літературні дані щодо негативного впливу епоксиконазолу на систему крові не численні. Деякі роботи засвідчують вплив ЕПО на червону кров, що проявляється зниженням кількості еритроцитів, концентрації гемоглобіну, гематокриту, середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті та тромбоцитів у щурів-самиць [3, 4]. За результатами проведених токсикокінетичних досліджень, найбільшу концентрацію абсорбо-

ваного після надходження в організм ЕПО відмічено саме в еритроцитах периферичної крові, а період напіввиведення $T_{1/2}$ для ЕПО досить високий – 168 год (7 діб) [5]. З огляду на такі особливості даної тестової субстанції, було важливо оцінити особливості гематотоксичної дії ЕПО, вплив на червону та білу кров, а також дослідити цитохімічний статус лейкоцитів за умов моделювання гострого отруєння пестицидом.

Мета дослідження – вивчити вплив генеричного триазольного фунгіциду епоксиконазолу 95 % на гематологічні та цитохімічні показники периферичної крові щурів Wistar Hannover за умов гострого експерименту.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Лабораторних щурів-самців Wistar Han було отримано з розплідника Наукового токсикологічного центру імені академіка Л. І. Медведя МОЗ України. Вони мали SPF-статус, що підтверджувалося відповідними сертифікатами. Щурів утримували в окремих клітках по 5 тварин у кожній у контрольованих умовах конвенційного віварію (відносна вологість – 30–70 %, температура – 19–23 °С, автоматична 12-годинна система освітлення “день – ніч”). Корм (“Altramín”, Німеччина) та вода (фільтрована зворотним осмосом та дезінфікована шляхом ультрафіолетового опромінення) надавалися *ad libitum*. Усі маніпуляції зі щурами виконували відповідно до положень Комісії з етики медичних та біологічних досліджень Наукового токсикологічного центру імені академіка Л. І. Медведя МОЗ України та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [6, 7]. На всіх етапах гематологічних та цитохімічних досліджень маніпуляції було проведено з дотриманням стандартних операційних процедур центру, відповідно до рекомендацій Належної лабораторної практики (GLP) [8].

Після періоду акліматизації тварин до умов конвенційного віварію та перед початком експерименту в них було оцінено вхідні гематологічні показники (нульовий день досліджень) і сформовано групи, що вірогідно не відрізнялись одна від одної. Дослідження проведено на статевозрілих щурах-самцях Wistar Han масою тіла 280–300 г, поділених на 2 групи (по 5 тварин у кожній): 1-ша – контрольна; 2-га – експериментальна.

За даними Агенції із захисту навколишнього середовища США (EPA US), напівлетальна доза (ЛД₅₀) епоксиконазолу для самців становить 3160 мг/кг маси тіла [9]. Щурам 2-ї групи одноразово внутрішньошлунково через зонд було

введено токсичну дозу 1580 мг/кг маси тіла – 1/2 від ЛД₅₀. Тварини 1-ї групи отримували розчинник (вода з емульгатором ОП-10 в концентрації 0,002 %).

Периферичну кров досліджували на 0 та 1, 3, 7 і 14 доби після експозиції епоксиконазолом [10]. Вивчали гематологічні показники: кількісний вміст еритроцитів, концентрацію гемоглобіну, рівень гематокриту, еритроцитарні індекси (середній об’єм еритроцита, середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті, середню концентрацію гемоглобіну в одному еритроциті), кількість лейкоцитів та тромбоцитів. Визначали їх за допомогою ветеринарного автоматичного гематологічного аналізатора “Micros ABC” (“Horiba Diagnostics”, France). Гемограму з оцінкою морфологічних змін клітин крові та відсоткового співвідношення різних видів лейкоцитів досліджували в мазках периферичної крові, забарвлених за Паппенгеймом–Крюковим [11]. Цитохімічний статус лейкоцитів оцінювали на основі визначення активності таких ферментів: нафтол-AS-D-хлорацетатестерази в нейтрофілах за методом Молоні та співавт., сукцинатдегідрогенази в лімфоцитах за методом Нарцисова, кислої фосфатази в лімфоцитах реакцією одночасного азосполучення за методом Голдберга і Барка [12, 13]. Результати аналізу 100 лейкоцитів у мазку виражали у вигляді середнього цитохімічного коефіцієнта, використовуючи принцип Астальді [12].

Отримані дані піддавали статистичній обробці. Результати аналізували за допомогою 2-way ANOVA та t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.

Гематологічні дослідження.

Червона кров. У результаті дослідження гематологічних показників периферичної крові через добу після введення ЕПО у відповідь на гостру інтоксикацію в щурів експериментальної групи (табл. 1) встановлено вірогідне підвищення кількості еритроцитів на 7,7 % ($p \leq 0,05$) та, відповідно, достовірне зниження середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті на 2,4 % відносно контролю. Зменшення індексу середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті на 4,5 % залишалось достовірним і на 3 післяекспозиційну добу (ПЕД), зберігалась тенденція до еритроцитозу. Згідно з літературними даними, ЕПО може інгібувати зв’язування заліза під час біосинтезу гему: молекула азолу діє як неконкурентний інгібітор [3]. Тому зниження середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті вказує на можливі порушення процесів гемоглобіноутворення в клітинах-попередниках еритроцитів у кістковому мозку. На 14 ПЕД

Таблиця 1 – Гематологічні показники периферичної крові щурів Wistar Han

Показник	Термін дослідження	1-ша група (контроль)	2-га група (ЕПО)
Еритроцити, $10^{12}/л$	0	8,81±0,26	9,03±0,27
	1	7,84±0,17	8,44±0,18*
	3	8,49±0,25	9,26±0,34
	7	7,87±0,24	8,14±0,20
	14	8,13±0,17	8,15±0,45
Гемоглобін, г/л	0	172,80±6,85	176,20±6,58
	1	174,60±5,16	177,40±4,26
	3	183,00±1,47	188,40±6,38
	7	169,25±8,41	170,75±3,20
	14	169,75±1,65	165,60±8,80
Лейкоцити, $10^9/л$	0	11,58±2,58	11,54±0,94
	1	15,46±1,49	14,82±1,24
	3	15,43±1,13	20,82±3,89
	7	19,05±2,39	18,53±1,51
	14	15,35±0,92	14,96±1,00
Гематокрит, %	0	49,48±1,71	50,24±1,15
	1	45,18±1,48	47,10±1,20
	3	48,30±0,77	52,04±2,14
	7	44,60±2,06	45,68±0,37
	14	45,88±0,68	44,62±2,50
Тромбоцити, $10^9/л$	0	555,00±125,71	674,20±125,72
	1	646,40±47,12	702,60±59,66
	3	714,00±90,14	547,00±78,10
	7	614,00±86,00	456,00±60,62
	14	494,50±59,77	616,20±74,38
Середній об'єм еритроцитів, фл	0	56,20±2,04	55,60±1,50
	1	57,60±1,36	55,80±0,80
	3	56,75±1,11	56,00±0,95
	7	56,50±0,96	56,25±1,03
	14	56,50±0,96	54,80±0,66
Середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті, пг	0	19,64±0,82	19,52±0,90
	1	22,26±0,44	21,06±0,32
	3	21,63±0,63	20,34±0,45
	7	21,53±0,65	21,05±0,66
	14	20,88±0,47	20,34±0,38
Середня концентрація гемоглобіну в одному еритроциті, г/л	0	349,20±2,04	350,60±5,99
	1	386,60±3,08	377,20±0,58
	3	379,00±5,12	362,00±4,57
	7	379,75±6,54	374,25±7,49
	14	370,00±3,49	371,40±4,88

у щурів відмічено зниження концентрації гемоглобіну на 2,4 % та зменшення середнього об'єму еритроцитів на 2,6 %, що є ознакою анемізуючої дії епоксиконазолу. На підтвердження цього факту при аналізі морфології еритроцитів у мазках крові встановлено вірогідне підвищення кількості поліхроматофільних еритроцитів: у 15 разів – на 1 ПЕД, у 4 рази – на 14 ПЕД. Тенденцію до поліхромазії було відмічено на 3 та 7 ПЕД експерименту.

У мазках периферичної крові на 1 та 14 ПЕД було виявлено поодинокі поліхроматофільні нормоцити (ПХН) кісткового мозку. Серед нормальних ПХН (рис. 1) спостерігали атипіві бі-нуклеарні ПХН (рис. 2, 3), ПХН із каріорексисом та порушеннями енуклеації ядра. Поява таких клітин вказує на порушення процесів дозрівання

та поділу клітин-попередників еритроцитів у кістковому мозку, зміну або втрату їх функцій [14].

Впродовж усіх термінів дослідження кількісні зміни тромбоцитів були недостовірними та в межах фізіологічних коливань.

Біла кров. На 1 ПЕД зміни білої крові (табл. 2) проявлялись відносним нейтрофіліозом: вірогідно збільшувалась (на 72 %) загальна кількість нейтрофілів за рахунок сегментоядерних форм (на 68 %). Інших змін у лейкоцитарній формулі не встановлено. При дослідженні морфології лейкоцитів виявлено велику кількість зруйнованих клітин нейтрофільного ряду. Цитолізовані клітини мали деструктивну оболонку (або вона зовсім була відсутня), без цитоплазми, ядра втрачали свою структуру, були розмитими та

Таблиця 2 – Відносний (лейкограма) та абсолютний вміст лейкоцитів периферичної крові щурів Wistar Han

Показник	ПЕД	Лейкограма, %		Абсолютний вміст, 10 ⁹ /л	
		1-ша група (0 мг/кг)	2-га група (1580 мг/кг)	1-ша група (0 мг/кг)	2-га група (1580 мг/кг)
Метамієлоцит	1	–	–	–	–
	3	–	–	–	–
	7	1,00±0,00	1,00±0,00	0,07±0,06	0,03±0,03
	14	–	1,00±0,00	–	0,03±0,03
Паличкоядерний нейтрофіл	1	–	1,75±0,15	0,00±0,00	0,06±0,03
	3	1,00±0,00	1,67±0,43	0,09±0,04	0,18±0,12
	7	1,50±0,21	1,50±0,22	0,27±0,03	0,11±0,08
	14	2,33±0,64	2,33±0,64	0,27±0,12	0,23±0,14
Сегментоядерний нейтрофіл	1	10,00±1,72	16,80±2,58	1,54±0,27	2,46±0,44
	3	11,25±2,15	12,50±1,93	1,66±0,21	1,70±0,57
	7	11,25±0,86	9,50±1,29	2,10±0,21	1,45±0,53
	14	15,75±1,29	17,60±3,00	2,40±0,16	2,71±0,66
Усього нейтрофілів	1	10,00±1,72	17,20±2,36	1,54±0,27	2,52±0,40
	3	11,75±1,93	13,75±2,15	1,75±0,17	1,88±0,69
	7	13,00±1,07	10,50±1,07	2,44±0,28	1,59±0,53
	14	17,50±1,07	19,20±3,43	2,67±0,17	2,97±0,73
Еозинофіл	1	1,50±0,21	1,33±0,22	0,11±0,06	0,11±0,06
	3	–	2,33±0,22	–	0,23±0,09
	7	1,00±0,00	1,33±0,22	0,15±0,06	0,15±0,09
	14	2,50±0,64	2,00±0,43	0,21±0,15	0,12±0,10
Базофіл	1	–	1,00±0,00	–	0,05±0,03
	3	–	–	–	–
	7	–	1,00±0,00	–	0,04±0,04
	14	1,00±0,00	1,00±0,00	0,03±0,03	0,04±0,04
Моноцит	1	9,50±0,64	10,40±1,07	1,44±0,27	1,54±0,23
	3	6,25±0,85	25,75±2,58	0,96±0,14	3,56±1,28
	7	10,75±2,15	14,00±2,58	2,02±0,34	2,11±0,99
	14	13,75±1,50	14,80±1,72	2,11±0,26	2,21±0,29
Лімфоцит	1	79,75±2,79	71,20±3,00	12,17±1,42	10,64±1,34
	3	81,50±2,36	58,75±2,58	12,62±1,14	7,95±2,28
	7	75,25±2,15	74,25±2,58	14,41±2,05	10,94±3,38
	14	66,75±0,21	64,80±3,65	10,24±0,55	9,59±0,46

нечітко окресленими. Деякі нейтрофільні гранулоцити являли собою лише залишки ядер та зернистості. Достовірно підвищувалась кількість гіперсегментованих нейтрофілів та нейтрофілів з ознаками дегенеративних змін ядер, такими, як: фрагментація, хроматиноліз, конденсація

хроматину, вакуолізація. Часто ці дегенерації комбінувались між собою. На нашу думку, нейтрофіліоз у периферичній крові мав реактивний характер та був зумовлений активацією судинного пристінкового (маргінального) пулу лейкоцитів, і його можна розцінити як компенсаторний

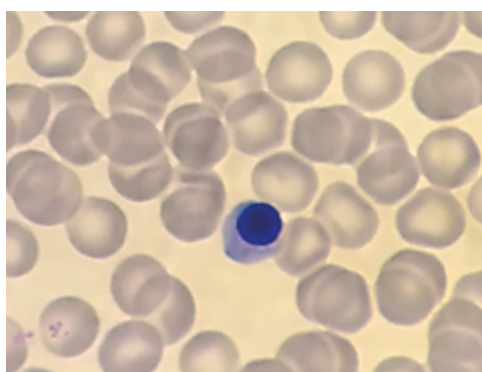


Рис. 1. Поліхроматофільний нормоцит у периферичній крові щурів Wistar Han на 1 добу після експозиції епоксиконазолом; забарвлення за Паппенгеймом–Крюковим, 10x100.

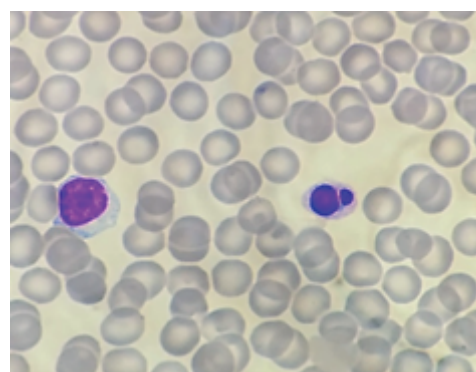


Рис. 2. Лімфоцит (зліва) та атипичний бінуклеарний поліхроматофільний нормоцит (справа) в периферичній крові щурів Wistar Han на 14 добу після експозиції епоксиконазолом; забарвлення за Паппенгеймом–Крюковим, 10x100.

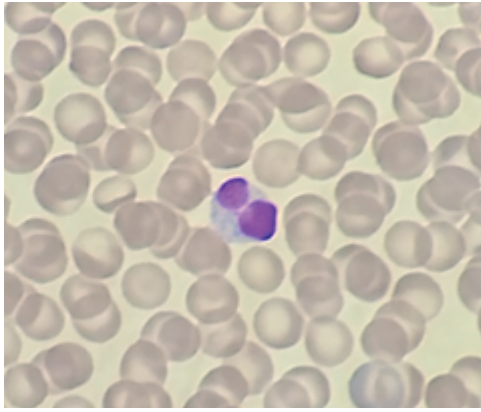


Рис. 3. Бінуклеарний поліхроматофільний нормоцит у стадії мітозу в периферичній крові щурів Wistar Han на 14 добу після експозиції епоксиконазолом; забарвлення за Паппенгеймом–Крюковим, 10x100.

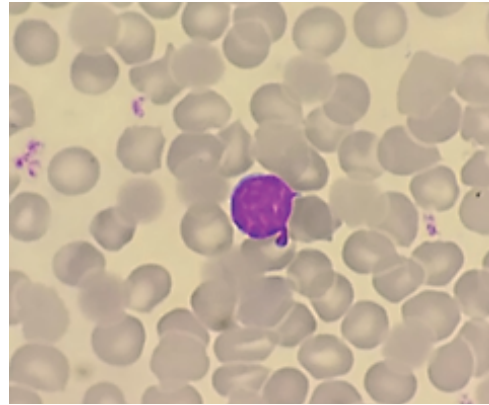


Рис. 4. Атиповий "хвостатий" лімфоцит периферичної крові щурів Wistar Han на 3 добу після експозиції епоксиконазолом; забарвлення за Паппенгеймом–Крюковим, 10x100.

механізм у відповідь на інтоксикацію ЕПО в цей термін дослідження.

До 3 ПЕД загальна кількість лейкоцитів у щурів експериментальної групи була підвищеною на 35 % відносно контролю. Відмічено нормалізацію вмісту клітин нейтрофільного ряду: достовірних розбіжностей не встановлено. У цей термін зафіксовано відносну і тенденцію до абсолютної лімфоцитопенії: вірогідне зниження кількості лімфоцитів на 28 % відносно показників контрольної групи самців. Зростав вміст пролімфоцитів ($2,09 \pm 0,15$, в контролі – $0,88 \pm 0,03$) та плазматичних клітин ($0,49 \pm 0,05$, в контролі – 0). Щодо морфологічних особливостей лімфоцитів, то вірогідно підвищувалась кількість атипових "хвостатих" лімфоцитів з випинаннями (виростами) ядра в цитоплазматичний простір (рис. 4, 5). Такі морфологічні особливості клітин можуть вказувати на порушення ампліфікації ДНК в ядрі лімфоцита під час мітозу або пошкодження ДНК-репаративних механізмів у клітині [15–17].

Найбільш значимими в цей термін були зміни моноцитарного ряду клітин. У лейкограмі зафіксовано відносний моноцитоз: збільшення кількості моноцитів у 4 рази відносно контролю (табл. 2). Окрім того, виявлено зміни в морфології моноцитів: хроматиноліз, частковий каріоліз, вакуолізацію ядра та цитоплазми. У мазках відмічено велику кількість зруйнованих клітин цього виду. На фоні значного моноцитозу в судинному руслі циркулювала велика кількість макрофагів у стадії активного фагоцитозу ($9,25 \pm 1,3$, в контролі – 0). Вони характеризувались поліморфізмом розмірів, ступенем зрілості та ознаками деструкції. Переважали молоді клітини: ядерний хроматин ніжної структури, ядра містили ядерця. У цитоплазмі були наявні мікропухирці та вакуолі, а також фрагменти деструктивних ядерних та клітинних структур. Траплялись мак-

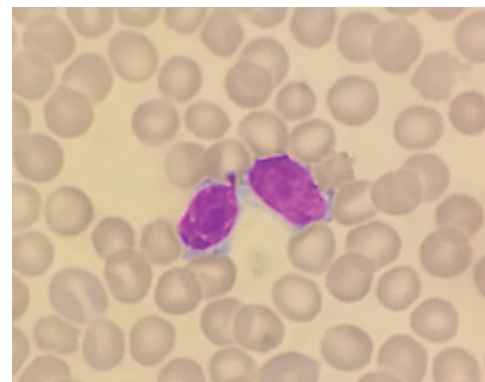


Рис. 5. Атиповий "хвостатий" лімфоцит та середній лімфоцит периферичної крові щурів Wistar Han на 3 добу після експозиції епоксиконазолом; забарвлення за Паппенгеймом–Крюковим, 10x100.

рофаги із захопленими еритроцитами. Серед зрілих моноцитів було виявлено молоді форми клітин: монобласти ($0,17 \pm 0,01$, в контролі – 0) та промоноцити ($0,52 \pm 0,02$, в контролі – 0). Активна моноцитарного ряду, на нашу думку, пов'язана з підвищеною потребою організму в очищенні крові та, можливо, інших тканин організму від зруйнованих клітин і детриту.

На 7 ПЕД загальний вміст лейкоцитів у периферичній крові, кількість нейтрофілів та лімфоцитів у тварин експериментальної групи достовірно не відрізнялись від значень контрольної. Продовжувала зростати (у 2,5 раза) кількість плазматичних клітин. Усе ще залишалась підвищеною (на 30 %) кількість зрілих моноцитів. Окрім того, відмічено вірогідне збільшення зруйнованих клітин – форм лейколізу.

На 14 ПЕД жодних вірогідних змін білої крові (загальна кількість лейкоцитів, показники лейкоцитарної формули) не спостерігали. Разом із тим, у периферичну кров продовжували надходити пролімфоцити (у 2,5 раза) та промоноцити (у 4 рази більше, ніж у контрольній групі).

Цитохімічні дослідження.

Результати дослідження цитохімічного статусу лейкоцитів наведено на рисунку 6.

Нафтол-AS-D-хлорацетатестераза – специфічний фермент нейтрофілів, міститься в цитоплазматичних гранулах (первинних лізосомах), забезпечує протеолітичну та фагоцитарну функції. Даний фермент є маркерним для нейтрофільного ряду клітин, його активність знижується в міру дозрівання клітин [13]. Так, на 7 ПЕД встановлено достовірне підвищення його активності в нейтрофілах (на 66 %) без наявних змін їх загальної кількості. Такий стан ферментативних систем вказує на активізацію адаптивних механізмів у клітинах крові та появу в периферичній крові функціонально активних нейтрофілів. У деяких наукових роботах описано захисну функцію даного ферменту, який є каталізатором гідролізу ксенобіотичних сполук або зв'язування значної частини метаболітів, послаблюючи, таким чином, їх токсичну дію на організм [18].

Сукцинатдегідрогеназа як один із ключових ферментів циклу трикарбонових кислот та дихального ланцюга є показником енергообміну в мітохондріях. Активність її знижується в міру дозрівання клітин [13, 19]. На 7 ПЕД встановлено достовірне підвищення активності сукцинатдегідрогенази в лімфоцитах (на 5 %). Це можна пояснити виходом у периферичну кров молодих

форм пролімфоцитів на 3 ПЕД, які до 7 доби експерименту не втратили своєї функціональної активності, та зростанням кількості плазматичних клітин у периферичній крові на 7 ПЕД.

Кисла фосфатаза локалізується в лізосомах лімфоцитів. Активність її вірогідно зростає в щурів експериментальної групи на 1 ПЕД (на 35 %) та 3 ПЕД (на 40 %). Це вказує на підвищення катаболічних процесів у клітинах крові.

Метод визначення кислоти фосфатази за допомогою реакції азосполучення дозволяє не лише оцінити функціональний стан лізосомального апарату лейкоцитів, а й провести ідентифікацію Т-, В-, нульових лімфоцитів. Нульові лімфоцити, або NK-клітини, – це особлива резервна популяція, молоді, функціонально активні клітини, які за необхідності можуть диференціюватись у Т- чи В-лімфоцити. Основна їх функція – знешкодження власних клітин організму, в яких відбулись критичні для клітини зміни. Також вони можуть перетворюватись у моноцити, фіброласти, макрофаги, тобто в клітини, які беруть участь у регенераційних процесах організму [20–23].

Аналіз результатів досліджень кислоти фосфатази після впливу ЕПО на особливості цитохімічної відповіді різних морфологічних груп лімфоцитів (рис. 7) показав зниження кількості В-лімфоцитів (на 50 %) та вірогідне підвищення

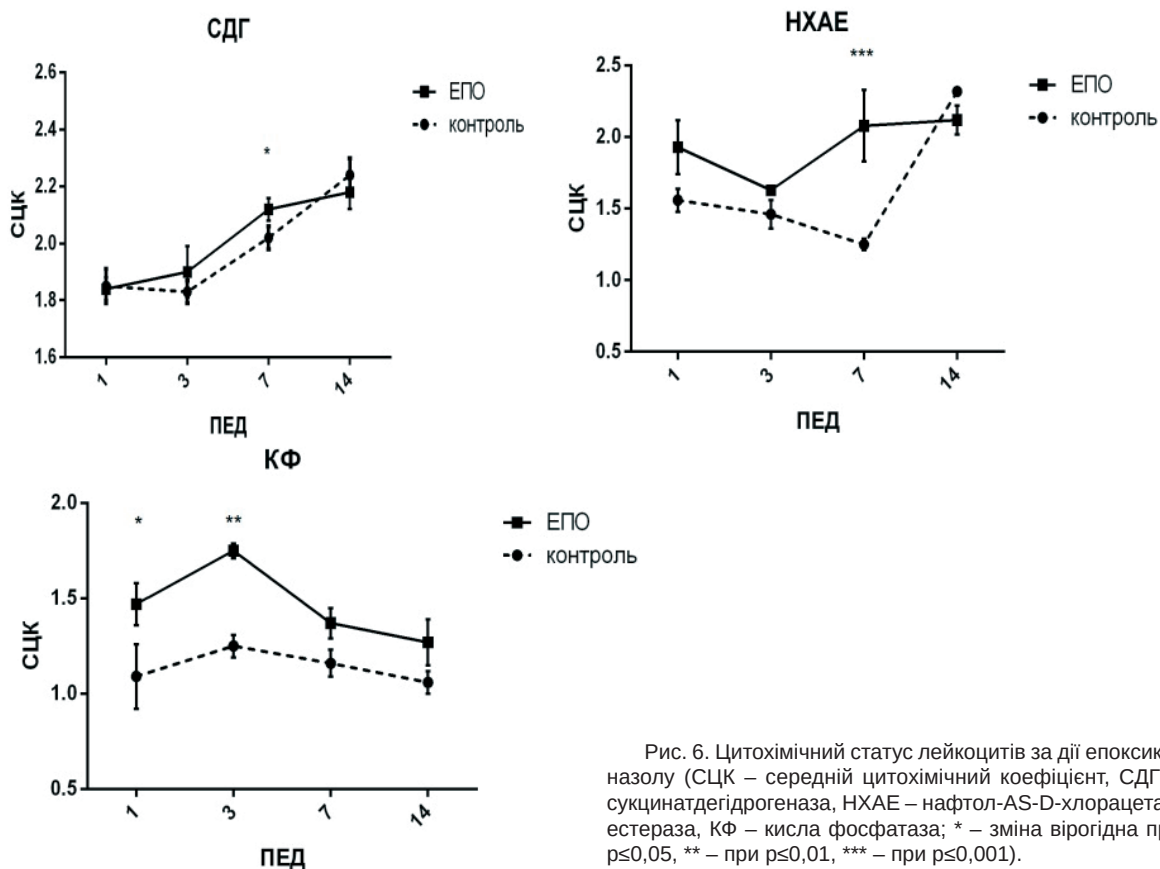
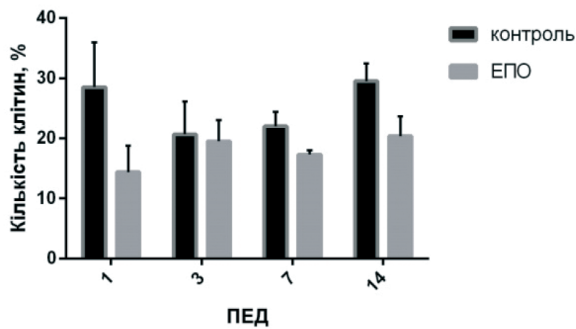
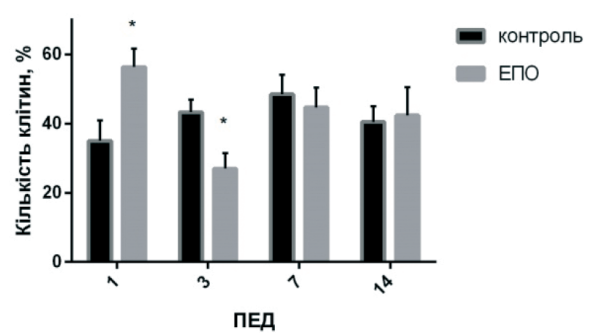


Рис. 6. Цитохімічний статус лейкоцитів за дії епоксиконазолу (СЦК – середній цитохімічний коефіцієнт, СДГ – сукцинатдегідрогеназа, НХАЕ – нафтол-AS-D-хлорацетатестераза, КФ – кисла фосфатаза; * – зміна вірогідна при $p \leq 0,05$, ** – при $p \leq 0,01$, *** – при $p \leq 0,001$).

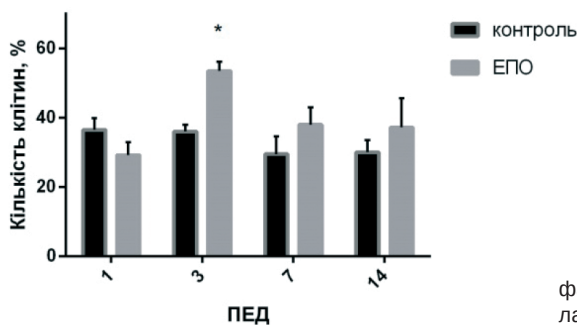
Розподіл В-лімфоцитів за активністю КФ



Розподіл Т-лімфоцитів за активністю КФ



Розподіл нульових лімфоцитів за активністю КФ

Рис. 7. Розподіл лімфоцитів за активністю кислої фосфатази в лімфоцитах периферичної крові щурів (КФ – кисла фосфатаза; * – зміна вірогідна при $p \leq 0,05$).

Т-лімфоцитів (на 61 %) на 1 ПЕД. Це може свідчити про активізацію специфічного клітинного імунітету. До 3 ПЕД кількість Т-лімфоцитів вірогідно зменшилась (на 54 %), а кількість нульових лімфоцитів достовірно збільшилась (на 49 %). На нашу думку, підвищення NK-клітин можна пояснити розвитком імуномодуючої відповіді організму щурів після впливу епоксиконазолу. На 7 та 14 ПЕД співвідношення різних субпопуляцій лімфоцитів у тварин експериментальної групи вірогідно не відрізнялось від значень контролю.

ВИСНОВКИ. Аналіз результатів дослідження гематотоксичної дії генеричного триазольного фунгіциду епоксиконазолу 95 % за умов гострого експерименту на щурах-самцях Wistar Hanover показав розвиток прихованої анемії, що проявилась у пізній термін дослідження; активізацію моноцитопоезу; збільшення макрофагів у судинному руслі; зміни імунної відповіді організму і появу атипичних нормоцитів та лімфоцитів з аномаліями ядер.

Епоксиконазол призводив до змін червоної крові, характерних для анемії: зниження концентрації гемоглобіну в динаміці та середнього об'єму еритроцитів. Поява ПХН на фоні активної поліхромазії свідчила про прихований її перебіг.

З боку білої крові відмічено стимуляцію моноцитопоезу та лімфоцитопоезу в кістковому мозку. При цьому спостерігали появу в периферичній крові молодих форм – монобластів, про-

моноцитів та пролімфоцитів. Вихід у периферичну кров попередників зрілих клітин мав компенсаторний характер у відповідь на дію епоксиконазолу.

Наявність активних макрофагів у судинному руслі мала захисний характер.

Поява атипичних “хвостатих” лімфоцитів та поліхроматофільних нормоцитів кісткового мозку в периферичній крові може свідчити про вплив епоксиконазолу на процеси поділу й дозрівання клітин, що потребує подальших спеціалізованих досліджень.

Зміни цитохімічного статусу лімфоцитів вказують на активізацію адаптаційних механізмів в організмі щурів:

– ЕПО не порушував протеолітичних та фагоцитарних функцій нейтрофілів; збільшення активності нафтол-AS-D-хлорацетатестерази можна розцінити як компенсаторний механізм у клітинах нейтрофільного ряду;

– ЕПО не порушував метаболічних процесів у мітохондріях лімфоцитів; активність сукцинатдегідрогенази на 7 добу експерименту підвищувалась за рахунок виходу в периферичну кров пролімфоцитів, які не втратили своєї функціональної активності;

– ЕПО впливав на імунний статус організму щурів; було відмічено зворотні кількісні зміни у співвідношенні Т-, В- та нульових лімфоцитів.

Перспективи подальших досліджень. Подальші поглиблені дослідження механізмів гематотоксичної дії генеричного триазольного

фунгіциду епоксиконазолу вимагають комплексного аналізу гематологічних та цитохімічних показників, оцінки морфологічних змін клітин крові, дослідження процесів поділу і дозрівання

клітин у кістковому мозку та селезінці й дозволять розмежувати адаптаційні процеси та розвиток можливих патологічних станів системи крові в організмі щурів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Практичне значення та застосування похідних 1,2,4-тріазолу : монографія [Електронний ресурс] / [А. Г. Каплаушенко, Е. І. Книш, О. І. Панасенко та ін.]. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2016. – 187 с. – Режим доступу : <http://dspace.zsmu.edu.ua/handle/123456789/4902>.
2. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance epoxiconazole // *EFSA Journal*. – 2015. – No. 13 (6). – P. 4123.
3. Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: a case study with the azole fungicide epoxiconazole / J. E. Chambers, H. Greim, R. J. Kendall [et al.] // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2014. – **44**, No. 2. – P. 176–210.
4. Schmidt F. Combination effects of azole fungicides in male rats in a broad dose range / F. Schmidt, P. Marx-Stoelting // *Toxicology*. – 2016. – No. 355. – P. 54–63.
5. EPA MEMORANDUM January 24, 2001 Epoxiconazole – Report of the Cancer Assessment Review Committee. – USA. – P. 42.
6. Guide for the care and use of laboratory animals. – LAR Publication, National Academy Press, USA, 1996. – P. 22.
7. OECD Principles of Good Laboratory Practice. ENV/MC/CHEM(98)17 // Environment Directorate Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris; 1998.
8. Проданчук Г. М. Створення історичного контролю гематологічних показників периферичної крові щурів Wistar Han / Г. М. Проданчук, Т. В. Усенко // Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. – 2015. – № 4 (72). – С. 35–40.
9. USEPA – Pesticides – Fact Sheet for Epoxiconazole, United States Office of Prevention, Pesticides Environmental Protection and Toxic Substances Agency (7505P), August 2006.
10. Шуляк В. Г. Достижения в области изучения влияния пестицидов на систему кроветворения / В. Г. Шуляк // *Современные проблемы токсикологии*. – 2002. – № 1. – С. 42–53.
11. Новикова И. Клиническая и лабораторная гематология [Электронный ресурс] / И. Новикова. – 2017. – Режим доступа : <http://www.clinlab.info/Hemocytology/Reticulocytes-counting-49>.
12. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В. В. Меньшиков. – М. : Медицина, 1987. – С. 106–145.
13. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов / [З. А. Бутенко, Д. Ф. Глузман, К. П. Зак и др.]. – К. : Наукова думка, 1974. – С. 28–88.
14. Гаврилов О. К. Депрессии кроветворения / О. К. Гаврилов. – М. : Медицина, 1987. – 236 с.
15. Kravtsov V. Nuclear abnormalities of lymphocytes as the simplest markers for bioindication test in case of mass casualty events involving radiation exposure / V. Kravtsov, A. Livanova, Y. Starkova // *Emergency Medicine (Los Angel)*. – 2017. – **7**, No. 356.
16. Çayır A. Micronuclei, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds induced in human lymphocytes by the fungicide signum and its active ingredients (boscalid and pyraclostrobin) / A. Çayır, C. Munevver, C. Mahmut // *Environmental Toxicology*. – 2014. – **29**, No. 7. – P. 723–732
17. Zeljezic D. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation / D. Zeljezic, V. Garaj-Vrhovac // *Toxicology*. – 2004. – **200**, Issue 1. – P. 39–47
18. Ефимцева Э. А. Активность эстераз в тканях различных отделов желудочно-кишечного тракта северного оленя / Э. А. Ефимцева, Т. И. Челпанова // *Сельскохозяйственная биология*. – 2007. – № 6. – С. 77–80.
19. Хундерякова Н. В. Разработка метода определения активности сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов как показателя адренергической регуляции в организме : автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук / Н. В. Хундерякова. – Пущино, 2008. – 121 с.
20. Радченко О. М. Клітинний імунітет за умов різних типів адаптаційних реакцій / О. М. Радченко // *Медицина гідрологія та реабілітація*. – 2009. – **7**, № 3. – С. 57–60.
21. Гнідой І. М. Імунний статус у дітей у разі дії свинцю в низьких дозах / І. М. Гнідой, І. І. Діхтярук // *Укр. мед. часоп.* – 2002. – № 6 (32), XI–XII. – С. 125–127.
22. Приходько О. О. Морфофункціональні зміни периферичної крові в умовах дії екзогенних чинників хімічної природи / О. О. Приходько // *Вісн. Сум. держ. ун-ту*. – 2009. – **1**, № 2. – С. 34–42 .
23. Воробель А. В. Основи гематології [Електронний ресурс] / А. В. Воробель. – Режим доступу : <http://194.44.152.155/elib/local/349.pdf>.

REFERENCES

1. Kapliuchenko, A.H. (2016). *Praktychne znachennia ta zastovuvannia pokhidnykh 1,2,4-triazolu [Practical value and application of derivatives of 1,2,4-triazole]*. Zaporizhzhia: ZDMU [in Ukrainian].
2. (2015). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance epoxiconazole. *EFSA Journal*, 13 (6), 4123.
3. Chambers, J.E. (2014). Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: a case study with the azole fungicide epoxiconazole. *Critical Reviews in Toxicology*, 44, 2, 176-210.
4. Schmidt, F. (2016). Effects of combination azole fungicides in male rats in a broad dose range. *Toxicology*, 355, 54-63
5. EPA MEMORANDUM *January 24, 2001 Epoxiconazole – Report of the Cancer Assessment Review Committee, USA*, 42.
6. Guide for the care and use of laboratory animals. *LAR Publication, National Academy Press, USA, 1996*, 22.
7. (1998) OECD Principles of Good Laboratory Practice. ENV/MC/CHEM(98)17. *Environment Directorate Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris*.
8. Prodanchuk, M.H. (2015). Stvorennia istorichnoho kontroliu hematolohichnykh pokaznykiv peryferychnoi krovi shchuriv Wistar Han [Create a historical monitoring of hematological parameters of peripheral blood of Wistar rats, Han]. *Suchasni problemy toksykologii, kharchovoi ta khimichnoi bezpeky – Modern Problems of Toxicology, Food and Chemical Safety*, 4 (72), 35-40 [in Ukrainian].
9. US EPA – Pesticides – Fact Sheet for Epoxiconazole, United States Office of Prevention, *Pesticides Environmental Protection and Toxic Substances Agency (7505P), August 2006*.
10. Shulyak, V.G. (2002). Dostizheniya v oblasti izucheniya vliyaniya pestitsidov na sistemu krovetvoreniya [Advances in the study of the impact of pesticides on the hematopoietic system]. *Suchasni problemy toksykologii – Modern Problems of Toxicology*, 1, 42 [in Russian].
11. Novikova, S. (2017). *Klinicheskaya i laboratornaya gematologiya [Clinical and laboratory haematology]*. Retrieved from: <http://www.clinlab.info/Hemocytology/Reticulocytes-counting-49> [in Russian].
12. Menshikov, V.V. (1987). *Laboratornye metody issledovaniya v klinike [Laboratory methods in the clinic]*. Moscow: Meditsyna [in Russian].
13. Butenko, Z.A. (1974). *Tsitokhimiya i elektronnaya mikroskopiya kletok krovi i krovetvornykh organov [Cytochemistry and electron microscopy of blood cells and blood-forming organs]*. Kyiv: Naukova Dumka [in Russian].
14. Havrylov, A.K. (1987). *Depresii krovotvorennia [The depression of hematopoiesis]*. Moscow: Meditsyna [in Russian].
15. Kravtsov, V. (2017). Nuclear abnormalities of lymphocytes as markers for the simplest bioindication test in case of mass casualty events involving radiation exposure. *Emergency Medicine (Los Angel)*, 7, 356.
16. Çayır, A. (2014). Micronuclei, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds induced in human lymphocytes by the fungicide signum and its active ingredients (boscalid and pyraclostrobin). *Environmental Toxicology*, 29, 7, 723-732
17. Zeljezic, D. (2004). Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology*, 200, 1, 39-47
18. Efimtseva, E.A. (2007). Aktivnost esteraz v tkanyakh razlichnykh odelov zheludochno-kishechnogo trakta severnogo olenya [The Activity of esterases in different tissues of the gastrointestinal tract of reindeer]. *Selskokhozyaystvennaya biologiya – Agricultural Biology*, 6, 77-80 [in Russian].
19. Khuneryakova, N.V. (2008). Razrabotka metoda opredeleniya aktivnosti suktsinatdegidrogenazy limfotsitov kak pokazatelya adrenergicheskoy regulyatsii v organizme [Development of a method for determining the activity of succinate dehydrogenase in lymphocytes as an indicator of adrenergic regulation in the body]. *Candidate's Extended abstract*. Pushchino [in Russian].
20. Radchenko, O.M. (2009). Klitinnyi imunitet za umov riznykh typiv adaptatsiinykh reaktsii [Cellular immunity in conditions of various types of adaptive reactions]. *Medychna hidrolohiia ta reabilitatsiia – Medical Hydrology and Rehabilitation*, 7, 3, 57-60 [in Ukrainian].
21. Hnidoi, I.M., & Datarock, I. (2002). Imunnyi status u ditei u razi dii svyntsii v nyzkykh dozah [Immune status in children with lead exposure in low doses]. *Ukrainskyi med. chasopys – Ukrainian Medical Journal*, 6 (32), XI-XII, 125-127 [in Ukrainian].
22. Prykhodko, E.A. (2009). Morfofunktsionalni zminy peryferychnoi krovi v umovakh dii ekzohennykh chynnykiv khimichnoi pryrody [Morpho-functional changes of the peripheral blood under the action of exogenous chemical factors]. *Visnyk Sumskoho derzhanoho un-tu – Bulletin of Sumy State University*, 2, 1, 34-42 [in Ukrainian].
23. Vorobel, A.V. *Osnovy hematologii [Fundamentals of hematology]*. Retrieved from: <http://194.44.152.155/elib/local/349.pdf> [in Ukrainian].

ВЛИЯНИЕ ЭПОКСИКОНАЗОЛА НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС WISTAR HANNOVER

Резюме

Вступление. Эпоксиконазол – высокоэффективный фунгицид широкого спектра действия класса триазолов. Он входит в состав многих современных препаратов для борьбы с фитопатогенами. Его широко применяют в сельском хозяйстве мира и Украины в частности. Несмотря на свои гепатотоксичные характеристики, данный фунгицид нарушает гематологические параметры крови.

Цель исследования – изучить влияние генерического триазольного фунгицида эпоксиконазола 95 % на гематологические и цитохимические показатели периферической крови крыс Wistar Hannover в условиях острого эксперимента.

Методы исследования. Исследования проведены на 10 половозрелых крысах-самцах Wistar Han, разделенных на контрольную (0 мг/кг) и экспериментальную группы. Животным экспериментальной группы была введена токсическая доза 1580 мг/кг массы тела (1/2 от ЛД₅₀) однократно внутривенно через зонд. Периферическую кровь исследовали на 0 и 1, 3, 7 и 14 сутки после экспозиции. Изучали гематологические показатели: количественное содержание эритроцитов, концентрацию гемоглобина, уровень гематокрита, эритроцитарные индексы (средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в одном эритроците, среднюю концентрацию гемоглобина в одном эритроците), количество лейкоцитов и тромбоцитов. Гемограмму с оценкой морфологических изменений клеток крови и процентного соотношения различных видов лейкоцитов исследовали в мазках периферической крови. Цитохимический статус лейкоцитов оценивали на основе определения ферментативной активности нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы в нейтрофилах, сукцинатдегидрогеназы и кислой фосфатазы в лимфоцитах.

Результаты и обсуждение. Эритроцитоз в ответ на интоксикацию пестицидом с уменьшением средней концентрации гемоглобина в одном эритроците, снижение концентрации гемоглобина до конца эксперимента на фоне активной полихромазии свидетельствуют об анемизирующем действии эпоксиконазола. Реактивный нейтрофилез, стимуляция лимфоцитопоза и моноцитопоза, появление в периферической крови макрофагов, увеличение активности нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы, сукцинатдегидрогеназы и кислой фосфатазы расценены как компенсаторные механизмы. Отмечены обратимые количественные изменения в соотношении субпопуляций лимфоцитов по активности кислой фосфатазы.

Вывод. Анализ результатов исследования гематотоксического действия генерического триазольного фунгицида эпоксиконазола 95 % в условиях острого эксперимента на крысах-самцах Wistar Hannover показал развитие скрытой анемии, проявившейся в поздние сроки исследования; активизацию моноцитопоза; увеличение макрофагов в сосудистом русле; изменения иммунного ответа организма и появление атипичных нормоцитов и лимфоцитов с аномалиями ядер.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эпоксиконазол; гематотоксичность; анемия; сукцинатдегидрогеназа; кислая фосфатаза; нафтол-AS-D-хлорацетатэстераза; макрофаги; “хвостатые” лимфоциты.

T. V. Usenko, V. G. Shulyak
L. MEDVED RESEARCH CENTER OF PREVENTIVE TOXICOLOGY, FOOD AND CHEMICAL SAFETY
OF HEALTH MINISTRY OF UKRAINE, KYIV

HEMATOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL PARAMETERS OF PERIPHERAL BLOOD OF WISTAR HANNOVER RATS AFTER EXPOSURE TO EPOXICONAZOLE

Summary

Introduction. Epoxiconazole is a highly effective triazole fungicide. It is a part of many modern compounds for the control of phytopathogens and widely used in agriculture in all over the world and in Ukraine, in particular. Despite its hepatotoxic characteristics, this fungicide alters the hematological parameters of blood.

The aim of the study – to investigate the effects of generic triazole fungicide epoxiconazole, 95 % on hematological and cytochemical parameters of peripheral blood of Wistar Hannover rats in acute experiment.

Research Methods. 10 healthy males of Wistar Han rats were equally divided into control (0 mg/kg/bw) and experimental groups. Dose 1580 mg/kg/bw of epoxiconazole (1/2 LD50) was administered once orally by gavage to 5 experimental rats. Peripheral blood was studied at 0 and 1, 3, 7, 14 day after exposure (DAE). RBC, HGB, HCT, erythrocyte indices MCV, MCH, MCHC, WBC and PLT were, hemogram and morphological disturbances of cells were studied, percentage ratio of different types of leukocytes was calculated. The cytochemical status of leukocytes was assessed on the basis of determining the enzymatic activity of specific naphthol-AS-D-chloroacetate tetraserase in neutrophils, succinate dehydrogenase and acid phosphatase in lymphocytes.

Results and Discussion. Erythrocytosis in response to pesticide intoxication with a decrease of mean cell hemoglobin concentration in one erythrocyte; the reduction of hemoglobin concentration in the end of experiment against the background of active polychromasia confirmed the anemic effect of epoxiconazole. Reactive neutrophilia, stimulation of lymphocytopoiesis and monocytopenia, appearance of macrophages in the peripheral blood, increased activity of naphthol-AS-D-chloroacetate tetraserase, succinate dehydrogenase and acid phosphatase were considered as compensatory mechanisms. Reverse quantitative changes in the ratio of lymphocytes subpopulations based on the activity of acid phosphatase were noted.

Conclusions. Results of the study of generic fungicide epoxiconazole, 95 % hematotoxic activity in the acute experiment on Wistar Hannover male rats showed the development of latent anemia, which was manifested in the late-term study; activation of monocytopenia; increase of macrophages in the peripheral blood; changes in the immune response of the body and the appearance of atypical normocytes and lymphocytes with nuclear abnormalities.

KEY WORDS: epoxiconazole; hematotoxicity; anemia; succinate dehydrogenase; acid phosphatase; naphthol-AS-D-chloroacetate tetraserase; macrophages; "tailed" lymphocytes.

Отримано 18.01.18

Адреса для листування: Т. В. Усенко, Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л. І. Медведя МОЗ України, вул. Героїв Оборони, 6, Київ, 03127, Україна, e-mail: ksusha528@inbox.ru.