

Получена: 19 февраля 2016 / Принята: 27 марта 2016 / Опубликовано online: 6 мая 2016

УДК 618.11:616 -092.9:615.285.428

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРАНУЛЕЗНЫХ КЛЕТОК ЯИЧНИКОВ МЫШЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЛИНДАНА

Ару Д. Балмагамбетова ¹, <http://org/0000-0003-1151-5651>

Гульмира А. Журабекова ¹, <http://orcid.org/0000-0002-2166-3095>

Гuido Маккиарелли ², <http://orcid.org/0000-0003-1040-5338>

Мария Грация Пальмерини ², <http://orcid.org/0000-0003-3171-5888>

Стефания Анарита Ноттола ³, <http://orcid.org/0000-0003-1829-5989>

¹Западно-Казахстанский Государственный медицинский университет имени Марата Оспанова, Кафедра нормальной и топографической анатомии, Центр микроскопии, Кафедра жизни, здоровья и наук об окружающей среде, г. Актобе, Казахстан;

² Университет Л'Акуила, Кафедра анатомии, гистологии, судебной медицины и ортопедии, лаборатория электронной микроскопии имени Пьетро М. Мотта, г. Л'Акуила, Италия;

³ Университет Ла-Сапиенза, г. Рим, Италия

Введение. Анализ материалов, характеризующих среду обитания человека в Приаралье, показал резкое возрастание химического (пестициды, минеральные удобрения, солевые компоненты, тяжелые металлы) загрязнения питьевой воды, атмосферного воздуха, почв, пестицидного загрязнения продуктов питания растительного и животного происхождения, рыбопродуктов.

Цель исследования. Оценка ультраструктурных изменений гранулезных клеток мышей под действием пестицида линдана в условиях *in vitro* эксперимента.

Методы. Экспериментальная работа проведена в лаборатории Центра микроскопии Департамента жизни, здоровья и наук об окружающей среде университета Л'Акуила, Италия; на 80 мышах-самках контроль (10), контроль с раствором диметилсульфоксид (10), линдан 1 μM (20), линдан 10 μM (20), линдан 100 μM (20). Материалом исследования были гранулезные клетки яичников. После подготовки образцов для трансмиссионной электронной микроскопии, ультратонкие срезы (60-80 нм) получены на ультрамикротоме и контрастированы солями тяжелых металлов: уранилацетатом и цитратом свинца (Sic Рим, Италия).

Результаты. Сравнительный анализ в группах показал зависимость ультраструктурных изменения от применяемой концентрации линдана. Было обнаружено наличие клеток неправильной формы, начальные признаки фрагментации цитоплазмы, которая была заполнена множеством митохондрии и жировыми каплями. В группе с наиболее высокой концентрацией токсиканта появлялись клетки с маргинализацией хроматина, апоптозными телами и остатками единичных органелл.

Выводы: Воздействие линдана *in vitro* показало дозозависимое токсическое действие на гранулезные клетки; возникшие ультраструктурные изменения гранулезных клеток строго коррелировали от применяемой дозы.

Ключевые слова: Аральское море, окружающая среда, линдан, гранулезные клетки.

Summary

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF GRANULOSA CELLS OF MICE OVARIAN UNDER LINDANE EXPOSURE**Aru D. Balmagambetova** ¹, <http://org/0000-0003-1151-5651>**Gulmira A. Zhurabekova** ¹, <http://orcid.org/0000-0002-2166-3095>**Guido Macchiarelli** ², <http://orcid.org/0000-0003-1040-5338>**Maria Grazia Palmerini** ², <http://orcid.org/0000-0003-3171-5888>**Stefania Anarita Nottola** ³, <http://orcid.org/0000-0003-1829-5989>

¹ West Kazakhstan State Medical University n.a. M. Ospanov, Department of Normal and Topographical anatomy, Department of Life, Health and Environmental Sciences and Center of Electron Microscopies, Aktobe, Kazakhstan;

² University of L'Aquila, Department of Anatomy, Histology, Forensic Medicine and Orthopaedics, Laboratory of Electron Microscopy n.a. Pietro M. Motta, L'Aquila, Italy;

³ University La Sapienza, Rome, Italy

Introduction. Analysis of materials that characterize the human environment in the Aral Sea, has shown a sharp increase of the chemical (pesticides, fertilizers, salt components, heavy metals) pollution of drinking water, air, soil, pesticide contamination of food products of plant and animal origin, fishery products.

Aim. Evaluate the ultrastructural changes in granulosa cells of mice under the exposure of lindane pesticide in vitro.

Methods. The experimental work carried out in the Laboratory Centre of Microscopy Department of Life, Health and Environmental Sciences University L'Aquila, Italy; 80 female mice control (10), control with solution of dimethyl sulfoxide (10), lindane 1 μ M (20), lindane 10 μ M (20), lindane 100 μ M (20). The material of the study were ovarian granulosa cells. After preparing the samples for transmission electron microscopy, ultra-thin sections (60-80 nm) were obtained on an ultramicrotome and contrasted with salts of heavy metals with uranyl acetate and lead citrate (Sic Rome, Italy).

Results. Comparative analysis of the group showed the dependence of ultrastructural changes in the applied lindane concentration. The presence of irregularly shaped cells were observed early signs of fragmentation of the cytoplasm, which was filled with a plurality of mitochondria and fatty droplets. In the group with the highest concentration of toxicant cells appeared marginalization of chromatin remnants of apoptotic bodies and single organelles.

Conclusion. The exposure of lindane in vitro have shown a dose-dependent toxicity effect on the granulosa cells; ultrastructural changes caused granulosa cells strictly correlated on the applied dose.

Keywords: Aral sea, environment, lindane, granulosa cells.

Түйін

ЛИНДАННЫҢ ӘСЕРІМЕН ТЫШҚАНДАРДЫҢ АНАЛЫҚ БЕЗДЕРІНІҢ ТҮЙІРШІКТІ ЖАСУШАЛАРЫНЫҢ МОРФОЛОГИЯЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ**Ару Д. Балмагамбетова** ¹, <http://org/0000-0003-1151-5651>**Гульмира А. Журабекова** ¹, <http://orcid.org/0000-0002-2166-3095>**Гuido Маккиарелли** ², <http://orcid.org/0000-0003-1040-5338>**Мария Грация Пальмерини** ², <http://orcid.org/0000-0003-3171-5888>**Стефания Анарита Ноттола** ³, <http://orcid.org/0000-0003-1829-5989>

¹ Марат Оспанов атындағы Батыс Қазақстан Мемлекеттік медицина университеті, Қалыпты және топографиялық анатомия кафедрасы, Микроскопия орталығы Өмір, денсаулық сақтау және қоршаған ортаны қорғау ғылымдар кафедрасы, Ақтөбе қ., Қазақстан;

²Л'Акуила университеті, Анатомия, гистология, сот медицинасы және ортопедия кафедрасы, «Пьетро М. Мотта» атындағы электрондық микроскопия зертханасы, Л'Акуила қ., Италия;

³ Ла-Сапиенза университеті Рим қ., Италия

Кіріспе. Арал маңындағы адамдардың тұратын ортасын сипаттайтын материалдардың талдамасы ауыз суының, атмосфера ауасының, топырақтың химиялық ластануының (пестицидтер, минералдық тыңайтқыштар, тұз компоненттері, ауыр металдар), өсімдік және жануар текті азық-түліктің, балық өнімдерінің пестицидтік ластануының күрт өскенін көрсетті.

Зерттеу мақсаты. In vitro эксперимент жағдайларында линдан пестицидінің әсерімен тышқандардың түйіршікті жасушаларының ультрақұрылымдық өзгеруін бағалау болып табылды.

Әдістері. Эксперименттік жұмыс Л'Акуила, Италия университетінің Микроскопия орталығы Өмір, денсаулық сақтау және қоршаған ортаны қорғау ғылымдар кафедрасының зертханасында жүзеге асырылады; 80 аналық тышқандарға бақылау (10), бақылау диметилсульфоксид ерітіндісімен (10), линдан 1 μM (20), линдан 10 μM (20), линдан 100 μM (20) жүргізілді. Зерттеу материалы аналық бездің түйіршікті жасушалары. Трансмиссиялық электрондық микроскопия сынамаларды дайындау кейін, ультра жұқа кесінділер (60-80 нм) ультрамикротоммен алынды және уранилцитрат және қорғасын цитрат (Sic Рим, Италия) ауыр металдарының тұздарымен өңделген.

Нәтижесі. Топтарды салыстырмалы талдау барысында ультрақұрылымдық өзгерістер линданның қолданбалы концентрациясынан тәуелділігін көрсетті. Бұрыс пішінді жасушалардың, цитоплазма фрагментациясының бастапқы белгілері және цитоплазманың май тамшыларымен көптеген митохондрийлердің толуы байқалды. Уландырғыш заттың жоғары концентрациясы қолданылған топтарда жасушалардың хроматин маргинализациясы, апоптозды денелердің және жеке органеллалар қалдықтарының пайда болуымен сипатталды.

Қорытынды. In vitro линданының әсері түйіршікті жасушаларға тәуелді уландырғыш әсерді көрсетті; түйіршікті жасушалардың ультрақұрылымдық өзгерістері қолданылған мөлшерге сәйкес туғызылғаны мәлім болды.

Негізгі сөздер: Арал теңізі, қоршаған орта, линдан, түйіршікті жасушалар

Библиографическая ссылка:

Балмагамбетова А. Д., Журабекова Г.А., Маккиарелли Г., Пальмерини М.Г., Ноттола С.А. Морфологическая характеристика гранулезных клеток яичников мышей при воздействии линдана // Наука и Здравоохранение. 2016. №2. С. 106-117.

Balmagambetova A.D., Zhurabekova G.A., Macchiarelli G., Palmerini M.G., Nottola S.A. Morphological characteristics of granulosa cells of mice ovarian under lindane exposure. *Nauka i Zdravookhranenie* [Science & Healthcare]. 2016, 2, pp. 106-117.

Балмагамбетова А.Д., Журабекова Г.А., Маккиарелли Г., Пальмерини М.Г., Ноттола С.А. Линданның әсерімен тышқандардың аналық бездерінің түйіршікті жасушаларының морфологиялық сипаттамасы // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2016. №2. Б. 106-117.

Введение

Загрязняющие вещества, имея широкий диапазон влияния на здоровье человека, могут иметь различные неблагоприятные последствия, запуская целый ряд патологических реакции организма [28,5]. В

настоящее время развитие промышленности приводит к загрязнению окружающей среды различными отходами, химикатами, тяжелыми металлами. Для Казахстана экологической проблемой стала трагедия Аральского моря, которая привела к

экстремально-экологической, социально-экономической и санитарно-эпидемиологической ситуаций, с резким ухудшением состояния здоровья населения [1,2]. Данные литературы по изучению проблемы Арала показали, что в пылевых частицах со дна моря преобладают хлорорганические пестициды:

1. Дихлорфенилдихлорэтилен;
2. Гептахлор;
3. Гексахлорциклогексан;
4. Гексахлоран;
5. Альдрин;

Одним из агрессивных представителей из этого ряда хлорорганических пестицидов является гамма-гексахлорциклогексан или линдан [4,18,17].

Линдан (гамма-гексахлорциклогексан), и его изомеры являются хлорорганическими соединениями пестицидов, которые представляют собой коричневатый-белый кристаллический порошок с резким запахом. Линдан известен в качестве инсектицида в обработке древесины и деревянных конструкций, семян зерновых, плодовых и овощных культур, в приманках для борьбы с грызунами, а также для лечения чесотки (клещи) и вшей [3,26,25]. Линдан крайне опасен для человека и вреден для окружающей среды. Отравление линданом, как и другими поллютантами содержащимися в окружающей среде, происходит в основном пероральным путем, кожу, и путем вдыхания паров. Он быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта, и начинает всесторонне распространяться по организму. Особенности их негативного воздействия на организм является то, что эти вещества могут аккумулироваться в организме длительное время и оказывать постепенный эффект или отражаться на здоровье потомства. На сегодняшний день известно большое количество экспериментальных и клинических исследований воздействия этого веществ на организм человека и экспериментальных животных [7,14,22,32,23]. По данным ряда авторов наиболее уязвимой к воздействию хлорсодержащих пестицидов является женская репродуктивная система.

Целью данного исследования явилась оценка ультраструктурных изменений

гранулезных клеток мышей под действием линдана в условиях *in vitro* эксперимента. Задачи для достижения цели определить прогностические критерии функциональной активности яичников в эксперименте на основе ультрамикроскопического исследования гранулезных клеток фолликулов, оценка ультрамикроскопического исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии.

Материал и методы исследования

Данная экспериментальная работа проведена в лаборатории Центра микроскопии Департамента жизни, здоровья и наук об окружающей среде университета Л'Акуила, Италия; в период с мая по июль 2014 года на 80 мышах-самках, возраст 21-23 дня, весом 25-30гр. Животных содержали в соответствии с руководством по уходу и использованию лабораторных животных, все протоколы исследования были одобрены местным Комитетом по уходу за животными от 08.10.2013г. №4 (университета Л'Акуила, Италия).

Животные перед экспериментом содержались в условиях карантина, затем во время эксперимента содержались со свободным доступом к воде и пище, в условиях постоянной температуры (21-22 °C), с соблюдением светового режима 12/12 [10].

Выбор данного вида лабораторных животных основан на проведении экспериментальных исследований репродуктивной системы и обусловлен схожестью физиологии и генетики с человеческим организмом, в ускоренности процесса размножения, доступностью в приобретении [11].

Вначале эксперимента для стимуляции фолликулогенеза самкам вводили 5 ЕД сыворотки PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) – сыворотка гонадотропина фолликулостимулирующего действия. Через 48 часов под легким эфирным наркозом проводили забой животных методом цервикальной дислокации [24].

Изъятия яичников проводилось путем вскрытия передней брюшной стенки, отыскивались маточные трубы на концах

которых в слое жировой клетчатки обнаруживались яичники, которые осторожно срезались. Изъятый орган под микроскопом тщательно очищали от жировой клетчатки. Органы промывались в растворе PBS - Phosphate buffered saline (фосфатный буфер – физиологический раствор с pH: 7-7.4) при 37 ° C, затем переносились в чашки для культивирования (1008, Becton Dickinson и Компания, Franklin Lakes, Нью-Джерси, США), содержащей сбор MEM hepes - Minimum Essential Medium Eagle Modification (Life Technologies Italia, Fil. Life Technologies Europe BV, Monza MB, Италия), высокой мощности буферизации. Путем прокалывания яичников извлекалось содержимое фолликулов преовуляторных или гранулезных клеток, и получали кучевые ооцит-клеточные комплексы [12]. Смесь перемещалась в капсулы 3001 (Becton Dickinson Company, и Franklin Lakes, NJ, США).

Концентрация линдана для *in vitro* исследований заимствована Ханнелоре др., 1998, [9] в диапазоне от 7,5 до 100 μM и использована в диапазоне от 1 до 100 μM . Таким образом, определены 5 групп:

- 1) контроль (10)
- 2) Контроль с раствором (диметилсульфоксид, ДМСО) (10)
- 3) Линдан 1 μM (20)
- 4) Линдан 10 μM (20)
- 5) Линдан 100 μM (20)

Этапы:

Для созревания клеток была использована среда DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Великобритания) 5% FBS, дополненная 2 mM L-глутамин и антибиотиками (пенициллин 100 mM и 100 μg / ml стрептомицин) (Sigma Life Science, Spruce Street, St. Louis, MO, США). В контроле с раствором ДМСО использован в концентрации 0,01%. Линдан (γ - 1,2,3,4,5,6 - гексахлорциклогексан) (Sigma Life Science, Spruce Street, St. Louis, MO, USA 45548-250MG) разводили в диметилсульфоксиде (Sigma Life Science, Spruce Street, St. Louis, MO, США), чтобы получить концентрации описанные выше. Серии разведения готовились от исходного раствора ДМСО, для

получения конечной концентрации 1, 10 и 100 μM , но таким образом, чтобы не превышать максимальную концентрацию ДМСО 0,1%.

Образцы помещались в термостат при 37 ° C и 5% CO₂ в течение 24 часов. После промывания в PBS, центрифугирования и фиксирования в 2.5% глутаральдегиде (SIC, Roma, Италия) в PBS.

Подготовка образцов для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

ТЭМ: промывка в PBS, постфиксация с 1% тетраоксида осмия (Agar Scientific, Stansted, Великобритания) в PBS и с повторной промывкой в PBS. Гранулы помещены в 1% агар, который подвергся дегидратации в возрастающей серии спиртов (Carlo Erba reagents, Milan, Италия).

Далее образцы фиксированы в пропиленоксиде в течение двадцати минут (BDH Italia, Milan, Италия), с последующим добавлением эпоксидной смолы (Electron Microscopy Sciences, 1560 Industry Road, Hatfield, PA, UK Великобритания). Ультратонкие срезы получены на ультрамикротоме Reichert-Jung Ultracut.

Ультратонкие срезы (60-80 нм) получены на ультрамикротоме и контрастированы солями тяжелых металлов: уранилацетатом и цитратом свинца (Sic Рим, Италия). Получены микрофотографии с Zeiss EM 10 и трансмиссионной электронной микроскопией Philips CM 100 (80 kV).

Результаты исследования

Группа 1 (контроль). Трансмиссионная электронная микроскопия дает хорошую возможность оценить внутриклеточную организацию. Так хорошо визуализируется цитоплазма, включающая ядро, митохондрии, трубчатые элементы эндоплазматического ретикулума, комплекс Гольджи и липиды.

В ядре прослеживаются бороздчатые глубокие перегибы, ограниченные ядерной мембраной, заметен хроматин, равномерно распределенный в сгустках или утолщен. Митохондрии многочисленны, круглой или эллиптической формы, заметны их митохондриальные кристы и разделяющие их электронно-плотные двойные мембраны. Выявлены многочисленные трубчатые

электронегативные элементы гладкой эндоплазматической сети. Обнаружены нерегулярные контуры пузырьков Гольджи и капли жиров.

Мембрана плазмы и цитоплазмы представлена многочисленными микроворсинками, что указывает на интенсивную активность межклеточной коммуникации. В цитоплазме также содержатся электронегативные небольшие пузырьки и остатки клеток. Гранулезные клетки были идентифицированы в культуре в разной степени дегенерации, о чем свидетельствовали апоптозные тела и клеточные фрагменты. Даже среди очевидно здоровой популяции клеток, часто отмечались ультраструктурные морфологические признаки, указывающие на апоптоз - такие, как маргинализация ядра (на ранних стадиях апоптоза), везикулизация плазматической мембраны ("блеббинг"), неорганизованных органелл, неповрежденной клеточной мембраной (рис 1).

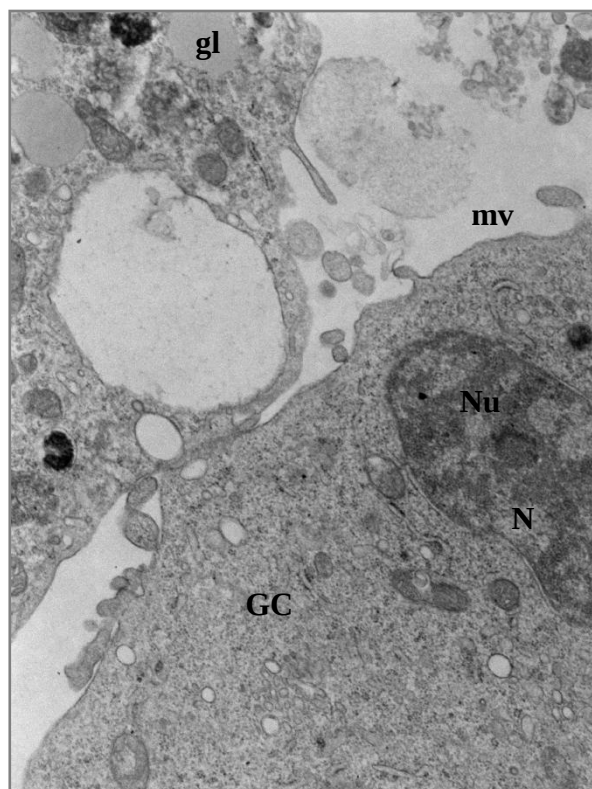


Рисунок 1. На снимке ТЭМ ультраструктура гранулезных клеток контрольной группы, GC: гранулезные клетки; N: ядро; Nu: ядрышко; GL: липидные капли, MV: микроворсинки.

Группа 2. Под действием диметилсульфоксида (ДМСО), раствора,

использованного для разведения линдана, популяция гранулезных клеток была представлена, здоровыми клетками - более или менее с четким округлым ядром и одним или несколько сильно окрашенными ядрышками – вперемешку с апоптозными клетками и многочисленными клеточными фрагментами. В отличие от контроля, некоторые клетки показали более интенсивный цвет, чем другие зоны.

На ТЭМ клетки, имеют неправильную форму, зачастую с инвагинацией ядерной мембраны. Некоторые клетки содержали большое количество жировых капель в частности митохондриях. В нескольких отмечалось частичное втягивание клеточных соединений, которые не постоянно проявлялись.

Было обнаружено явление клеточной дегенерации как раз характерной для этой группы, с инвагинацией ядерной и клеточной фрагментации, с наличием апоптозных тел и везикулизацией ядерной мембраны (рис 2).

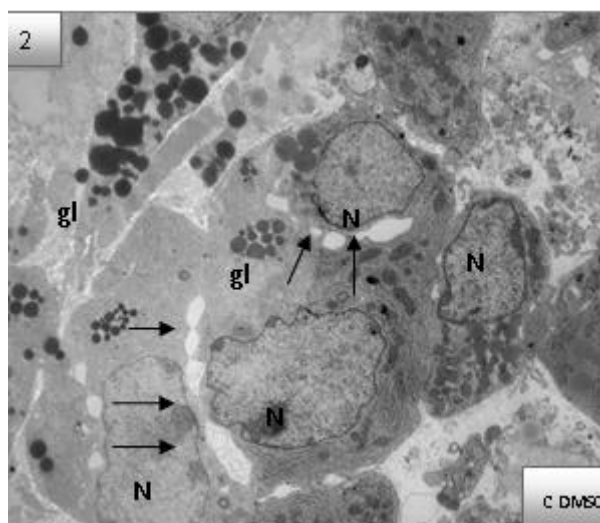


Рисунок 2. ТЭМ ультраструктура гранулезных клеток контроль ДМСО. Клетки с признаками втягивания межклеточных контактов (стрелки). N: ядро; GL: жировые капли.

Группа 3. Оценка ТЭМ выявила наличие клеток неправильной формы, оснащенных большими яйцевидной формы ядрышками, содержащих хроматин, сгруппированных в центре или склонных к приближению ядерной мемbrane.

На некоторых участках были обнаружены начальные признаки фрагментации

цитоплазмы. Цитоплазма была заполнена множеством митохондрий и жировыми каплями (рис 3).

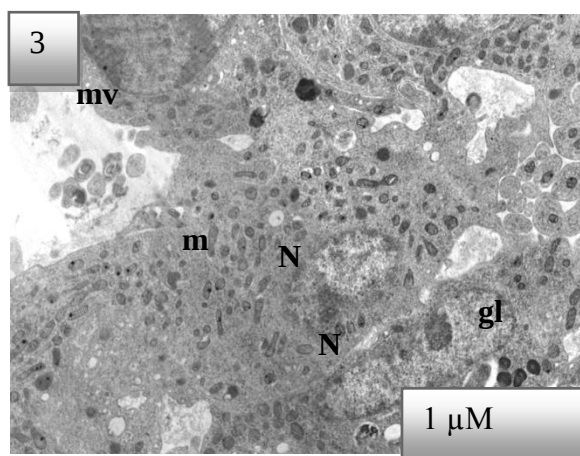


Рисунок 3. ТЭМ ультраструктура гранулезных клеток линдан 1 μM . Неправильной формы клетки, с признаками фрагментации клетки (звездочки). MV: микроворсинки; N: ядро; m: митохондрии; GL: жировые капли.

Группа 4. В данной группе культивированные клетки при дозе 10 μM характеризовались изменением в ядре, слегка неправильной формы и наличием бледных апоптозных тел разной величины. Ультраструктурный анализ показал структуру явной дегенерации клеток, как показано клетки с маргинализацией хроматина, апоптозными телами и остатками единичных органелл или фрагментами цитоплазматической мембраны (рис 4).

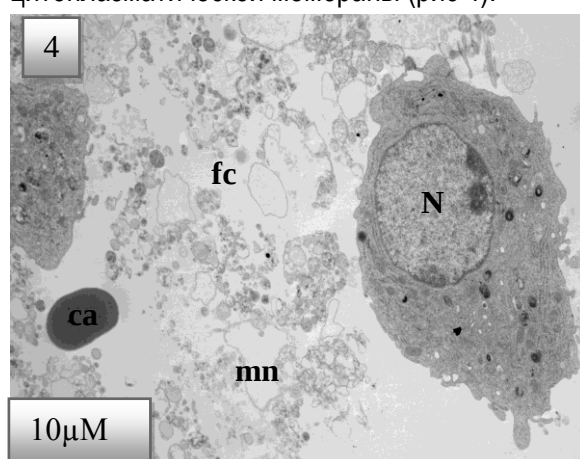


Рисунок 4. ТЭМ ультраструктура гранулезных клеток при дозе 10 μM линдан. Дегенерация клеток с утолщением хроматина под ядерной мембраной, с фрагментами цитоплазмы по близости и апоптозное тело (ca), N: ядро; fc: фрагменты клетки, mn: ядерная мембрана

Группа 5. С помощью ТЭМ были подтверждены результаты научных наблюдений: почти все клетки подверглись апоптозу, о чем свидетельствовало обнаружение многочисленных фрагментов цитоплазмы или мембраносвязанных органелл, апоптозных тел, фрагментов ядер и ядерных мембран (рис 5).

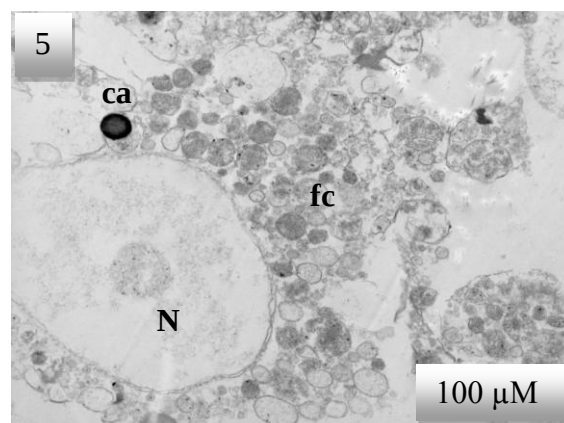


Рисунок 5. ТЭМ ультраструктура гранулезных клеток 100 μM линдан, клеточная дегенерация разной степени. ca: апоптотические тела; N: фрагмент ядра fc: фрагменты клетки.

Обсуждение результатов исследования
Анализ литературы показал, что длительное воздействие хлорсодержащих соединений выявило их кумулятивную способность в отношении репродуктивных органов экспериментальных животных [20], т.е. агрессивность токсикантов зависит не только от дозы, но и строго коррелирует с кратностью и длительностью воздействия. Выбор концентраций линдана был определен по данным литературы, диапазона от 1 до 100 μM линдана, поскольку при дозе близкой к 100 μM наблюдалась высокая частота гибели клеток путем апоптоза, о чем свидетельствуют различные *in vitro* исследования [9]. Было также отмечено, что нормальная *in vitro* архитектура фолликула была изменена при дозе линдана 15 ммоль. Этот эффект был обусловлен отсутствием развития нормальных межклеточных соединений (щелевых контактов) из-за отсутствия экспрессии гена коннексина 43 [6]. Изучение воздействия непосредственно на клетку в условиях *in vitro* дает более детальную морфологическую картину понимания прямого, однократного

воздействия соединения. Так по результатам нашего исследования отмечена прямая зависимость степени структурных клеточных изменений от дозы линдана, чем выше концентрация, тем отчетливее проявляется деструкция органелл, апоптотические изменения. Исследования, проведенные C.Campagna, M.Sirard [13] по исследованию воздействия органохлоридной микстуры содержащей в своем составе более 10 сложных органических компонентов на созревание, оплодотворение и развитие эмбриона показало, что также имеется строгая дозозависимость проявления клеточных повреждений. Так ими обнаружено, что в изучаемых группах качество расширения (распространения на стекле) кучевого облака клеток коррелировало от дозы, примененной в группе [15]. Полученные результаты схожи с полученными нами результатами, выявлено линейное возрастание уровня апоптоза клеток, т.е. чем выше концентрация, тем выраженные структурные изменения. Однако преимуществом нашего исследования в сравнении с полученными результатами C.Campagna, M.Sirard [13] является возможность избирательного изучения хлорсодержащего пестицида, что дает наиболее точную картину токсичности Линдана в различных концентрациях.

M.Scascitelli, F.Pacchierotti [27] исследовали репродуктивную токсичность линдана на самках в условиях *in vivo*, а в точности токсичность на развивающиеся ооциты до оплодотворения и кратковременную эмбриотоксичность на ранних стадиях деления клеток. Данное исследование подтверждает наши результаты, при воздействии линдана возникли необратимые повреждения в виде лизиса, фрагментации клеточных структур. Данное исследование наиболее расширило представление о токсичности пестицида и представило также дальнейший возможный механизм линдан-индуцированного эмбриотоксического эффекта.

По данным ряда исследований, токсичность связана с возможными изменениями на уровне рецепторов гормонов, в частности, на рецептор эстрогена

[21]. Некоторые исследования показывают, что токсический эффект, может быть вызван торможением клеточных стыков [16], и индукционными механизмами запрограммированной клеточной гибели или апоптоза [31]. Линдан и другие хлорорганические соединения могут действовать как антагонисты на рецепторы эстрогена, таким образом, действуя как эндокринные модуляторы или "эндокринные разрушители" во время созревания органов женской репродуктивной системы [19]. Кроме того, воздействие высоких доз токсического агента (40-100 μM) вызывают проапоптотические факторы, активирующие запрограммированную гибель гранулезных клеток [29]. Это подтверждается с данными нашего исследования, полученными при высокой концентраций линдана (100 μM). Ультраструктурный анализ показал наличие явления апоптоза, а также зависимость между концентрацией токсичного агента и гибелью клеток [30].

Заключение

Воздействие линдана *in vitro* показало дозозависимое токсическое действие на гранулезные клетки. Возникшие ультраструктурные изменения гранулезных клеток строго коррелировали от применяемой дозы, что привело при низкой дозе линдана 1 μM к появлению клеток неправильной формы, обнаружению начальных признаков фрагментации, а при высокой дозе линдана 100 μM к выраженным проявлениям апоптоза в клетках. Только исходя из полученных результатов, на основании воздействия в моно и малых концентрациях, можно прогнозировать последствия, которые могут возникнуть при хроническом и «микс» воздействии химических соединений региона на репродуктивную систему женщины, неизбежны наиболее выраженные морфологические изменения органов, приводящие к снижению функциональной способности.

Исследование проводилось в рамках программно-целевого НТП «Разработка новых технологий охраны здоровья детей и репродуктивного здоровья, фрагмент 1.3

«Медико-биологический мониторинг, профрисков репродуктивного здоровья мужчин и женщин, работающих с вредными факторами, с последующим расчетом рисков для репродуктивного здоровья работников вредных и опасных производств и здоровья их потомства».

Вклад авторов:

Балмагамбетова А.Д. – подготовка материалов к публикации, практическое проведение всех этапов данного эксперимента;

Журабекова Г.А., Пальмерини Мария Грация – практическое проведение всех этапов данного эксперимента, статистическая обработка;

Маккиарелли Гуидо, Ноттола Стефания Анарита – научное руководство по написанию статьи.

Литература:

1. Аладин Н. В., Плотников И. С. Современная фауна остаточных водоемов, образовавшихся на месте бывшего Аральского моря // Труды Зоологического института РАН. 2008. №1/2. С. 145-154.

2. Бурнакова Е. Приаралье: экологический кризис – социально-экономический кризис - миграция - угрозы политической стабильности? // Вестник Евразии. 2002. №3. С.150-173.

3. Калмакова Ж. А. Влияние внешней среды в зоне экологической катастрофы на формирование здоровья населения // Медицина. 2013. №4. С. 65-67.

4. Семенов О. Е. и соавт. Ветровой вынос и песчано-солевые выпадения с осушенной части дна Аральского моря // Аридные экосистемы. 2006. Том 12. №29. С.47-58.

5. Подзноева З. Л. Влияние техногенных и природных факторов на организм человека // Экология промышленного производства. 2010. №5. С.31-35.

6. Ackert C. L., Gittens J. E., O'Brien M. J., Eppig J. J., Kidder G. M. Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse // Dev Biol. 2001. 233. P. 258-270.

7. Akhilesh K. C. et all. Engineering bacteria for bioremediation of persistent organochlorine pesticide lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) // Bioresource Technology. 2013. 149. P. 439–445.

8. Alm H., Tiemann U., Torner H. Influence of organochlorine pesticides on development of mouse embryos in vitro // Reproductive Toxicology. 1996. 10. P. 321-326.

9. Alm H., Torner H., Tiemann U., Kanitz W. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro // Reproductive Toxicology. 1998. 12. P. 559-563.

10. Cecconi S., Rossi G., Cotichio G., Macchiarelli G., Borini A., Canipari R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development in vitro // Fertil Steril. 2004. 81. P. 919–24.

11. Cecconi S., Rossi G. Mouse antral oocytes regulate preantral granulosa cell ability to stimulate oocyte growth in vitro // Developmental Biology. 2001. 233. P. 186–191.

12. Cecconi S. et al. Akt expression in mouse oocytes matured in vivo and in vitro // Reproductive BioMedicine Online. 2010. 20. P. 35–41.

13. Campagna C., Sirard M. A., Ayotte P., Bailey J. L. Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organo- chlorine mixture // Biol Reprod. 2001. 65. P. 554–560.

14. Devendra K. B., Mehajbeen B. Modulation of tricarboxylic acid cycle dehydrogenases during hepatocarcinogenesis induced by hexachlorocyclohexane in mice // Experimental and Toxicologic Pathology. 2009. 61. P. 325–332.

15. Foster W., Chan S., Platt L., Hughes C. Detection of endocrine disrupting chemicals in samples of second trimester human amniotic fluid // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2000. 85. P. 2954-2955.

16. Ke F-C., Fang S-H., Lee M-T., Sheu S-Y., Lai S-Y., Chen Y. J., Huang F-L., Wang P. S., Stocco D. M., Hwang J-J. Lindane, a gap junction blocker, suppresses FSH and transforming growth factor β 1-induced connexin43 gap junction formation and steroidogenesis in rat granulosa cells // J.

Endocrinol. 2005. 184. P. 555–566.

17. Kuni O., Hashizume M., Chiba M., Sasaki S., Shimoda T., Caypil W., Dauletbaev D. Respiratory Symptoms and Pulmonary Function among School-Age Children in the Aral Sea Region // Archives of Environmental Health. November 2003. 11. Vol. 58.

18. Jensen S., Mazhitova Z., Zetterstrom R. Environmental pollution and child health in the Aral Sea region in Kazakhstan // Sci Total Environ. 1997. 206. P. 187–93.

19. Li R., Mather J. P. Lindane, an inhibitor of gap junction formation, abolishes oocyte directed follicle organizing activity in vitro // Endocrinology. 1997. 138. P. 4477–4480.

20. Lindenau A., Fisher B., Seiler P., Beier H. M. Effects of persistent chlorinated hydrocarbons on reproductive tissues in female rabbits // Hum.Reprod. 1994. 9. P. 772–80.

21. Maranghi F., Rescia M., Macri C., Di Consiglio E., De Angelis G., Testai E. et al. Lindane may modulate the female reproductive development through the interaction with ER-beta: an in vivo–in vitro approach // Chem Biol Interact. 2007. 169. P. 1–14.

22. Milagrosa O. et al. Lindane toxicity on early life stages of gilthead seabream (*Sparus aurata*) with a note on its histopathological manifestations // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2008. 25. P. 94–102.

23. Rasier G. et al. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: A review of rodent and human data // Molecular and Cellular Endocrinology. 2006. 254–255. P. 187–201.

24. Rossi G., Buccione R., Baldassarre M., Macchiarelli G., Palmerini M. G., Cecconi S. Mancozeb exposure in vivo impairs mouse oocyte fertiliz- ability // Reprod Toxicol. 2005.

25. Padma V. V. et al. Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats // Food and Chemical Toxicology. 2011. 49. P. 991–998.

26. Report on Carcinogens, Thirteenth Edition National Toxicology Program, Department of Health and Human Services For Table of Contents, see home page: <http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc13>.

27. Scascitelli M., Pacchierotti F. Effects of lindane on oocyte maturation and

preimplantation embryonic development in the mouse // Reproductive Toxicology. 2003. 17. P. 299–303.

28. Stephen A. S. Noise Effects on Health in the Context of Air Pollution Exposure // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2015. 12. P. 12735–12760.

29. Tiemann U., Pohland R. Inhibitory effects of organochlorine pesticides on intercellular transfer of Lucifer Yellow in cultured bovine oviductal cells // Reprod Toxicol. 1999. 13. P. 123–130.

30. Tiemann U., Pohland R., Kuchenmeister U., Viergutz T. Influence of organochlorine pesticides on transmembrane potential, oxidative activity, and ATP-induced calcium release in cultured bovine oviductal cells // Reprod Toxicol. 1998. 12. P. 551–557.

31. Usman M. et al. Chemical oxidation of hexachlorocyclohexanes (HCHs) in contaminated soils // Science of the Total Environment. 2014. 476–477. 434–439.

32. Zucchini N., de Sousa G., Bailly-Maitre B., Gugenheim J., Bars R., Lemaire G., Rahmani R., Regulation of Bcl-2 and Bcl-xL anti-apoptotic protein expression by nuclear receptor PXR in primary cultures of human and rat hepatocytes // Biochim. Biophys. 2005. 1745. P. 48–58.

References:

1. Aladin N. V., Plotnikov I. S. Sovremennaya fauna ostatochnykh vodoemov, obrazovavshikhsya na meste byvshego Aral'skogo moray [The modern fauna of residual waters, formed on the site of the former Aral Sea]. Trudy Zoologicheskogo instituta RAN [Proceedings of the Zoological Institute of Russian Academy of Sciences]. 2008, №1/2, pp. 145–154. [in Russian]

2. Burnakova E., Priaral'e: ekologicheskiy krizis - sotsial'no"ekonomicheskiy krizis - migratsiya - ugrozy politicheskoy stabil'nosti? [Aral region: the environmental crisis - social "economic crisis - migration - a threat to political stability?]. Vestnik Evrazii [Herald of Eurasia]. 2002, №3, pp. 150–173. [in Russian]

3. Kalmakova Zh. A. Vliyanie vneshney sredy v zone ekologicheskoy katastrofy na formirovanie zdorov'ya naseleniya [The impact of the environment in the zone of ecological

disaster on the formation of health]. *Meditcina* [Medicine]. 2013, № 4, pp. 65-67.

4. Semenov O. E. i soavt. Vetrovoy vynos i peschano-solevye vypadeniya s osushennoy chasti dna Aral'skogo moray [Wind deflation and sand and salt deposition from the drained part of the Aral sea bottom]. *Aridnye ekosistemy* [Arid Ecosystems]. 2006, Tom12, №29, pp. 47-58.[in Russian]

5. Podznoeva Z. L. Vliyanie tekhnogennykh i prirodnikh faktorov na organizm cheloveka [Influence of anthropogenic and natural factors on the human body]. *Ekologiya promyshlennogo proizvodstva* [Ecology of industrial production]. 2010, №5, pp. 31-35.

6. Ackert C. L., Gittens J. E., O'Brien M. J., Eppig J. J. and Kidder G. M. (2001) Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol.* 2001, 233, pp. 258-270.

7. Akhilesh K. C. et al. Engineering bacteria for bioremediation of persistent organochlorine pesticide lindane (gamma-hexachlorocyclohexane). *Bioresource Technology.* 2013, 149, pp. 439-445.

8. Alm H., Tiemann U., Torner H. Influence of organochlorine pesticides on development of mouse embryos in vitro. *Reproductive Toxicology.* 1996, 10, pp. 321-326.

9. Alm H., Torner H., Tiemann U., Kanitz W. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro. *Reproductive Toxicology.* 1998, 12, pp. 559-563.

10. Cecconi S., Rossi G., Coticchio G., Macchiarelli G., Borini A., Canipari R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development in vitro. *Fertil Steril.* 2004, 81, pp. 919-24.

11. Cecconi S., Rossi G. Mouse antral oocytes regulate preantral granulosa cell ability to stimulate oocyte growth in vitro. *Developmental Biology.* 2001, 233, pp. 186 – 191.

12. Cecconi S. et al. Akt expression in mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Reproductive BioMedicine Online.* 2010, 20, pp. 35-41.

13. Campagna C., Sirard M. A., Ayotte P., Bailey J. L. Impaired maturation, fertilization,

and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organo- chlorine mixture. *Biol Reprod.* 2001, 65, pp. 554-560.

14. Devendra K. B., Mehajbeen B. Modulation of tricarboxylic acid cycle dehydrogenases during hepatocarcinogenesis induced by hexachlorocyclohexane in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 2009, 61, pp. 325-332.

15. Foster W., Chan S., Platt L., Hughes C. Detection of endocrine disrupting chemicals in samples of second trimester human amniotic fluid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2000, 85, pp. 2954-2955.

16. Ke F-C., Fang S-H., Lee M-T., Sheu S-Y., Lai S-Y., Chen Y. J., Huang F-L., Wang P. S., Stocco D. M., Hwang J-J. Lindane, a gap junction blocker, suppresses FSH and transforming growth factor β 1-induced connexin43 gap junction formation and steroidogenesis in rat granulosa cells. *J. Endocrinol.* 2005, 184, pp. 555-566.

17. Kuni O., Hashizume M., Chiba M., Sasaki S., Shimoda T., Caypil W., Dauletbaev D. Respiratory Symptoms and Pulmonary Function among School-Age Children in the Aral Sea Region. *Archives of Environmental Health.* November, 2003, 11, Vol. 58.

18. Jensen S., Mazhitova Z., Zetterstrom R. Environmental pollution and child health in the Aral Sea region in Kazakhstan. *Sci Total Environ.* 1997, 206, pp. 187-93.

19. Li R., Mather J. P. Lindane, an inhibitor of gap junction formation, abolishes oocyte directed follicle organizing activity in vitro. *Endocrinology.* 1997, 138, pp. 4477-4480.

20. Lindenau A., Fisher B., Seiler P., Beier H. M. Effects of persistent chlorinated hydrocarbons on reproductive tissues in female rabbits. *Hum.Reprod.* 1994, 9, pp. 772-80.

21. Maranghi F., Rescia M., Macri C., Di Consiglio E., De Angelis G., Testai E., et al. Lindane may modulate the female reproductive development through the interaction with ER-beta: an in vivo-in vitro approach. *Chem. Biol. Interact.* 2007, 169, pp. 1-14.

22. Milagrosa O. et al. Lindane toxicity on early life stages of gilthead seabream (*Sparus aurata*) with a note on its histopathological

manifestations. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2008, 25, pp. 94–102.

23. Rasier G. et al. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: A review of rodent and human data. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006, 254–255, pp. 187–201.

24. Rossi G., Buccione R., Baldassarre M., Macchiarelli G., Palmerini M. G., Cecconi S. Mancozeb exposure in vivo impairs mouse oocyte fertiliz- ability. *Reprod Toxicol*. 2005.

25. Padma V. V. et al. Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2011, 49, pp. 991–998.

26. Report on Carcinogens, Thirteenth Edition National Toxicology Program, Department of Health and Human Services For Table of Contents, see home page: <http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc13>.

27. Scascitelli M., Pacchierotti F. Effects of lindane on oocyte maturation and preimplantation embryonic development in the mouse. *Reproductive Toxicology*. 2003, 17, pp. 299–303.

28. Stephen A. S. Noise Effects on Health in the Context of Air Pollution Exposure. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2015, 12, pp. 12735–12760.

29. Tiemann U., Pohland R. Inhibitory effects of organochlorine pesticides on intercellular transfer of Lucifer Yellow in cultured bovine oviductal cells. *Reprod Toxicol*. 1999, 13, pp. 123–130.

30. Tiemann U., Pohland R., Kuchenmeister U., Viergutz T. Influence of organochlorine pesticides on transmembrane potential, oxidative activity, and ATP-induced calcium release in cultured bovine oviductal cells. *Reprod Toxicol*. 1998, 12, pp. 551–557.

31. Usman M. et al. Chemical oxidation of hexachlorocyclohexanes (HCHs) in contaminated soils. *Science of the Total Environment*. 2014, 476–477, pp. 434–439.

32. Zucchini N., de Sousa G., Bailly-Maitre B., Gugenheim J., Bars R., Lemaire G., Rahmani R. Regulation of Bcl-2 and Bcl-xL anti-apoptotic protein expression by nuclear receptor PXR in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Biochim. Biophys*. 2005, 1745, pp. 48–58.

Контактная информация:

Балмагамбетова Ару Дюсеновна – Кафедра нормальной и топографической анатомии, Центр микроскопии, Кафедра жизни, здоровья и наук об окружающей среде Западно-Казахстанского Государственного медицинского университета имени Марата Оспанова, г. Актобе, Республика Казахстан.

Почтовый адрес: 030019, Республика Казахстан, г. Актобе, ул. Маресьева 68,

E-mail: aru.b.84@mail

Телефон: 87012337481, 87132547683