

## ИЗУЧЕНИЕ ГОНАДО- И РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ КАРБЕНДАЗИМА ТЕХНИЧЕСКОГО НА САМЦАХ И САМКАХ КРЫС WISTAR HAN

**Я.В. Колянчук**

ГП «Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л. И. Медведя МЗ Украины», Киев, Украина

**РЕЗЮМЕ.** Цель исследования - идентифицировать опасность и оценить риск гонадо- и репродуктивной токсичности двух генерических пестицидов карбендазима технического различной чистоты на самцах и самках крыс Wistar Han.

**Материалы и методы исследования.** Карбендазим - 98 % (K1) и 98,1 % (K2) чистоты вводили ежедневно, кроме субботы и воскресенья, внутривенно в дозах 2,5 и 25 мг/кг массы тела трем группам животных по 20 самцов и самок в каждой в течение 10 недель (для самок) и 11 недель (для самцов). Контрольные животные получали эквивалентное количество растворителя. Параллельно с контрольными и подопытными животными содержались интактные животные, предназначенные для спаривания. После окончания экспозиции исследовались функциональные показатели состояния гонад и способность животных к воспроизведению потомства. У самок изучали состояние эстрального цикла, продолжительность и частоту каждой его стадии. Состояние репродуктивной функции у самок учитывали на 20 день беременности. Определяли индексы спаривания, зачатия, фертильности, беременности, учитывали длительность прекоитального интервала.

**Результаты и обсуждение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что при экспозиции двух генерических веществ карбендазима в дозе 25 мг/кг массы тела в течение 11 недель проявлялся общетоксический эффект (снижение массы тела) только у самцов при воздействии K2. Все тестовые субстанции при действии максимальной дозы обладают репродуктивной токсичностью и оказывают выраженное антиандрогенное действие, которое проявляется в изменениях морфофункциональных показателей состояния половых желез в подопытных группах самцов. Кроме того, отмечалось негативное влияние на эстральный цикл подопытных самок, подвергавшихся воздействию K2.

**Вывод.** На основании полученных результатов можно сделать вывод, что все изученные образцы карбендазима обладают репродуктивной токсичностью в дозе 25 мг/кг массы тела. Недействующей дозой (NOEL) для всех изученных соединений является доза 2,5 мг/кг массы тела. В диапазоне изученных доз наблюдается зависимость «доза-эффект».

**Ключевые слова:** гонадо- и репродуктивная токсичность, крысы Wistar Han, карбендазим.

Карбендазим является одним из широко используемых системных фунгицидов класса бензимидазола, предназначенных для защиты растений от различного рода грибковых заболеваний [1]. В последнее время проведено много исследований по изучению влияния карбендазима на нецелевые объекты. По данным литературы известно, что данный пестицид – это эндокринный дизраптор, вызывающий репродуктивную токсичность, что проявляется в изменениях уровней различных гормонов. Он отрицательно влияет на стероидогенез яичек, имеет антиандрогенный эффект [2-6].

Данное исследование было проведено для оценки гонадо- и репродуктивной токсичности двух технических образцов фунгицида карбендазима различных производителей и чистоты на самцах и самках крыс линии Wistar Han.

**Материалы и методы исследования.** Исследования на животных проведены согласно требованиям и положениям

«Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 18.03.1986) ETS №123, "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (National Academies Press, USA, 2011) [7, 8].

Изучалась гонадо- и репродуктивная токсичность двух образцов карбендазима разных производителей. Чистота исследуемых соединений карбендазима составляла 98 % (K1) и 98,1 % (K2). Эксперименты проведены на самцах и самках крыс Wistar Han, полученных из SPF питомника ГП "Научный токсикологический центр имени академика Л.И. Медведя МЗ Украины" в возрасте 5-6 недель и массой тела 80-100 г. Адаптационный период продолжался пять дней.

Животные были размещены в конвенционном виварии. Комната была обеспечена принудительной вентиляцией (12 объемов в час), которая исключала рециркуляцию воздуха. Температура и относительная влажность воздуха регистрировались еже-

дневно, коливання температури становили від 19 до 24 °С, вологості - від 30 до 70 %. Освітлення було природним. Животні отримували деіонізовану, обеззаражену УФ-облученням і очищену зворотним осмосом фільтровану питтєву воду і сбалансований гранульований корм з пониженим вмістом природних фітоестрогенів виробництва Альтромін (Німеччина) *ad libitum*.

Тестові субстанції вводили *ex tempore* щодня, крім суботи і воскресіння, внутрішньочеревно з допомогою зонда двом групам тварин по 20 самців і самок в кожній групі в дозах 2,5 і 25 мг/кг маси тіла впродовж 10 тижнів для самок і 11 тижнів для самців. Контрольна група самців (20 шт) отримувала дистильовану воду з емульгатором (ОП-10) в еквівалентних кількостях. Паралельно з контрольними і піддослідними тваринами вміщувалася інтактна група самців і самок, призначена для спарювання.

По закінченні періоду експозиції досліджували функціональні показники стану гонад і здатність тварин до розведення потомства. У самок вивчали стан естрального циклу, тривалість і частоту кожної його стадії. У самців оцінювали кількість рухомих спермій, їх загальну кількість, а також кількість патологічно змінених форм статевих клітин. Реєстрували морфометричні показники статків і придатків.

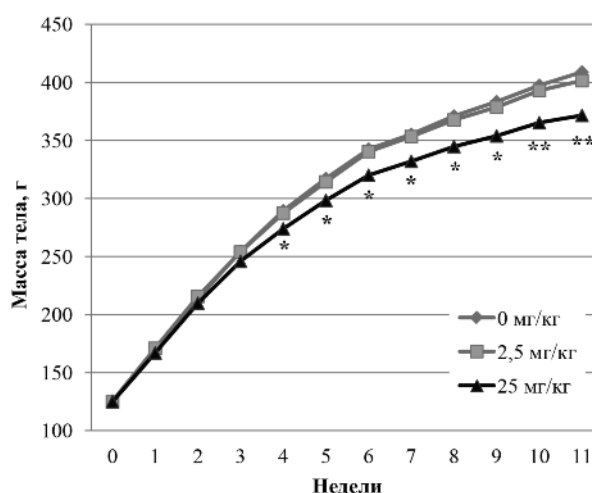
Стан репродуктивної функції враховували на 20 день вагітності піддослідних самок, завагітаючих від інтактних самців і інтактних самок, спарюваних з піддослідними самцями. При цьому реєстрували кількість жовтих тіл в яєчниках, кількість живих, мертвих і резорбованих плодів і зародків, масу тіла плодів, загальну масу помету, наявність грубих аномалій розвитку. Визначали індекси спарювання, зачаття, фертильності, вагітності, враховували тривалість прекоітального інтервалу. Всіх самців при відкритті піддавали макроскопічному дослідженню. Тварин вважали кожний тиждень впродовж всього періоду експозиції, а також вагітних самок на 0, 6, 13 і 20 днів *post coitum* [9, 10].

Статистична значущість міжгрупових відмінностей ( $P < 0,05$ ) оцінювали за критерієм *t* – тесту Стюдента. Дослідження проведені відповідно до рекомендацій і вимог Надлежачої лабораторної практики (GLP).

**Результати дослідження і їх обговорення.** Карбендазім технічний в досліджуваних дозах не викликав помітного впливу на загальний стан піддослідних самців і самок і не викликав смертності тварин. Однак спостерігали системний токсичний ефект тільки у самців щурів в період експозиції при впливі тестової субстанції К2 в дозі 25 мг/кг, що проявляється достовірним зниженням маси тіла піддослідних тварин (рис.1).

При вивченні морфофункціональних показників стану статевих залоз в піддослідних групах самців, отримуваних К1 і К2 в дозі 25 мг/кг, було помічено статистично значуще зниження загальної кількості сперматозоїдів, кількості і відсотка рухомих спермій по відношенню до контрольної групи, а також достовірне підвищення відсотка патологічних форм спермій.

При макроскопічному дослідженні статків і придатків не виявлено помітної патології цих органів, але в групі самців на максимальній дозі зафіксовано статистично достовірне зниження абсолютної і відносної маси статків при впливі



**Рис. 1.** Динаміка маси тіла самців щурів в період експозиції К2 (\*- $P \leq 0,01$ ; \*\*- $P \leq 0,001$ )

обеих тестовых образцов, а также снижение массы придатков наблюдалось и у К1. Статистически значимого изменения остальных исследуемых показателей в этой дозе не отмечалось (табл. 1, 2).

При изучении оплодотворяющей способности и фертильности самцов, получавших дозу 25 мг/кг (К2), которые оценивались по данным, полученным от интактных самок, наблюдалась тенденция к снижению индексов зачатия и фертильности на 15%.

В исследовании на самцах К1 и К2 в обеих дозах карбендазим не оказал отрицательного влияния на фертильность самцов, о которой судили по показателям состояния репродуктивной функции забеременевших от них интактных самок. Количество живых плодов в подопытных группах, число желтых тел в яичниках, число и процентное соотношение погибших до и после имплантации плодов, а также средняя масса плодов и общая масса

помета достоверно не отличались от уровня контроля.

Тестовые субстанции карбендазима при исследовании на самках не оказали отрицательного влияния на их общее состояние. Регистрация массы тела подопытных и контрольных самок в период затравки показала, что тестируемые тестовые субстанции не индуцируют достоверного снижения массы тела в период экспозиции и беременности.

Величины индексов спаривания, зачатия, фертильности и беременности в обеих группах животных, получавших минимальную и максимальную дозу К1 и К2, статистически значимо не изменялись по сравнению с контролем, но наблюдалась тенденция к снижению индекса беременности в максимальной испытываемой дозе К2 (у двух самок отсутствует наличие живых плодов).

В течение двухнедельного периода наблюдения за эстральным циклом у самок,

Таблица 1

**Морфофункциональное состояние половых желез самцов крыс  
после периода экспозиции карбендазимом (К1)**

Показатели	Стат. показатели	Доза тестовой субстанции, мг/кг		
		0	2,5	25
Общее количество сперматозоидов, млн./мл	$M \pm m$	140,50±3,61	139,50±6,2	54,80±8,54***
Количество подвижных спермиев, млн./мл	$M \pm m$	63,80±2,12	60,10±2,79	19,10±3,55***
% подвижных сперматозоидов	$M \pm m$	45,41±0,92	43,11±0,7	32,49±2,81**
% патологических форм	$M \pm m$	0,30±0,12	0,65±0,20	4,28±1,23*
Масса семенников, г	$M \pm m$	3,62±0,07	3,57±0,10	2,68±0,16***
Масса придатков, г	$M \pm m$	1,12±0,02	1,15±0,03	0,97±0,04*
Коэффициент относительной массы семенников	$M \pm m$	10,27±0,31	10,08±0,22	7,55±0,48**
Коэффициент относительной массы придатков	$M \pm m$	3,19±0,09	3,24±0,05	2,74±0,11*

Примечание: \* -  $P \leq 0,01$ ; \*\* -  $P \leq 0,001$ ; \*\*\* -  $P \leq 0,0001$  относительно группы контроля

**Морфофункціональне состояние половых желез самцов крыс  
после периода экспозиции карбендазимом (К2)**

Показатели	Стат. показатели	Доза тестовой субстанции, мг/кг		
		0	2,5	25
Общее количество сперматозоидов, млн./мл	$M \pm m$	114,80±3,65	122,60±4,71	66,20±4,63**
Количество подвижных спермиев, млн./мл	$M \pm m$	46,90±2,63	48,90±2,38	17,90±2,26**
% подвижных сперматозоидов	$M \pm m$	40,65±1,33	39,98±1,39	26,40±1,72**
% патологических форм	$M \pm m$	0,46±0,15	0,32±0,13	8,28±2,69*
Масса семенников, г	$M \pm m$	3,67±0,06	3,67±0,09	3,07±0,07**
Масса придатков, г	$M \pm m$	1,24±0,02	1,18±0,03	1,10±0,09
Коэффициент относительной массы семенников	$M \pm m$	9,24±0,12	9,32±0,20	7,89±0,18**
Коэффициент относительной массы придатков	$M \pm m$	3,13±0,05	2,99±0,09	2,81±0,21

Примечание: \* -  $P \leq 0,01$ ; \*\* -  $P \leq 0,0001$  относительно группы контроля

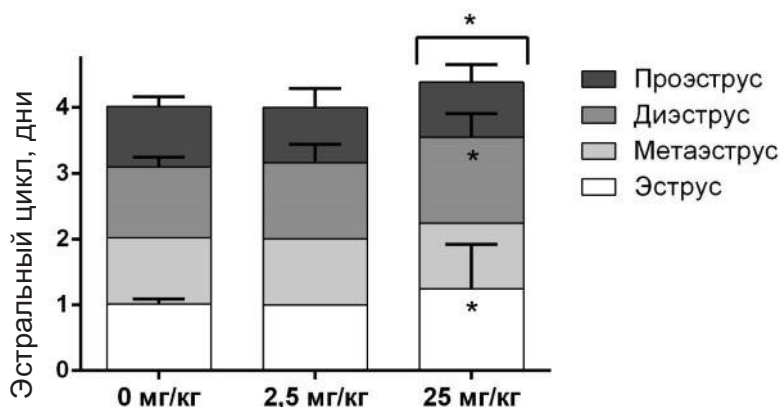
получавших только К2 в дозе 25 мг/кг, было отмечено статистически значимое увеличение продолжительности цикла и отдельных его стадий эструс и диэструс по отношению к контрольной группе (рис. 2).

**Выводы.**

1. При внутрижелудочном введении К2 в дозе 25 мг/кг массы тела в течение 11

недель проявлялся общетоксический эффект, а именно снижение массы тела у самцов на протяжении периода экспозиции.

2. Все тестовые субстанции при действии максимальной дозы обладают репродуктивной токсичностью, что выражается в возможных изменениях морфофункциональных показателей состояния



**Рис. 2.** Эстральный цикл и продолжительность отдельных его стадий у самок, подвергавшихся воздействию К2 (\*- $P \leq 0,05$ )

половых желез при анализе спермы у подопытных самцов, таких как: снижение общего количества сперматозоидов, количества и процента подвижных сперматозоидов, а также увеличение процента патологических форм спермиев. При воздействии K1 и K2 также проявляется выраженная антиандрогенная активность этих действующих субстанций: снижение абсолютной и относительной массы семенников, а также снижение массы придатков при действии только K1.

3. В течение двухнедельного периода наблюдения за эстральным циклом у самок, получавших K2 в дозе 25 мг/кг, было отмечено статистически значимое увеличение продолжительности цикла и отдельных его стадий (эструс и диэструс).

4. Нарушение эстрального цикла у самок и антиандрогенная активность у самцов — весьма чувствительный показатель дисбаланса половых гормонов, что идентифицировано в данном эксперименте. Данный факт подтверждает наличие у карбендазима свойств эндокринного дизраптора.

5. В диапазоне изученных доз наблюдается зависимость «доза-эффект». Установлено, что дозовый уровень для всех исследуемых соединений карбендазима, который не оказывает повреждающего действия на гонады и репродуктивную функцию самцов и самок крыс Wistar Han (NOEL), является доза 2,5 мг/кг массы тела.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Xu X. Carbendazim residues in vegetables in China between 2014 and 2016 and a chronic carbendazim exposure risk assessment / X. Xu, J. Chen, B. Li, L. Tang // Food Control. – 2018. – № 91. – P. 20–25.
2. Endocrine-disrupting activity in carbendazim-induced reproductive and developmental toxicity in rats / S.Y. Lu, J. W. Liao, M. L. Kuo [et al.] // Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. – 2004. – № 67 (19). – P. 1501–1515.
3. Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture / C. Pisani, S. Voisin, K. Arafah [et al.] // ALTEX-Alternatives to animal experimentation. – 2016. – № 33 (4). – P. 393–413.
4. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim / E.M. Rama, S. Bortolan, M. L. Vieira [et al.] // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2014. – № 69 (3). – P. 476–486.
5. Lu S.Y. Androgen Receptor Plays a Vital Role in Benomyl- or Carbendazim-Induced Reproductive and Developmental Toxicity and Endocrine-Disrupting Activity in Rats / S.Y. Lu // Endocrine Disruptors. – IntechOpen, 2018.
6. Шепельская Н.Р. Репродуктивная токсичность фунгицида карбендазима в эксперименте на самцах и самках крыс Wistar / Н.Р. Шепельская, Л.П. Иванова, С.Д. Сапожникова, Л.И. Григоренко // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – № 10 (2). – С. 328–329
7. Guide for the care and use of laboratory animals. – LAR Publication, National Academy Press, USA, 1996. – 140 p.
8. OECD Principles of Good Laboratory Practice. ENV/MC/CHEM(98)17. – Environment Directorate Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 1998. – 41 p.
9. Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов. Киев; 1969. – 160 с.
10. Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов. Киев; 1988. – 211 с.

#### ВИВЧЕННЯ ГОНАДО- І РЕПРОДУКТИВНОЇ ТОКСИЧНОСТІ КАРБЕНДАЗИМУ ТЕХНІЧНОГО НА САМЦІХ І САМИЦІХ ЩУРІВ WISTAR HAN

Я.В. Колянчук

ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л. І. Медведя МОЗ України», Київ, Україна

**РЕЗЮМЕ.** Мета дослідження. Ідентифікувати небезпеку і оцінити ризик репродуктивної токсичності двох генеричних пестицидів карбендазиму різної чистоти на самців та самиць щурів Wistar Han.

**Матеріали та методи дослідження.** Карбендазим - 98% (K1) та 98,1% (K2) чистоти вводили щодня, крім суботи та неділі, внутрішньошлунково в дозах 2,5 і 25 мг/кг маси тіла трьом групам тварин по 20 самців і самиць у кожній протягом 10 тижнів (для самиць) та 11 тижнів (для самців). Контрольні тварини отримували еквівалентну кількість розчинника. Паралельно з контрольними і піддослідними тваринами містилися інтактні тварини, призначені для спарювання. Після закінчення періоду експозиції досліджувалися функціональні показники стану гонад і здатність тварин до відтворення потомства. У самиць вивчали стан естрального циклу, тривалість і частоту кожної його стадії. Стан репродуктивної функції у самиць враховували на 20 день вагітності. Визначали індекси спарювання, зачаття, фертильності та вагітності, враховували тривалість прекоїтального інтервалу.

**Результати та обговорення.** Отримані дані свідчать, що при експозиції двох генеричних речовин карбендазиму в дозі 25 мг/кг маси тіла протягом 11 тижнів проявлявся загальнотоксичний ефект (зниження маси тіла) у самців за впливу тільки K2. Всі тестові субстанції за дії максимальної дози володіють репродуктивною токсичністю і мають виражену

антиандрогенну дію, що викликає зміну морфофункціональних показників стану статевих залоз у піддослідних групах самців. Крім того, відзначався негативний вплив на естральний цикл у піддослідних самиць, котрі піддавались впливові К2.

**Висновок.** На підставі одержаних результатів можна зробити висновок, що всі вивчені сполуки карбендазіму володіють репродуктивною токсичністю в дозі 25 мг/кг маси тіла. Недіючою дозою (NOEL) для всіх вивчених сполук є доза 2,5 мг/кг маси тіла. В діапазоні вивчених доз спостерігається залежність «доза-ефект».

**Ключові слова:** гонадо-репродуктивна токсичність, щури Wistar Han, карбендазім.

**STUDY OF GONADO- AND REPRODUCTIVE TOXICITY OF TECHNICAL-GRADE CARBENDAZIM  
IN MALE AND FEMALE WISTAR HAN RATS**

Ya. Kolianchuk

State Enterprise "L. I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology,  
Food and Chemical Safety of the Ministry of Health of Ukraine", Kyiv, Ukraine

**ABSTRACT. Objective.** Identification of hazard and assessment of the risk of gonado- and reproductive toxicity of two generic pesticides of technical-grade carbendazim of different purity bin male and female Wistar Han rats.

**Materials and Methods.** Carbendazim with the purity of 98 % (C1) and 98.1 % (C2) was intragastrically administered on the daily basis, excluding Saturday and Sunday, at the doses of 2.5 and 25 mg/kg body weight in three groups of animals (20 males and female rats in each) during 10 weeks (for females) and 11 weeks (for males). Control animals received an equivalent amount of the solvent. Intact animals intended for breeding were managed in parallel with the control and experimental animals. After the end of the exposure, functional parameters of the condition of gonads and reproductive ability of the animals were investigated. Females were used to investigate the condition of the oestral cycle, duration and frequency of each stage of it. The condition of the reproductive function in the female rats was considered at Day 20 of pregnancy. Indices of breeding, conception, fertility, pregnancy were established, and the duration of the pre-coital period was considered.

**Results and Discussion.** The data obtained suggest that exposure to two generic substances of carbendazim at the dose of 25 mg/kg body weight during 11 weeks is manifested in general toxic effect (body weight reduction) only in males upon exposure to C2. All test substances in the maximum dose have reproductive toxicity and show significant anti-androgenic action that is manifested as changes in the morphological and functional parameters of the condition of gonads in the experimental groups of male rats. Furthermore, the negative effect on the oestral cycle in experimental female rats exposed to C2 was noted.

**Conclusion.** Based on the obtained results it can be concluded that all test samples of carbendazim have reproductive toxicity at the dose of 25 mg/kg body weight. No-observed-effect level (NOEL) for all test compounds is 2.5 mg/kg body weight. Dose-effect dependence was observed in the range of studies doses.

**Key Words:** gonado- and reproductive toxicity, Wistar Han rats, carbendazim.

Надійшла до редакції 10.12.2018 р.