



УДК 611+616.36+616.61: 618.33-097:615. 9:616-036.12

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АПОПТОЗА В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ И ТИМУСЕ ПОТОМСТВА В УСЛОВИЯХ ВНУТРИУТРОБНОГО И РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПЕСТИЦИДОВ

Тулеметов С.К.

Ташкентский государственный стоматологический институт

✓ Резюме

Выявлено, что как фипронил, так и цигалотрин при воздействии через организм матери вызывают выраженную индукцию апоптоза в щитовидной и вилочковой железах потомства. Пестициды цигалотрин и фипронил в условиях внутриутробного и раннего постнатального воздействия вызывают индукцию апоптоза в щитовидной и вилочковой железах потомства. В механизме индукции апоптоза клеток, наряду с прямым токсическим действием препаратов, важную роль играют гипотиреоз и окислительный стресс, наблюдаемые у потомства.

Ключевые слова: пестицид, апоптоз, фипронил, цигалотрин, тимус, щитовидная железа

ХОМИЛАДОРЛИК ВА ИЛК ПОСТНАТАЛ ДАВРЛАРДА ПЕСТИЦИДЛАР ТАЪСИР ЭТТИРИЛГАН АВЛОДНИНГ ҚАЛҚОНСИМОН БЕЗИ ВА ТИМУСИДАГИ АПОПТОЗ ЖАРАЁНИНИ ИММУНОГИСТОКИМЁВИЙ БАҲОЛАШ

Тулеметов С.К.

Ташкентский давлат стоматология институту

✓ Резюме

Ҳар иккала пестициднинг қалқонсимон безда ва тимусда апоптоз жараёнини кучайтириши аниқланди. Апоптозни индукциялаш жараёни фипронил таъсир эттирилганда цигалотринга нисбатан анча баланд эканлиги аниқланди. Иммуногистокимёвий усуллар ёрдамида ҳомиладорлик ва илк постнатал даврларда пестицидлар таъсир эттирилган авлоднинг қалқонсимон беzi ва тимусидаги апоптоз жараёнининг кучайиши қайд этилди. Апоптоз индукцияси механизмида, пестицидларнинг бевосита токсик таъсири билан биргаликда, ўсаётган авлодда қузатилган гипотиреоз ва оксидланиш стрессининг муҳим ўрин тутиши таъкидланди.

Калит сўзлар: пестицид, апоптоз, фипронил, цигалотрин, тимус, қалқонсимон без

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF APOPTOSIS IN THE THYROID AND THYMUS OF OFFSPRING IN A PRENATAL AND EARLY POSTNATAL EXPOSURE TO PESTICIDES

Tulemetov S.K.

Tashkent State Dental Institute

✓ Resume

It was revealed that both fipronil and cyhalothrin, when exposed through the mother's body, cause a pronounced induction of apoptosis in the thyroid and thymus glands of the offspring. Pesticides cyhalothrin and fipronil under conditions of intrauterine and early postnatal exposure induce apoptosis in the thyroid and thymus glands of offspring. In the mechanism of cell apoptosis induction, along with the direct toxic effect of drugs, an important role is played by hypothyroidism and oxidative stress observed in offspring.

Keywords: pesticide, apoptosis, fipronil, cyhalothrin, thymus, thyroid

Актуальность

Программируемая смерть клетки (ПСК) или апоптоз является механизмом, имеющим решающее значение для организма при контроле пролиферации клеток и поддержании гомеостаза тканей [1,2,4]. В физиологических условиях между процессами апоптоза и пролиферации клеток существует определенное равновесие, которое позволяет поддерживать тканевой гомеостаз [1,6]. Дефекты в физиологических механизмах апоптоза могут привести к различным заболеваниям человека, в том числе и развитию злокачественных новообразований [1,4]. Этим объясняется большой интерес к углубленному изучению механизмов апоптоза и его эффекторных белков, а также генов, ответственных за апоптоз. Результаты этих исследований открыли бы большие возможности управлять процессом апоптоза и разрабатывать новые способы лечения различных заболеваний, в том числе и онкологических [1]. За последние годы выявлено, что многие загрязнители окружающей среды, в том числе и пестициды новых поколений, выступают в качестве триггеров апоптоза клеток [2,3,5,6]. Установлено, что один из самых широко распространенных и эффективных инсектицидов фипронил (Ф) существенно индуцирует апоптоз в линии клеток SH-SY5Y и *Drosophila* S2 в условиях *in vitro* [10]. Другой, не менее распространенный, пестицид пиретроидного класса ламбда-цигалотрин (Ц) приводил к увеличению фрагментации ядра клеток костного мозга крыс лимфоцитов крови человека, что указывало на индукцию апоптоза [5]. Большинство авторов считает, что индукция апоптоза под влиянием пестицидов связана с развитием окислительного стресса и последующей активацией ферментов семейства каспаз и апоптоз-стимулирующих белков семейства p53 [2,3,5,10]. Тем не менее, надо отметить, что все эти исследования проведены на клеточных линиях или на взрослых особях лабораторных животных. Ранее нами было показано, что внутриутробное и раннее постнатальное воздействие пестицидов через организм матери оказывает отрицательное влияние на органы эндокринной и иммунной систем потомства, приводя к их структурным и функциональным нарушениям роста и становления в динамике постнатального онтогенеза [9]. Однако, значение процессов апоптоза клеток в механизме этих нарушений остается невыясненным.

Цель исследования - иммуногистохимическая оценка апоптоза в щитовидной железе и тимусе потомства в условиях внутриутробного и раннего постнатального воздействия пестицидов.

Материал и методы

Опыты проводились на нерожавших, белых половозрелых крысах-самках, которые были подразделены на 3 группы по 30 животных в каждой. Две группы животных в течение 30 дней ежедневно *per os* получали соответственно пестициды цигалотрин (8 мг/кг) или фипронил (3,6 мг/кг). Третья группа, получавшая только аналогичный объем стерильного физиологического раствора, служила контролем. На следующие сутки самки были подсажены к здоровым самцам. Наступление беременности контролировали по наличию спермы во влагалищных мазках. Введение пестицидов самкам продолжалось непрерывно во время беременности и после родов вплоть до окончания лактации. Потомство, полученное от опытных и контрольных самок, исследовали в динамике на 3, 7, 14, 21 и 30 сутки после рождения. Для иммуногистохимической оценки апоптозных клеток использовали парафиновые срезы щитовидной железы и тимуса. Апоптозные клетки выявляли с помощью моноклональных кроличьих антител к фрагментам каспаз-3 и белкам семейства p-53 (производства Thermo Scientific, USA). Дальнейшие процедуры по визуализации меченых пероксидазой хрена апоптозных клеток проводились по стандартной схеме с помощью комплекса реагентов UltraVision (производства Thermo Scientific, USA). Срезы докрашивали метиленовым синим или нейтральным красным. Далее подсчитывали число меченых апоптозных клеток на 1000 - 5000 клеток среза и вычисляли индекс апоптоза в промиллях (‰). Все цифровые данные были обработаны методом вариационной статистики. Статистическая значимость между контролем и опытными группами сравнивалась с использованием теста Стьюдента и значения $P < 0,05$ считались достоверными.

Результат и обсуждения

Апоптозные клетки на срезах после проведения иммуногистохимической реакции выглядели темно-коричневыми за счет визуализации меченых пероксидазой хрена вторичных антител. Следует заметить, что частота выявления апоптозных клеток в ткани щитовидной железы как контрольных, так и опытных групп животных была значительно ниже, чем в тимусе (рис. 1, 2).

Различия между уровнями апоптоза клеток щитовидной железы и тимуса наиболее отчетливо проявлялись при количественном подсчете индекса апоптоза. Эти данные приведены в виде графиков (рис. 3,4). Как видно из рис. 3, уровень апоптоза в щитовидной железе контрольных животных очень низкий, по мере постнатального развития апоптоз умеренно усиливается.

В тимусе апоптоз изначально высокий, он значительно нарастает в динамике постнатального роста животных. Из приведенных графиков также видно, что внутриутробное и раннее постнатальное воздействие использованных пестицидов приводит к достоверному увеличению степени апоптоза клеток как щитовидной железы, так и тимуса. При этом индукция апоптоза клеток проявляется в более высокой степени при воздействии фипронила, нежели при воздействии цигалотрина.

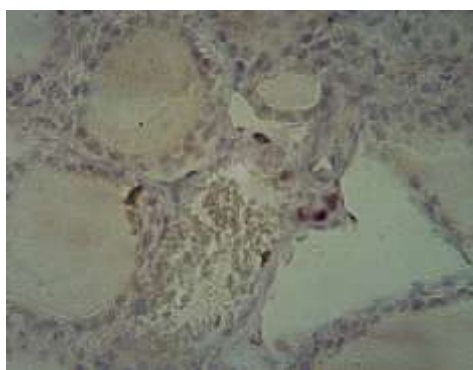


Рис. 1. Щитовидная железа потомства при воздействии фипронила на 21 сутки после рождения. Иммуногистохимическая реакция на апоптозные клетки с антителами к p53. Положительная реакция в виде темно-коричневых отложений на фоне слабо окрашенных тироцитов. Об. 10, ок.10.

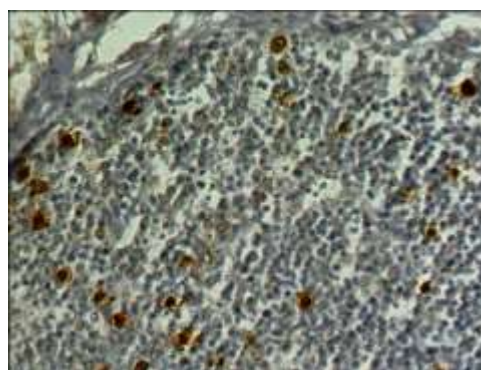


Рис.2. Тимус потомства при воздействии фипронила на 21 сутки после рождения. Иммуногистохимическая реакция на апоптозные клетки с антителами к p53. Многочисленные апоптоз-положительные клетки на фоне слабо окрашенных тимоцитов. Об. 4, ок.10.

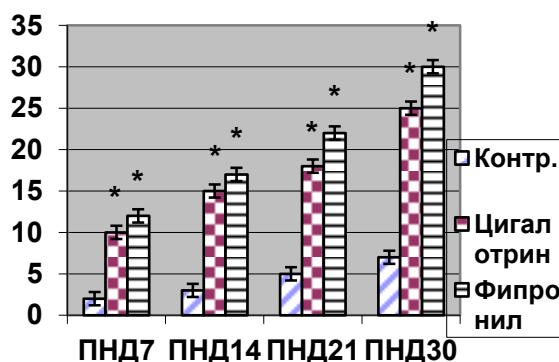


Рис.3. Индекс апоптоза клеток (в промиллях, %) щитовидной железы в динамике постнатального развития в условиях внутриутробного и раннего постнатального воздействия пестицидов.

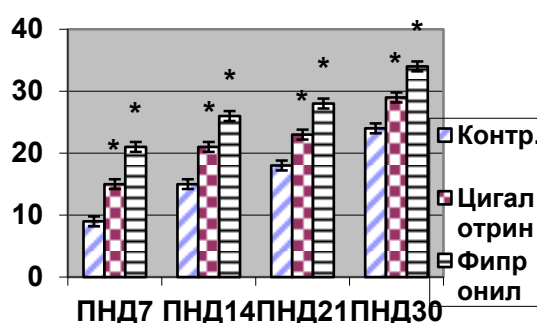


Рис.4. Индекс апоптоза клеток (в промиллях, %) тимуса в динамике постнатального развития в условиях внутриутробного и раннего постнатального воздействия пестицидов.

Примечание: Здесь и в рис.4 * - различия достоверны по сравнению с контролем, ПНД – постнатальные дни в сутках.

Обсуждение: Таким образом, как фипронил, так и цигалотрин при воздействии через организм матери вызывают выраженную индукцию апоптоза в щитовидной и вилочковой железах потомства. Наши предыдущие исследования показали, что оба пестицида в условиях внутриутробного и раннего

постнатального воздействия вызывают замедление темпов роста и становления щитовидной железы, снижение функции органа у потомства в виде гипотиреоза [9]. При этом гипотиреоз был более выражен при воздействии фипронилом по сравнению с цигалотрином. Данные последних лет показывают, что гормоны щитовидной железы обладают высоким анти-апоптотическим эффектом, что открывает большие перспективы для регуляции процесса апоптоза при различных заболеваниях [4]. Все это позволяет считать, что выраженность индукции апоптоза в наших опытах в известной мере определяется степенью нарушения функции щитовидной железы и ослаблением анти-апоптотического действия ее гормонов. Это подтверждается нашими данными, указывающими на более выраженную индукцию апоптоза при воздействии фипронилом. С другой стороны, важную роль в индукции апоптоза играет окислительный стресс, обусловленный увеличением продукции свободных радикалов [2,6]. Ранее нами было показано, что оба пестицида в условиях внутриутробного и раннего постнатального воздействия вызывают выраженный окислительный стресс у потомства [7,8]. Следовательно, индукция апоптоза у опытного потомства обусловлена не только прямым токсическим действием пестицидов, но и в значительной степени опосредована ослаблением анти-апоптотической функции тиреоидных гормонов вследствие гипотиреоза и возникающим окислительным стрессом в виде возрастания количества свободных радикалов.

Выводы

1. Пестициды нового поколения цигалотрин и фипронил в условиях внутриутробного и раннего постнатального воздействия вызывают индукцию апоптоза в щитовидной и вилочковой железах потомства.
2. В механизме индукции апоптоза клеток, наряду с прямым токсическим действием препаратов, важную роль играют гипотиреоз и окислительный стресс, наблюдаемые у потомства.
3. Индукция апоптоза клеток более выражена при воздействии фипронилом по сравнению с цигалотрином.
4. Раскрытие механизмов индукции апоптоза при воздействии пестицидов нового поколения способствует разработке патогенетических способов профилактики и лечения скрытых токсических эффектов у беременных женщин и их новорожденных детей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Goldar S., Khaniani M.S., Derakhshan S.M., Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. // Asian Pac J Cancer Prev. – 2015. - Vol. 16(6). - pp. 2129-2144.
2. Ki Y.W., Lee J.E., Park J.H., Shin I.C., Koh H.C. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. // Toxicol Lett. -2012. - Vol. 211(1). - pp. 18-28.
3. Lee J.E., Kang J.S., Ki Y.W., Lee S.H., et al. Akt/GSK3 β signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. //Toxicol Lett. - 2011. - Vol. 202(2). - pp. 133-141.
4. Lin H.Y., Glinsky G.V., Mousa S.A., Davis P.J. Thyroid hormone and anti-apoptosis in tumor cells. //Oncotarget. - 2015. 6(17): - pp. 14735-14743.
5. Muranli F.D. Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides λ -cyhalothrin and α -cypermethrin on human blood lymphocyte culture. //Bull Environ Contam Toxicol. - 2013. - Vol. 90.(3) - pp. 357-363.
6. Park J.H., Park Y.S., Lee J.B., Park K.H. et al., Meloxicam inhibits fipronil-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. // J Appl Toxicol. - 2015. Mar 13. doi: 10.1002/jat.3136.
7. Tukhtaev K.R., Tulemetov S.K., Zokirova N.B., Tukhtaev N.K. Effect of long term exposure low doses of lambda-cyhalothrin on the level of lipid peroxidation and antioxidant enzymes of the pregnant rats and their offspring. //Medical and Health Science Journal – 2012. - Vol. 13. - pp. 93-98. www.pradec.en
8. Tukhtaev K.R., Tulemetov S.K., Zokirova N.B., Tukhtaev N.K. et al. Prolonged exposure of low doses of Fipronil causes oxidative stress in pregnant rats and their offspring. // The Internet Journal of Toxicology. – 2013. – Vol. 10. - N. 1. www.ispub.com/IJTO/10/1/14550.
9. Tukhtaev K.R., Zokirova N.B., Tulemetov S.K., Tukhtaev N.K. et al. Effect of Prolonged exposure low doses of Fipronil on thyroid function of pregnant rats and their offspring. // The Internet Journal of Toxicology. – 2013. – Vol. 10. - N. 1. www.ispub.com/IJTO/10/1/14550.
10. Zhang B., Xu Z., Zhang Y., Shao X. et al. Fipronil induces apoptosis through caspase-dependent mitochondrial pathways in Drosophila S2 cells. // Pestic Biochem Physiol. -2015. - Vol. 119.-pp.81-89.

Поступила 09.06.2022