

УДК: [547.546+547.271'264]:616-001.18-099-092.9

И.В. Завгородний, докт.мед.наук, профессор,

Р.О. Бачинский, канд.биолог.наук,

Г.Л. Никулина, канд.мед.наук,

Е.Л. Литовченко

Харьковский национальный медицинский университет (ХНМУ) г. Харьков

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТИЛТРЕТБУТИЛОВОГО ЭФИРА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА.**

Представлены результаты сравнительных экспериментальных исследований токсического действия метилтретбутилового эфира [МТБЭ] на репродуктивную систему лабораторных животных, подвергавшихся 30-ти кратному воздействию МТБЭ в условиях температурного комфорта ( $+25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) и в условиях холодного стресса ( $+4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Изменения морфологических и морфометрических показателей при воздействии МТБЭ в сочетании со сниженной температурой качественно подобны тем, которые наблюдаются при действии МТБЭ в условиях термонеutralной зоны. Вместе с тем, показано, что при сочетанном действии МТБЭ и сниженной температуры имеет место усиление гонадотоксического эффекта.

**Ключевые слова:** метилтретбутиловый эфир, гонадотоксическое действие, холодный стресс, сочетанное действие, морфологические и морфометрические исследования.

**Введение.** Трудовая и социальная среда, в которой осуществляется деятельность человека, характеризуется наличием комплекса взаимодействующих факторов, а именно: социально-бытовых, технологических, условий и режимов труда и др. Обеспечение информированности специалистов об особенностях количественного и качественного влияния на организм как отдельных факторов, так и их комплекса дает возможность своевременно анализировать и устранять причины неблагоприятного действия [1, 2].

Наиболее неблагоприятными, с точки зрения масштабы возможных негативных последствий на здоровье человека, следует признать одновременное (сочетанное) действие химических и физических факторов [3, 4], в частности химических веществ и сниженной температуры.

Изучению закономерностей сочетанного действия на организм вредных химических веществ и сниженной температуры, в частности положительных низких температур, посвящено сравнительно мало научных работ, хотя интерес к этой проблеме, особенно в рамках профилактического направления в медицине, существуют давно [5, 6].

Наибольшей интенсивности одновременное действие на организм сниженных температур в сочетании с химическими факторами достигает в ряде отраслей промышленности (химическая промышленность, строительство, газонефтедобывающая и перерабатывающая промышленность). Проблема сочетанного биологического действия химических факторов и сниженной температуры имеет актуальное значение еще в одном важном аспекте – экологическом. Его суть заключается в практически постоянном и повсеместном присутствии химических веществ – ксенобиотиков (экотоксикантов) в объектах окружающей среды и связанной с этим потенциальной опасностью их поступления в организм человека, в том числе и в холодный период года [7].

Экологические требования к продуктам сгорания автомобильных двигателей привели к развитию производств экологически чистых бензинов с

кислородсодержащими компонентами – оксигенатами (спирты, простые эфиры). В настоящее время на практике, наиболее широко, как оксигенат, используется метилтретбутиловый эфир [МТБЭ] [8].

МТБЭ также используется во многих отраслях промышленности, в частности для синтеза лекарственных препаратов, как мономер для синтеза полиэтилена, полипропилена, поливинилхлорида [9, 10].

Таким образом, в настоящее время МТБЭ активно влияет на загрязнение воздуха рабочей зоны, атмосферного воздуха, воды, почвы во многих странах мира и может неблагоприятно действовать на разные профессиональные группы: рабочих нефтеперерабатывающих заводов, автозаправочных станций, перевозчиков горячего, водителей автомобильного транспорта, автомехаников, других категорий рабочих, а также на население в целом [9, 11–16].

С целью прогнозирования неблагоприятного воздействия эко- и промышленных токсикантов на грядущие поколения все большее внимание уделяется изучению их отдаленных воздействий на репродуктивную систему. Описанные в литературе результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что репродуктивная система лабораторных животных является одной из основных систем, которая подвержена токсическому действию МТБЭ, как при ингаляционном поступлении, так и при введении в желудок. При исследовании репродуктивной функции крыс при введении МТБЭ в желудок обнаружено нарушение секреции тестостерона, лютинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов. Отмечено, что в высоких концентрациях МТБЭ приводит к значительному снижению жизнеспособности сперматогенных клеток [17–20].

Таким образом, учитывая тот факт, что спрос и мировое производство МТБЭ постоянно растет, проблема изучения гонадотоксического действия МТБЭ в сочетании со сниженной температурой является достаточно своевременной и актуальной.

Целью настоящего исследования явилось исследование токсического действия МТБЭ на репродуктивную систему (морфологические и морфометрические показатели) экспериментальных животных, подвергавшихся воздействию МТБЭ в условиях температурного комфорта ( $+25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) и в условиях холодового стресса ( $+4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

**Материал и методы исследований.** Для осуществления цели исследования на половозрелых крысах-самцах линии WAG был проведен подострый токсикологический эксперимент с 30 кратным введением МТБЭ в желудок в дозе  $1/10 \text{ ЛД}_{50}$  (500 мг/кг веса животного) и экспозицией животных в двух различных термических режимах по 4 часа в день 5 раз в неделю. МТБЭ вводили в желудок специальным зондом в виде водного раствора, а животным контрольных групп – соответственно дистиллированную воду в эквивалентных количествах. Холодовой стресс моделировали в условиях затравочной камеры общего назначения, дополнительно оборудованной ячейками, для изолированного свободного размещения животных, а также термоэлектрическим охлаждающим устройством типа воздух-воздух (модель 180–24–АА) инженерно-производственной фирмы «Криотерм» (Санкт-Петербург, Россия) и обеспечивающим охлаждение воздушной среды в диапазоне температур  $4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$  [21].

Животные были разбиты на 4 группы по 6 особей в группе. Животные 1-й группы подвергались сочетанному воздействию МТБЭ и сниженной температуры воздуха  $4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Животные 2-й группы подвергались изолированному воздействию только сниженной температуры  $4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , т.е. являлись контролем по отношению к животным 1-й группы. Животные 3-й группы подвергались воздействию МТБЭ при температуре воздуха  $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$  (нормальная температура окружающей среды).

Животные 4-й группы служили контролем при температуре воздуха  $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Для морфологической оценки функционального состояния семенников проводили общий гистологический анализ состояния тканей семенника, дополняя его морфометрическими показателями: количество канальцев со слущенным семяродным эпителием, индекс сперматогенеза, суммарное количество нормальных сперматогоний в первом ряду клеток на базальной мембране канальца (число сперматогоний), площадь ядер клеток Лейдига после 30 затравок МТБЭ, а также после восстановительного периода [22].

**Результаты исследований и их обсуждение.** При морфологическом исследовании семенников животных, которые подвергались действию МТБЭ в условиях сочетанного действия со сниженной температурой наблюдается картина значительного токсического повреждения семенников: семенные канальцы преимущественно округлой формы, местами плотно лежат один возле другого, местами расположение разреженное, большая часть канальцев опустошенная, сперматогенный эпителий отсутствует, просветы широкие, не содержат сперматогоний и сперматозоидов. Базальная мембрана утолщена, неровная. Некоторая часть канальцев имеет сохранившийся или частично сохранившийся сперматогенный эпителий. Клетки Лейдига немногочисленные, много погибающих клеток с мелкими пикнотичными ядрами и плотной цитоплазмой, часто наблюдается эффект маргинации хроматина в ядрах клеток Лейдига, что является признаком апоптотической гибели. Живые клетки – с темным, мелким гиперхромным ядром, т.е. морфофункционально малоактивные.

Морфометрические исследования подтвердили более выраженное повреждающее действие МТБЭ в условиях холодового стресса. Так, при сравнении с показателями морфометрии животных контрольной группы обнаружено: количество канальцев с десквамированным эпителием увеличилось на 90 %, индекс сперматогенеза существенно уменьшился –  $0,12 \pm 0,01$  в опыте против  $3,57 \pm 0,11$  в контроле ( $P > 0,05$ ), на базальной мембране семенных канальцев осталась меньшая половина сперматогоний, площадь ядер функционально активных клеток Лейдига также уменьшенная (табл. 1 и 2).

Таблица 1

**Результаты морфометрии семенников при действии МТБЭ ( $t=25\pm 2^{\circ}\text{C}$ )**

Показатели	Этапы исследования	Контроль ( $t=25\pm 2^{\circ}\text{C}$ )	МТБЭ ( $t=25\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
Количество канальцев со слущенным сперматогенным эпителием %	30 затравок	$3,88 \pm 0,65$	$35,94 \pm 1,05^*$
	Восстановление (30 дней последствия)	$3,32 \pm 0,22$	$3,37 \pm 0,5$
Индекс сперматогенеза	30 затравок	$3,76 \pm 0,17$	$2,75 \pm 0,20^*$
	Восстановление (30 дней последствия)	$3,83 \pm 0,23$	$3,52 \pm 0,05$
Количество сперматогоний в канальцах, %	30 затравок	$83,43 \pm 8,81$	$39,60 \pm 2,76^*$
	Восстановление (30 дней последствия)	$83,00 \pm 4,32$	$75,60 \pm 1,79^*$

Примечание: \* - разница достоверна при  $P < 0,05$ .

**Результаты морфометрии семенников при действии МТБЭ ( $t=4\pm 2^{\circ}\text{C}$ )**

Показатели	Этапы исследования	Контроль ( $t=4\pm 2^{\circ}\text{C}$ )	МТБЭ ( $t=4\pm 2^{\circ}\text{C}$ )
Количество канальцев со слущенным сперматогенным эпителием %	30 затравок	$4,54 \pm 0,39$	$94,67 \pm 1,32^*$
	Восстановление (30 дней последствия)	$6,53 \pm 0,22$	$37,27 \pm 10,2^*$
Индекс сперматогенеза	30 затравок	$3,57 \pm 0,11$	$0,12 \pm 0,01^*$
	Восстановление (30 дней последствия)	$3,75 \pm 0,05$	$1,64 \pm 0,66^*$
Количество сперматогоний в канальцах, %	30 затравок	$74,26 \pm 0,56$	$30,05 \pm 3,54^*$
	Восстановление (30 дней последствия)	$67,58 \pm 2,63$	$40,23 \pm 11,6^*$

Примечание: \* - разница достоверна при  $P < 0,05$ .

При проведении сравнительной характеристики действия МТБЭ в условиях температурного комфорта и в условиях холодного стресса отмечается, что в условиях холодного стресса МТБЭ приводит к увеличению количества канальцев с десквамированным эпителием до 95 %, тогда как при действии МТБЭ в условиях температурного комфорта этот показатель не превышает 36 %. Также, при действии МТБЭ в условиях холодного стресса наблюдается уменьшение индекса сперматогенеза, который составляет  $0,12 \pm 0,01$ . Действие МТБЭ в сочетании со сниженной температурой приводит к более значительному уменьшению количества сперматогоний на базальной мембране семенных канальцев в сравнении с действием МТБЭ в условиях температурного комфорта –  $30,05 \pm 3,54$  и  $39,60 \pm 2,76$ , соответственно. Также при действии МТБЭ в условиях сочетанного действия со сниженной температурой наблюдается уменьшение площади ядер клеток Лейдига, которая свидетельствует об угнетении продукции тестостерона.

После завершения периода последствия было установлено, что у крыс, которые подвергались действию МТБЭ в условиях температурного комфорта, все изученные показатели морфометрии оказались восстановленными по сравнению с группой животных, которые испытывали действие МТБЭ в условиях холодного стресса. Так, у крыс, которые испытывали действие МТБЭ в условиях холодного стресса было обнаружено, что семенные канальцы расположены рыхло с большими промежутками, имеют преимущественно овальную форму. Базальная мембрана неравномерная, местами утончена, сперматогонии расположены редко. Процесс сперматогенеза угнетен, в семенных канальцах количество всех видов клеток семяродного эпителия уменьшено, клетки расположены рыхло, зона роста утонченная. Все семенные канальцы с просветом, но в просветах рядом со сперматозоидами, часто встречается десквамированный эпителий. Клетки Сертоли – единичные, преимущественно прямоугольной формы. В межканальцевой строме клетки Лейдига полигональной формы, интенсивно окрашенные. Располагаются клетки Лейдига островками или цепочками, но общее их количество значительно меньше, чем в контрольной группе. Среди клеток Лейдига часто встречаются клетки с пикнотичными ядрами.

Таким образом, в субхроническом эксперименте на самцах крыс действие МТБЭ в условиях холодового стресса ( $t=4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) приводит к более значительным проявлениям его токсического действия на семенники крыс, которое характеризуется значительным увеличением количества канальцев с десквамированным эпителием, уменьшением индекса сперматогенеза и значительным уменьшением количества сперматогоний на базальной мембране семенных канальцев, что свидетельствует об истощении компенсаторных возможностей и начале периода декомпенсации. Через 30 дней после завершения периода действия МТБЭ в условиях температурного комфорта наблюдается полное компенсаторное восстановление микроструктуры семенной железы, тогда как в условиях холодового стресса наблюдается частичное компенсаторное восстановление микроструктуры семенной железы.

#### Библиографическое описание

1. Кундиев Ю. И. Современные проблемы комбинированного действия на организм производственных и социально-бытовых факторов (обзор литературы) / Ю. И. Кундиев, А. О. Навакатилян, В. В. Кальниш // *Врачебное дело*. – 1993. – № 5–6. – С. 35–41.
2. Основные показатели физиологической нормы у человека (руководство для токсикологов) / [Трахтенберг И. М., Тычинин В. А., Сова Р. Е. и др.]; под ред. И. М. Трахтенберга. – К. : «Авиценна», 2001. – 372 с.
3. Кундиев Ю.И. Профессиональное здоровье в Украине. Эпидемиологический анализ / Ю. И. Кундиев, А. М. Нагорная. – К. : «Авиценна», 2007. – 396 с.
4. Кундиев Ю. И. Химическая безопасность в Украине / Ю. И. Кундиев, И. М. Трахтенберг. – К. : «Авиценна», 2007. – 72 с.
5. Чашин В. П. Труд и здоровье человека на севере / В. П. Чашин, И. И. Деденко. – Мурманск, 1990. – 104 с.
6. Кустов В. В. Комбинированное действие промышленных ядов / В. В. Кустов, Л. А. Тиунов, Г. А. Васильев – М. : Медицина, 1975. – 256 с.
7. Завгородній І. В. До питання про сполучену дію хімічних чинників та холодового стресу (аналітичний огляд літератури) / І. В. Завгородній, М. П. Воронцов, Р. О. Бачинський // *Український журнал з проблем медицини праці*. – 2006. – № 3 (7). – С. 65–70.
8. Данилов А.М. Присадки к топливам и маслам в России / А. М. Данилов // *Вісник НАУ*. – 2009. – № 1. – С. 99–103.
9. Яворовський О. П. Особливості умов праці та стану здоров'я робітників, зайнятих виготовленням та застосуванням метилтретбутилового ефіру на НПЗ України / О. П. Яворовський, Ю. О. Паутовський // *Довкілля та здоров'я*. – 2008. – № 3 (46). – С. 60–63.
10. Biradar S. A. A novel method for the synthesis of 6-bromo-2-(3,4-dichlorophenyl)imidazo[1,2-a]pyridine using microwave irradiation / S. A. Biradar, V. K. Bhovi, Y. D. Bodke, R. Bhavanishankar // *Molbank*. – 2009. – № 1. – 587 p.
11. Mohr S. N. Health Effects of MTBE Among New Jersey Garage Workers / S. N. Mohr, N. Fiedler, C. Weisel, K. Kelly-McNeil // *Inhalation Toxicology*. – 1994. – Vol. 6, № 6. – P. 553–562.
12. Chang K. H. MTBE concentration profiles near MTBE manufacturing plant: Modeling approach and modeling uncertainty / K. H. Chang, C. H. Chen // *Chemosphere*. – 2009. – Vol. 75, № 10. – P. 1322–1328.
13. Kolb A. Methyl tert-butyl ether (MTBE) in snow samples in Germany / A. Kolb, W. Puttmann // *Atmos. Environ.* – 2006. – № 40. – P. 76–86.
14. Kolb A. Methyl tert-butyl ether (MTBE) in finished drinking water in Germany / A. Kolb, W. Puttmann // *Environmental Pollution*. – 2006. – № 140. – P. 294–303.

15. Phillips S. Epidemiology, toxicokinetics, and health effects of methyl tert-butyl ether (MTBE) / S. Phillips, R. Palmer, A. Brody // J. Med Toxicol. – 2008. – № 4 (2). – P. 115–126.
16. Vandecasteele Jean-Paul. Petroleum Microbiology / Jean-Paul Vandecasteele. – Editions Technip, Paris, 2008. – 816 p.
17. The effects of methyl tert-butyl ether (MTBE) on the male rat reproductive system / **D. Li, C. Yuan, Y. Gong [et al.]** // Food and Chemical Toxicology. – 2008. – Vol. 46, № 7. – P. 2402–2408.
18. **Effect of oral methyl-*t*-butyl ether (MTBE) on the male mouse reproductive tract and oxidative stress in liver / Ann de Peyster, Y. Rodriguez, R. Shuto [et al.]** // Reproductive Toxicology. – 2008. – Vol. 26, № 3–4. – P. 246–253.
19. **Cytotoxicity and oxidative stress study in cultured rat Sertoli cells with Methyl tert-butyl ether (MTBE) exposure / D. Li, Q. Liu, Y. Gong [et al.]** // Reproductive Toxicology. – 2009. – Vol. 27, № 2. – P. 170–176.
20. **Li D.** Methyl tert-butyl ether (MTBE)-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat spermatogenic cells / **D. Li, D. Yin, X. Han** // J. Appl. Tox. – 2006. – Vol. 27, № 1. – P. 10–17.
21. Патент № 39237 UA, МПК В01L 1/00, В01L 5/00. / Харківський національний медичний університет. Завгородній І.В., М'ясоєдов В.В., Бачинський Р.О., Іваненко Т.О., Векшин В.О. – З. № u200812926; Заявл. 06.11.2008; Опубл. 10.02.2009; Бюл. № 3. Затравочна камера.
22. Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования : Методические указания / [сост. Саноцкий И. В., Фоменко В. Н., Сальникова Л. С. и др.]. – М. : НИИ ГТ и ПЗ АМН СССР, 1978. – 35 с.