

ISSN 1563-0218
Индекс 75866; 25866

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ҚазҰУ ХАБАРШЫСЫ

Биология сериясы

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

ВЕСТНИК КазНУ

Серия биологическая

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

KazNU BULLETIN

Biology series

№2/2 (64)

Алматы
«Қазақ университеті»
2015

Утегалиева Р.С.,
Шаменов Д. Ж.,
Шатилова Х.А., Аралбаева А.Н.,
Мурзахметова М.К.

**Оценка влияния фунгицида
на состояние мембран
эритроцитов**

Utegaliyeva R., Shamenov D.,
Shatilova H., Murzahmetova M.,
Aralbayeva A.

**Estimation of fungicide influence
on a condition of erythrocytes'
membranes**

Өтегалиева Р.С., Шаменов Д.
Ж., Шатилова Х.А.,
Аралбаева А.Н.,
Мырзахметова М.Қ.

**Фунгицидтің эритроциттер
мембранасының күйіне әсерін
зерттеу**

Статья посвящена исследованию механизма действия фунгицида на состояние мембран эритроцитов в условиях *in vitro* и *in vivo*. Экспериментально доказано, что фунгицид оказывает неблагоприятное действие на мембраны красных кровяных клеток. В ходе проведенной работы выявлено, что фунгицид не оказывает существенного влияния на осмотическую резистентность мембран при концентрациях до 500 мкг в условиях *in vitro*, дальнейшее повышение концентрации привело к резкому повышению повреждающего эффекта токсиканта. Данные полученные при действии пестицида в условиях *in vivo* оказалось строго дозозависимым. Результаты экспериментов показали, что возможным механизмом повреждения мембраны эритроцитов явилось нарушение избирательной проницаемости мембраны, вследствие чего снизилась резистентность клетки к осмотическому шоку.

Ключевые слова: пестициды, фунгицид, эритроциты, осмотическая резистентность, мембрана, избирательная проницаемость

The article is devoted to research of the mechanism of fungicide action on a condition of erythrocytes' membranes as in conditions *in vitro* so in conditions *in vivo*. It is experimentally proved, that fungicide has destroying an effect on membranes of red blood cells. During the lead work it is revealed, that fungicide does not render essential influence on osmotic resistency of membranes at concentration up to 500 mkg in conditions *in vitro*, the further increase of concentration has led to sharp increase of damaging effect. Whereas action of pesticide in conditions *in vivo* has depended on dose. Results of experiments have shown, that the possible mechanism of damage of a membrane эритроцитов was infringement of selective permeability of a membrane owing to what resistency of a cell to an osmotic shock has decreased

Key words: Pesticides, fungicide, erythrocytes, osmotic resistency, a membrane, selective permeability

Мақалада *in vitro* және *in vivo* жағдайындағы эритроциттер мембранасының күйіне фунгицидтің әсер ету механизмін зерттеу жұмыстарының нәтижелері келтірілген. Тәжірибе жүзінде фунгицидтің қанның қызыл түйіршіктеріне зақымдаушы әсері дәлелденді. Жасалынған ғылыми жұмыс барысында *in vitro* жағдайында аталған пестицид 500 мкг дейінгі мөлшерде эритроциттердің осмотық резистенттілігіне едәуір әсер етпейтіндігі анықталды. Дегенмен 500 мкг жоғары концентрацияларды гемолиз дәрежесінің күрт жоғарылайтындығы белгілі болды. *In vivo* жағдайында фунгицид әсері қатаң түрде концентрацияға тәуелді болып шықты. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, эритроциттер мембранасының зақымдалу механизмі оның таңдамалы өткізгіштік қасиетінің өзгеруіне байланысты клетканың осмотық шок әсеріне төзімділігінің төмендеуі болып табылады.

Түйін сөздер: пестицидтер, фунгицид, эритроциттер, осмотық төзімділік, мембрана, таңдамалы өткізгіштік.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФУНГИЦИДА НА СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

Использование пестицидов – основа химического метода защиты растений, являющегося пока самым эффективным в борьбе с вредителями, болезнями и сорняками [1, 2]. Пестициды способствуют значительному сокращению потерь в сельском и лесном хозяйстве, деревообрабатывающей промышленности. Затраты на их применение окупаются в 5-12 раз. Однако, непомерное применение пестицидов (гербицидов, инсектицидов, дефолиантов) негативно влияет на качество окружающей среды [3-6]. Поэтому в настоящее время особую актуальность приобрела проблема применения пестицидов и исследование последствий воздействия пестицидов на природные экосистемы и здоровье людей [7-9]. Одной из широко применяемых в повседневной жизни групп пестицидов являются фунгициды. Фунгициды – химические вещества для борьбы с грибковыми болезнями растений, а также для протравливания семян с целью освобождения их от спор паразитных грибов.

Так как пестициды являются единственным загрязнителем, который сознательно вносится человеком в окружающую среду, проблема подобного загрязнения требует тщательного изучения и контроля со стороны человека. В связи с тем, что пестициды могут представлять реальную опасность здоровью человека, необходимость изучения механизма действия различных токсических веществ, в том числе и пестицидов на уровне клеток не вызывает сомнения.

Целью нашей работы явилось исследование механизма действия пестицида (фунгицида «Ордан») на состояние мембран эритроцитов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

В соответствии с целью и задачами работы эксперименты проводились в условиях *in vitro* и *in vivo*. Эксперименты проводили на эритроцитах белых беспородных крыс, массой 300-350 г. Кровь животных собирали после усыпления диэтиловым эфиром и декапитации. Эксперименты по изучению влияния фунгицида «Ордан» на резистентность мембран эритроцитов в условиях *in vivo* проводили на 30 крысах, разделенных на 3 группы. 1 группа – контрольные крысы. Животным опытных

групп в течение 1 месяца перорально вводили фунгицид из расчета 20 и 40 мг/кг массы животных

Выделение эритроцитов. Кровь центрифугировали 10 минут при 1000g. Плазму и лейкоциты удаляли, а эритроциты дважды промывали средой инкубации (СИ), содержащей 150 мМ NaCl, 5 мМ Na₂HPO₄ (pH-7,4). Полученную суспензию эритроцитов использовали для проведения исследований. Перед опытом эритроциты предварительно разводили в 10 раз СИ и инкубировали 5 мин при 37оС.

Исследование влияния протекторных соединений в условиях *in vitro* проводили путем преинкубации эритроцитов с веществами в среде инкубации при температуре 37°С в течение 30 минут. Затем образцы использовали для определения осмотической и перекисной резистентности эритроцитов, проницаемости эритроцитарных мембран.

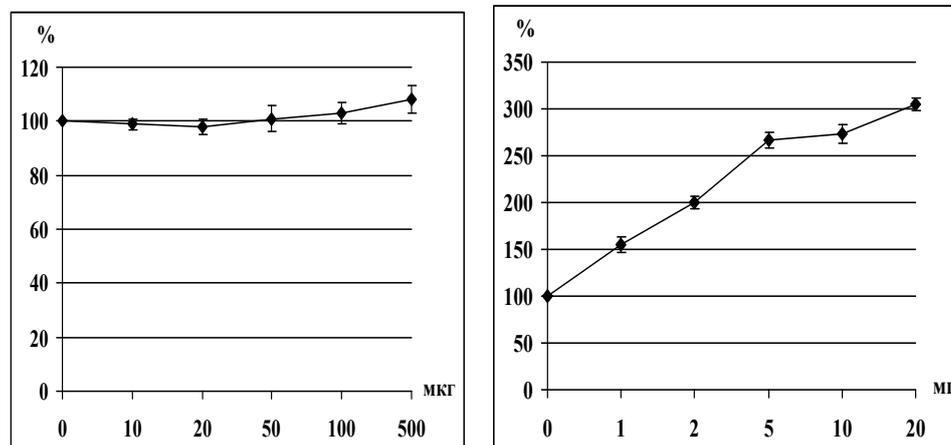
Осмотическая резистентность эритроцитов. Резистентность мембран эритроцитов изучали, инкубируя пробы в термостате при 37оС в течение 20 мин в растворах NaCl (0,4г/100мл) с добавлением различных концентраций экстрактов. Затем пробы центрифугировали 10 минут при 1000 г. и определяли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 540 нм.

Уровень гемолиза клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-ному гемолизу, вызванному раствором Na₂CO₃ в концентрации 0,1г/100мл.

Проницаемость эритроцитарных мембран (ПЭМ) определяли по методу [10]. Суспензию эритроцитов добавляли в среду, содержащую растворы мочевины (18 г/л) и NaCl (0,9 г/100 мл) в различном соотношении (65:35; 55:45; 45:55; 35:65). 100%-ный гемолиз вызывали, помещая суспензию эритроцитов в раствор Na₂CO₃ в концентрации 0,1г/100мл. После 3 минутной инкубации пробы центрифугировали при 1000 г 10 мин и определяли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 540 нм. Уровень гемолиза клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-ному гемолизу, вызванному раствором Na₂CO₃

Результаты и их обсуждение

В соответствии с поставленными задачами, в первой серии экспериментов были проведены исследования действия возрастающих концентраций фунгицида на осмотическую резистентность эритроцитов и проницаемость эритроцитарных мембран в условиях *in vitro*. Результаты экспериментов приведены на рисунках 1 и 2.



По оси абсцисс: концентрация фунгицида; мкг, мг, по оси ординат: степень гемолиза, %

Рисунок 1 – Исследование осмотической резистентности мембран эритроцитов при действии фунгицида

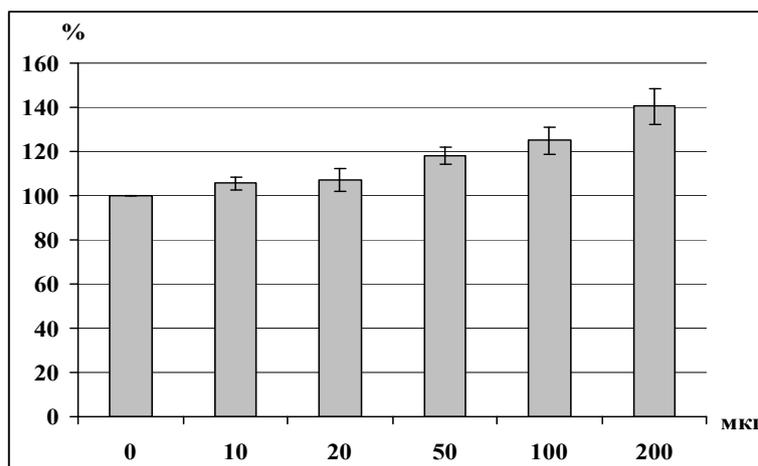
Как видно из рисунка 1, при действии концентраций фунгицида до 500 мкг существенного повышения уровня гемолиза не отмечалось, тогда как увеличение концентрации до 1 мг

привело к резкому увеличению количества гемолизированных клеток. При повышении концентрации фунгицида до 2 мг уровень гемолиза эритроцитов увеличивается в 2 раза, при дейст-

вии концентраций 5-10 мг резистентность клеток к осмотическому давлению снизилась в 2,6-3 раза.

Избирательная проницаемость – одно из основных свойств биологической мембраны, которое позволяет сохранять относительное постоянство внутренней среды клетки. На рисунке 2 приведены результаты экспериментов по оценке

влияния возрастающих концентраций фунгицида на проницаемость мембран. Как показали результаты исследований в условиях *in vitro*, при действии концентрации 10-20 мкг отмечается некоторое увеличение проницаемости мембран эритроцитов, степень гемолиза увеличилась на 7%, при действии концентрации свыше 50 мкг – на 18-40%.



По оси абсцисс: концентрация фунгицида; мкг, по оси ординат: степень гемолиза, %

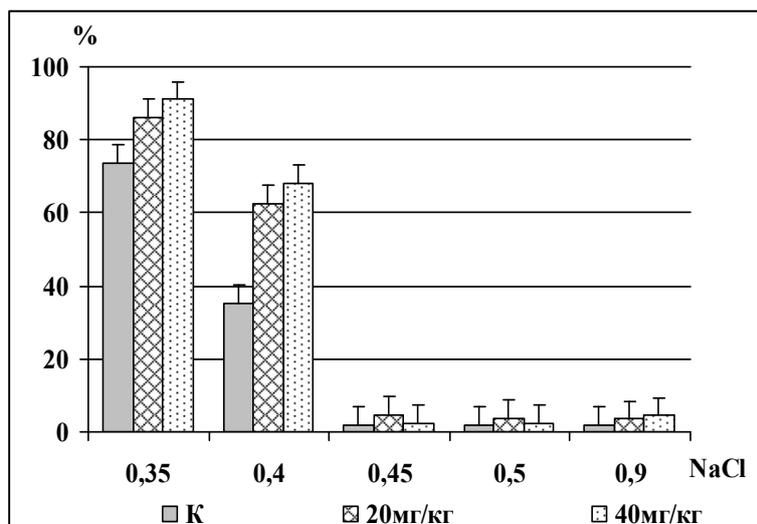
Рисунок 2 – Исследование проницаемости эритроцитарных мембран при действии фунгицида

В следующей серии экспериментов исследовано влияние фунгицида на состояние мембран эритроцитов в условиях *in vivo*. На рисунке 3 приведены результаты экспериментов в условиях *in vivo* по оценке влияния возрастающих концентраций фунгицида на состояние мембран эритроцитов.

Как видно из рисунка, отмечается повышение степени гемолиза в зависимости от действующей концентрации пестицида. В ходе проведенных экспериментов у опытных животных при действии фунгицида в течение 1 месяца наблюдается снижение резистентности эритроцитов в результате повышение количества гемолизированных клеток в гипотонических растворах NaCl. При действии токсиканта в концентрации 20 мг и 40 мг по сравнению контрольной группой,

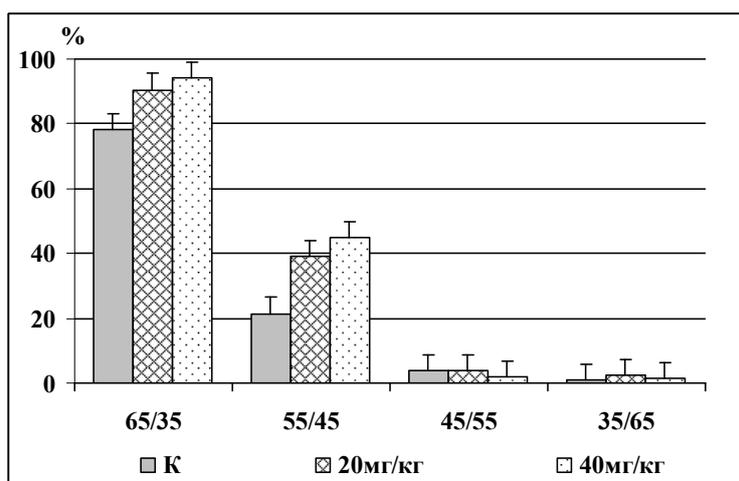
отмечено снижение осмотической резистентности эритроцитов на 12% и 26% (в 0,35% растворе NaCl) и на 27% и 33% (в 0,4% растворе NaCl) соответственно.

Аналогичные результаты получены в ходе исследования проницаемости эритроцитарных мембран подопытных животных (рисунок 4). Принцип метода определения ПЭМ – гемолиз в смесях изотонических растворов мочевины и хлористого натрия, обусловленный способностью мочевины быстро диффундировать через клеточную мембрану и, создавая гиперосмолярную концентрацию внутри эритроцита, вызывать его набухание с последующим гемолизом. При увеличении концентрации мочевины в гипотонических растворах хлорида натрия повышается степень гемолиза клеток.



По оси ординат: величина гемолиза, %; по оси абсцисс: концентрация NaCl, %.

Рисунок 3 – Исследование действия фунгицида на осмотическую резистентность эритроцитов



По оси ординат: величина гемолиза, %; по оси абсцисс: соотношение мочевины/NaCl, %.

Рисунок 4 – Исследование действия фунгицида на проницаемость мембран эритроцитов

Как видно из рисунка 4, при соотношениях растворов мочевины/NaCl 65/35 и 55/45 гемолизу подвергаются эритроциты животных всех исследуемых групп. Однако, степень гемолиза эритроцитов в группе подопытных крыс при действии фунгицида в концентрации 20 мг/кг массы тела, превышала таковую контроля на 16% при соотношении растворов 65/35 и на 55% при соотношении 55/45, и на 18% и 45% соответственно

при действии пестицида в дозе 40 мг/кг. Таким образом, проведенные исследования дают основание заключить, что токсическое действие пестицидов, фунгицида «Ордан» в частности, основано на механизме повреждения мембран клетки в результате изменения ее проницаемости и целостности структуры. Исследования в условиях *in vitro* и *in vivo* показали, что негативное влияние фунгицида проявляется дозозависимо.

Литература

- 1 Мельников Н.Н., Мельникова Г.М. Пестициды в современном мире // Соросовский образовательный журнал – 1997. – №4. - С.33-37.
- 2 Неменко Б.А., Спатаев М.Б., Криницина Л.А., Мукашева Л.Б., Кошкимбаева К.С. (Байгонова К.С.), Лян Л.Б., Жумагатаева Г.Н. Санитарные правила и нормы по применению химических средств защиты растений // Сборник санитарных правил и норм, методических указаний по токсикологии пестицидов. - Алматы, 2000.-128с.
- 3 Jang Y., Kim J.E., Jeong S.H., Cho M.H. Towards a strategic approaches in alternative tests for pesticide safety // Toxicol Res.- 2014. – Vol. 3. № 30. – P. 159-68.
- 4 Katagi T. Surfactant effects on environmental behavior of pesticides // Rev Environ Contam Toxicol.- 2008.- № 194.- P.71-177.
- 5 Katagi T. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms // Rev. Environ. Contam. Toxicol.- 2010 – № 204.- P.1-132.
- 6 Damalas C.A., Eleftherohorinos I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2011. – Vol 5.- № 8.- P.1402-19.
- 7 Beyer A., Biziuk M. Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls // Rev Environ Contam Toxicol.-2009. – № 201. – P. 137-58.
- 8 Сапарбеков М.К., Байгонова К.С., Аширбеков Г.К., Тянь А.Д. Принципы экологической эпидемиологии применительно к оценке риска при воздействии пестицидов на здоровье человека // Гигиена, эпидемиология және иммунобиология – 2008. – Том 36.-№2.- С. 91-94.
- 9 Belfroid AC(1), van Drunen M, Beek MA, Schrap SM, van Gestel CA, van Hattum B. Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems // Sci. Total. Environ.- 1998 . – Vol.3. – № 222. – P.167-83.
- 10 Колмаков В.Н., Радченко В.Г. Значение определения проницаемости эритроцитарных мембран (ПЭМ) в диагностике хронических заболеваний печени // Терапевтический архив. – 1982. – Т.54.- № 2. – С.59-62.

References

- 1 Melnikov N.N., Melnikova G.M. Pesticidih v sovremennom mire // Sorosovskiy obrazovatel'niy zhurnal – 1997. – №4.- S.33-37.
- 2 Nemenko B.A., Spataev M.B., Krinichna L.A., Mukasheva L.B., Koshkimbaeva K.S. (Baygonova K.S.), Lyan L.B., Zhumataeva G.N. Sanitarii pravila i normih po primeneniyu khimicheskikh sredstv zashchity rasteniy // Sbornik sanitarnikh pravil i norm, metodicheskikh ukazaniy po toksikologii pesticidov.- Almatih, 2000.-128s.
- 3 Jang Y., Kim J.E., Jeong S.H., Cho M.H. Towards a strategic approaches in alternative tests for pesticide safety // Toxicol Res.- 2014. – Vol. 3. № 30. – P. 159-68.
- 4 Katagi T. Surfactant effects on environmental behavior of pesticides // Rev Environ Contam Toxicol.- 2008.- № 194.- P.71-177.
- 5 Katagi T. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms // Rev. Environ. Contam. Toxicol.- 2010 – № 204.- P.1-132.
- 6 Damalas C.A., Eleftherohorinos I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2011. – Vol 5.- № 8.- P.1402-19.
- 7 Beyer A., Biziuk M. Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls // Rev Environ Contam Toxicol.-2009. – № 201. – P. 137-58.
- 8 Saparbekov M.K., Baygonova K.S., Ashirbekov G.K., Tyan A.D. Principih ehkologicheskoy ehpidemiologii primenitel'no k ocnke riska pri vozdeystvii pesticidov na zdorovje cheloveka // Gigiena, ehpidemiologiya zh'ne immunobiologiya – 2008. – Tom 36.-№2.- S. 91-94.
- 9 Belfroid AC(1), van Drunen M, Beek MA, Schrap SM, van Gestel CA, van Hattum B. Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems // Sci. Total. Environ.- 1998 . – Vol.3. – № 222. – P.167-83.
- 10 Kolmakov V.N., Radchenko V.G. Znachenie opredeleniya pronicaemosti ehritocitarnihk membran (PEhM) v diagnostike khronicheskikh zabollevaniy pecheni // Terapevticheskij arkhiv. – 1982. – T.54.- № 2. - S.59-62.