

DOI 10.31718/2077-1096.20.1.55

УДК 615.356-071

Тарасенко Я.А., Тихонова О.О., Дейнега Т.Ф., Волкова О.А.

ПОРІВНЯННЯ ПРОФІЛАКТИЧНОЇ ДІЇ АНТИОКСИДАНТІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО ВПЛИВУ АМІННОЇ СОЛІ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Стаття присвячена вивченню ефективності застосування засобів з антиоксидантними властивостями для фармакопрофілактики наслідків токсичного впливу пестицидів. Одним з найбільш розповсюджених у сільському господарстві сполук є похідні 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти, а саме амінна сіль 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти. В якості універсального механізму пошкодження біологічних мембран при хронічній інтоксикації похідними феноксикислот розглядається активація вільнорадикальних процесів, тому метою даної роботи є порівняння профілактичної дії синтетичних та природних антиоксидантів за умов тривалого впливу амінної солі 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти. Експеримент проведено на щурах-самцях лінії Вістар, яким на тлі введення токсиканту вводили синтетичні та природні антиоксиданти. Тривалий вплив пестициду викликало активацію процесів вільнорадикального перекисного окислення ліпідів, зниження антиоксидантної забезпеченості та активності антиоксидантних ферментів. Введення препаратів з антиоксидантними властивостями сприяло зниженню рівня продуктів вільнорадикальних процесів, гальмуванню падіння антиоксидантної забезпеченості організму та нормалізації активності антиоксидантних ферментів. Але за експериментальними даними найбільш вираженими коригувальними властивостями володіє комплекс природних антиоксидантів (токоферолу ацетат, аскорбінова кислота та кверцетин); це дає можливість рекомендувати їх застосування з метою фармакологічної корекції патологічних змін при тривалому впливі пестицидів.

Ключові слова: пестициди, амінна сіль 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти, антиоксиданти, вільнорадикальне перекисне окислення ліпідів

Стаття є фрагментом планової наукової-дослідницької роботи „Дослідження специфічної фармакологічної активності біологічно-активних речовин рослинного походження”; № держреєстрації 0101V001130.

Останнім часом все гостріше постає проблема забруднення навколишнього середовища речовинами антропогенного походження, в тому числі засобами хімічного захисту сільськогосподарських культур: щорічно на 40 млн. га сільськогосподарських угідь України вноситься 36 тис. тон пестицидів [1,10]. Одним з найбільш розповсюджених у сільському господарстві сполук є похідні 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти, а саме амінна сіль 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-ДА). Дослідження останнього часу висвітлюють провідну роль інтенсифікації процесів вільнорадикального перекисного окиснення (ВРПО) ліпідів у механізмах розвитку морфофункціональних змін на тлі тривалого впливу пестицидів [7,9]. У фізіологічних умовах окисно-відновні процеси, які забезпечують енергетичні потреби клітин і утилізацію кисню в тканинах, контролюються регуляторними системами, що підтримують збалансовану взаємодію реакцій утворення продуктів окисації і антиокислювальних факторів. Порушення цієї взаємодії, яке супроводжується активацією вільнорадикальних процесів і накопиченням продуктів перекисного окислення ліпідів, розглядається в якості універсального механізму пошкодження біологічних мембран, що лежить в основі хронічної інтоксикації похідними феноксикислот [6]. Це свідчить за зниження захисту клітин і тканин від ушкоджуючої дії вільних радикалів з боку ендогенної антиоксидантної системи [5,7]. Все вищевикладене зумовлює актуальність застосування пре-

паратів з антиоксидантними властивостями для фармакопрофілактики наслідків токсичного впливу похідних феноксиоцтової кислоти.

Метою даної роботи є порівняння профілактичної дії синтетичних та природних антиоксидантів за умов тривалого впливу амінної солі 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти.

Матеріали та методи

Експеримент проведено на 5 групах щурів-самців лінії Вістар вагою 170-200г. 20 щурів склали інтактну групу, яка протягом експерименту утримувалася в умовах віварію по 5 тварин в клітках (1 група). Тваринам 2 групи (10 самців) протягом 30 днів вводили внутрішньошлунково 2,4-ДА в дозі 120мг/кг. Інші експериментальні групи тварин включали по 10 щурів-самців, яким на тлі введення пестициду (2,4-ДА в дозі 120мг/кг) вводили препарати з антиоксидантною дією, а саме: щури 3-ї групи додатково отримувала синтетичний антиоксидант (АО) тіотриазолін у дозі 100 мг/кг, 4-ї - мексидол в дозі 50 мг/кг внутрішньошлунково; тваринам 5 групи додатково вводили комбінацію АО, яка включала: α -токоферолу-ацетат (0,01 г/кг), кверцетин (0,02 г/кг), аскорбінову кислоту (0,02 г/кг).

Евтаназію щурів здійснювали під гексеналовим наркозом (50мг/кг маси тіла) шляхом забору крові з серця до його зупинки. Проводилася оцінка загальносоматичних показників - ваги, стану шерсті, рухливості та дослідження біохімічних показників. В тканинах печінки досліджували рі-

вень продуктів, що реагують із 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реактанти) [3]. Принцип оснований на здібності малонового діальдегіду реагувати зі ТБК з утворенням триметинового комплексу, який має рожеву окраску, інтенсивність окраски пропорціональна концентрації ТБК-реактантів. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за здатністю адреналіну самоокислюватись в лужному середовищі с генерацією супероксиданіонрадикалу; у присутності СОД швидкість реакції знижується. [2]. Активність каталази тканин досліджували по здібностям перекиси водню утворювати с солями молібдену стійкий пофарбований комплекс [4]. В тканинах печінки визначали рівень аскорбінової кислоти. Принцип методу [8] базується на екстракції дигідроаскорбінової кислоти (ДАК) та аскорбінової кислоти (АК) за допомогою трихлороцтової кислоти, окисленні АК до ДАК за участю 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію, визначення суми (АК+ДАК) и ДАК. Рівень АК визначають за різницею (АК+ДАК)-ДАК. ДАК при реакції с динітрофенілгідразином утворює пофарбований продукт. У тканинах печінки та сім'яників визначали рівень відновленого глутатіону за методикою Elmana G.L.[11]. Відновлений глутатіон взаємодіє з 5,5'-дитіо-біс-(2-нітробензоїною) кислотою, утворюючи кінцевий продукт і тіонітрофенольний аніон, який має коефіцієнт молярної екстинкції при 412 нм 11400 1/Мол.см, а кількість його молей відповідає числу молей сульфгідрильних груп, які прореагували. Розрахунок проводили за стандартним графіком. Активність ГР визначали за методикою Pinto R.E. [12] у реак-

ційної суміші, яка містить фосфатний буфер (рН 8,0), 1мМ ЕДТА, 7,5 мМ окислений глутатіон, 1,2 мМ НАДФ·Н. Рівень активності визначали за зменшенням НАДФ·Н при 37⁰С протягом 10 хвилин при довжині хвилі 340 нм.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Ст'юдента.

Результати та обговорення

Хронічне надходження прооксидантів експериментальним тваринам обумовило зміни загальносоматичних та біохімічних показників тканин. У тварин 2 групи вага не зазнала достовірних змін (з 180,0 до 189,0, $p < 0,1$), в них знизився апетит, спостерігалась агресивність, кволість, тьмяна, волога шерсть. Аналіз біохімічних показників свідчить, що у тварин цих груп достовірно зріс рівень проміжних продуктів ВРПО ліпідів: рівень ТБК-реактантів у тканинах печінки склав $183,2 \pm 15,1$ нмоль/г ($p_{1-3} < 0,001$), у тканинах сім'яників - $29,21 \pm 2,74$ нмоль/г, $p_{1-3} < 0,002$, порівняно з показниками інтактних тварин. При дослідженні активності АФ у тканинах тварин 2 групи також виявлено достовірне зниження активності СОД у порівнянні з показниками інтактних тварин: у печінці в 1,2 рази ($p_{1-3} < 0,01$), у сім'яниках в 1,4 рази, ($p_{1-3} < 0,001$). Активність каталази зазнала аналогічних змін у порівнянні з інтактними: у печінці знизилась в 1,5 рази, ($p_{1-3} < 0,05$); у сім'яниках – у 1,6 разів, ($p_{1-3} < 0,001$). При дослідженні антиоксидантної забезпеченості тканин печінки – вмісту АК, виявлене достовірне його зниження до $186,0 \pm 5,7$ мг/кг у порівнянні з показниками інтактних тварин ($p_{1-3} < 0,001$) (табл. 1).

Таблиця 1

Біохімічні показники в тканинах щурів, які отримували 2,4-ДА протягом 30 діб

Біохімічні показники	Інтактні (1 група)	Введення 2,4-ДА 30 діб (2 група)
СОД, % Г печінка	71,2±3,5	57,5±2,6 $p_{1-2} < 0,01$
сім'яники	74,7±3,1	52,23±2,78 $p_{1-2} < 0,001$
Каталаза, ммоль/хв·г печінка	2,01±0,32	1,37±0,1 $p_{1-2} < 0,05$
сім'яники	0,433±0,03	0,272±0,015 $p_{1-2} < 0,001$
АК, мг/кг печінка	262,0±7,6	186,0±5,7 $p_{1-2} < 0,001$
ГР, мкмоль/хв·г печінка	39,35±2,2	33,81±2,7 $p_{1-2} < 0,02$

Примітка: p_{1-2} – достовірність між інтактною групою та серією тварин, які отримували пестицид протягом 30 діб.

Рівень відновленого глутатіону у тканинах печінки складає $4,2 \pm 0,28$ мкмоль/г, що свідчить за достовірне його зниження у порівнянні з показниками інтактних тварин, у яких він складає $5,45 \pm 0,3$ мкмоль/л ($p_{1-3} < 0,01$). Тривалий вплив токсиканта також призводить до «виснаження» захисної глутатіонзалежної системи – активність ГР у печінки достовірно знижується порівняно з показниками інтактних тварин та тварин 2-ї групи. Враховуючі, що функція ГР в метаболізмі

глутатіону пов'язана з утворенням відновленого глутатіону з його окисленої форми, пригнічення її активності призводить до зниження рівня відновленого глутатіону та посилення явищ інтоксикації.

Тваринам опитних груп вводили синтетичні та природні антиоксиданти, які оказували неоднаковий вплив на показники у залежності від типу тканин.

Введення препаратів з антиоксидантними

властивостями позитивно впливало на загально-соматичні показники тварин: щури добре переносять препарат, у них підвищився апетит, зросла маса тіла, не спостерігалось агресивності.

Застосування препаратів сприяло зниженню

рівня продуктів ВРПО ліпідів (ТБК-реактивів), гальмуванню падіння антиоксидантної забезпеченості організму та нормалізації активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, глутатіонзалежних ферментів) (табл. 2).

Таблиця 2
Вплив антиоксидантів на біохімічні показники в тканинах щурів на тлі введення 2,4-ДА

Біохімічні показники	Введення 2,4-ДА +тіотриазолін (3 група)	Введення 2,4-ДА +мексидол (4 група)	Введення 2,4-ДА +комбінація АО (5 група)
ТБК-реактанти, нмоль/г печінка	106,8±9,5 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,002	97,5±4,5 P ₁₋₄ <0,05 P ₂₋₄ <0,05	99,3±4,1 P ₁₋₅ <0,002 P ₂₋₅ <0,02
ТБК-реактанти, нмоль/г сім'яники	21,06±2,1 P ₁₋₃ <0,01 P ₂₋₃ <0,05	19,15±2,8 P ₁₋₄ <0,5 P ₂₋₄ <0,05	16,08±0,8 P ₁₋₅ <0,05 P ₂₋₅ <0,001
СОД, % Г печінка	68,5±2,1 P ₁₋₃ <0,25 P ₂₋₃ <0,01	64,7±2,4 P ₁₋₄ <0,25 P ₂₋₄ <0,05	66,4±4,3 P ₁₋₅ <0,5 P ₂₋₅ <0,05
СОД, % Г сім'яники	65,0±2,71 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,01	69,07±3,13 P ₁₋₄ <0,25 P ₂₋₄ <0,002	78,02±2,21 P ₁₋₅ <0,5 P ₂₋₅ <0,001
Каталаза, ммоль/хв г печінка	1,8±0,04 P ₁₋₃ <0,25 P ₂₋₃ <0,001	2,19±0,2 P ₁₋₄ <0,5 P ₂₋₄ <0,002	2,23±0,15 P ₁₋₅ <0,5 P ₂₋₅ <0,002
Каталаза, ммоль/хв г сім'яники	0,34±0,03 P ₁₋₃ <0,02 P ₂₋₃ <0,05	0,299±0,04 P ₁₋₄ <0,01 P ₂₋₄ <0,25	0,375±0,042 P ₁₋₅ <0,5 P ₂₋₅ <0,05
АК, мг/кг печінка	233,09±4,6 P ₁₋₃ <0,1 P ₂₋₃ <0,05	230,8±2,8 P ₁₋₄ <0,01 P ₂₋₄ <0,001	235,1±2,3 P ₁₋₅ <0,01 P ₂₋₅ <0,001
Глутатіон, кмоль/г печінка	4,9±0,31 P ₁₋₃ <0,1 P ₂₋₃ <0,01	5,15±0,4 P ₁₋₄ <0,1 P ₂₋₄ <0,05	5,9±0,4 P ₁₋₅ <0,5 P ₂₋₅ <0,002
ГР, мкмоль/хв*г печінка	36,8±2,5 P ₁₋₅ <0,5 P ₃₋₅ <0,5	37,7±2,4 P ₁₋₇ <0,5 P ₃₋₇ <0,05	41,2±2,8 P ₁₋₁₂ <0,5 P ₃₋₁₂ <0,05

При аналізі результатів необхідне відмітити, що досліджувані препарати відрізняються за ступенем лікувально-профілактичного ефекту. У цілому, аналіз експериментальних даних свідчить про достатньо виражену ефективність застосування синтетичних препаратів АО тіотриазоліну та мексидолу в умовах хронічної інтоксикації пестицидом 2,4-ДА терміном 30 діб. Їх захисна дія в умовах введення токсиканта 2,4-ДА обумовлена здібністю відновлювати ферментативну ланку САЗ – СОД, каталази, глутатіонзалежних ферментів; підвищився вміст АК та активність відновленого глутатіону у досліджуваних тканинах [7].

Найбільш вираженими лікувально-профілактичними властивостями володіє комплекс природних АО – токоферолу ацетат, аскорбінова кислота та кверцетин: спостерігається високий рівень АК та відновленого глутатіону у тканинах печінки, каталази та СОД, а рівень ТБК-реактивів істотно знизився. Враховуючі їх природне походження, у них у меншій мірі ре-

єструються побічні ефекти та знижене навантаження на системи біотрансформації, особливо за умов тривалої інтоксикації; крім цього, більш доцільно комбіноване застосування ліпідорозчинних і гідрофільних препаратів, тому що процеси ВРПО ліпідів при інтоксикаціях можуть розвинути як у ліпідній, так і у водній фазі структури.

Отримані результати підтверджують дані щодо антиоксидантних властивостей досліджуваних препаратів і дають можливість рекомендувати їх застосування з метою фармакологічної корекції змін показників ВРПО ліпідів та активності АФ при тривалому впливі пестицидів.

Література

1. Anuchina AV. Toksicheskoe dejstvie pesticidov na organizm cheloveka i zhivotnyh [The toxic effect of pesticides on the humans and animals]. [Internet]. Mezhdunarodnyj studencheskij nauchnyj vestnik. 2019;1.
2. Available from: <http://eduherald.ru/ru/article/view?id=19454>. (Russian)
3. Brusov OS. Vliyanie prirodnyh inhibitorov radikalnih reakcij na avtookislenie adrenalina [The effect of natural inhibitors of the radical reactions to the auto-oxidation of adrenaline]. Byulleten ekspert. biol. i med. 1976; 81(1): 33-5. (Russian)

4. 3. Gavrilov VB. Analiz metodov opredeleniya produktov perekisnogo okisleniya lipidov v syvorotke krovi po testu s tiobarbiturovoj kislotoj [Analysis of the methods for determining of the lipid peroxidation products in blood serum by the test with thiobarbituric acid]. *Voprosy medicinskoj himii*. 1987; 1 : 118-22. (Russian)
5. Korolyuk MA, Ivanova LI, Majorova IG, Tokarev VE. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy [Method for determination of catalase activity]. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-9. (Russian)
6. Menshikova EB, Lankin VZ, Zenkov NK, Bondar IA, Krugovyh NF, Trufakin VA. Okislitelnyj stress. Prooksidanty i antioksidanty [Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants]. M.: Slovo; 2006. 556 s.
7. Redka OG. Mehanizm diji hlorfenoksigerbicidu 2,4 D na morfofunkcionalnij stan organizmu lyudini ta tvarin (oglyad literaturi) [Mechanism of the chlorofenoxide herbicide 2.4 D to the morphofunctional condition of the human organism and of the animals]. *Pytannya bioindikaciyi ta ekologiyi*. 2010; 2:187–94
8. Tarasenko YaA, Bobirov VM. Mehanizmi ushkodzhennya tkanini sim'yanikov pri trivalomu vplyvi pohidnih fenoksiocetovoyi kisloti [Mechanisms of the damage to the tissue of the testes during prolonged effect by phenoxyacetic acid derivatives]. *Odeskij medichnij zhurnal*. 2012; 3 (131): 21-25. (Ukrainian)
9. Trahtenberg IM, Sova ER, Sheftel FA, Onikienko FA. Problemy normy v toksikologii [Norm problems in toxicology]. M.: Medicina; 1991. 208 s. (Russian)
10. Chesnokova NP, Ponukalina EV, Bizenkova MN. Istochniki obrazovaniya svobodnyh radikalov i ih znachenie v biologicheskikh sistemah v usloviyah normy [Sources of the formation of free radicals and their significance in biological systems under normal environment]. *Sovremennyye naukoemkie tehnologii*. 2006; 6: 28-34. (Russian)
11. Devyatkina NM. Effect of Brassica oleracea extract on the erythron state during chronic yttrium salt intake. *Wiadomosci lekarskie*. 2018; LXXI(7): 1259–62.
12. Elman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem*. 1959; 82: 70-7.
13. Pinto RE. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem. J*. 1969; 121: 109-15.

Реферат

СРАВНЕНИЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИОКСИДАНТОВ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АМИННОЙ СОЛИ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Тарасенко Я.А., Тихонова О.А., Дейнега Т.Ф., Волкова О.А.

Ключевые слова: пестициды, аминная соль 2,4-дихлорфеноксиоцетовой кислоты, антиоксиданты, свободнорадикальное перекисное окисление липидов.

Статья посвящена изучению эффективности применения средств с антиоксидантными свойствами для фармакопрофилактики последствий токсического воздействия пестицидов. Одними из самых распространенных в сельском хозяйстве соединений являются производные 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, а именно аминная соль 2,4-дихлорфеноксиоцетовой кислоты. В качестве универсального механизма повреждения биологических мембран при хронической интоксикации производными феноксикилот рассматривается активация свободнорадикальных процессов, поэтому целью данной работы является сравнение профилактического действия синтетических и природных антиоксидантов в условиях длительного воздействия аминной соли 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Эксперимент проведен на крысах-самцах линии Вистар, которым на фоне введения токсиканта вводили синтетические и природные антиоксиданты. Длительное воздействие пестицида вызвало активацию процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов, снижение антиоксидантной обеспеченности и активности антиоксидантных ферментов. Введение препаратов с антиоксидантными свойствами способствовало снижению уровня продуктов свободнорадикальных процессов, торможению падения антиоксидантной обеспеченности организма и нормализации активности антиоксидантных ферментов. Наиболее выраженными корректирующими свойствами обладает комплекс природных антиоксидантов (токоферола ацетат, аскорбиновая кислота и кверцетин), что дает возможность рекомендовать их применение с целью фармакологической коррекции патологических изменений при длительном воздействии пестицидов.

Summary

COMPARISON OF PREVENTIVE ACTION OF ANTIOXIDANTS UNDER PROLONGED EXPOSURE TO AMINE SALT OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID

Tarasenko Y.A., Tykhonova O.O., Deynega T.F., Volkova O.A.

Key words: pesticides, amine salt of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, antioxidants, free radical lipid peroxidation.

The article describes the study on the effectiveness of remedies possessing antioxidant properties for chemoprevention of the consequences caused by pesticides toxic effects. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid derivatives, and namely, amine salt of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid are known as one of the most widely distributed compounds in agriculture. The activation of the free radical processes is considered as a universal mechanism of the damage to biological membranes during chronic intoxication by phenoxyacid derivatives. This work is aimed to compare the preventive effect of the synthetic and natural antioxidants under long-term exposure to the 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid. The experiment was performed on Wistar male rats, which received synthetic and natural antioxidants against the background of toxicant administration. Long-term effects of the pesticide caused the activation of the processes of free radical lipid peroxidation, reduced antioxidant supply and activity of antioxidant enzymes. The introduction of medicines with antioxidant properties helped to reduce the content of products of free radical processes, to inhibit the drop of body antioxidant supply and to normalize the activity of antioxidant enzymes.

According to the experimental data obtained, the complex of natural antioxidants (tocopherol acetate, ascorbic acid and quercetin) has the most pronounced corrective properties. This enables us to recommend them for chemocorrection of pathological changes resulted from prolonged exposure to pesticides.