

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ТА МОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 615.916'13 – 092.9 : 577.127

### ПОКАЗНИКИ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ЩУРІВ ПРИ ХРОНІЧНОМУ НАДХОДЖЕННІ ПЕСТИЦИДУ - АМІННОЇ СОЛІ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

**Бобирьов В.М., Цветкова Я.А.**

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

*В експерименті на білих щурах вводили пестицид 2,4-ДА в дозі 1/10 от LD<sub>50</sub>. Термін експерименту 15 и 30 діб. Під впливом хронічного надходження пестициду 2,4-ДА спостерігається активізація процесів ВРПО ліпідів в крові та тканинах печінки, мозку та сім'яників, зниження антиоксидантного забезпечення та фазне пригнічення активності антиоксидантних ферментів. Отриманні результати є підставою для дослідження препаратів з антиоксидантною активністю при хронічній інтоксикації 2,4-ДА.*

Ключові слова: пестициди, антиоксиданти, вільнорадикальне перекисне окислення ліпідів

Протягом останнього часу все більше уваги приділяється вивченню впливу негативних факторів довкілля на організм людини. Значне місце серед екологічних забруднювачів належить засобам хімічного захисту сільськогосподарських культур: щорічна кількість пестицидів, які використовують в Україні, становить близько 270 найменувань [10; 14].

Одним з найпоширеніших пестицидів, що застосовується в сільському господарстві, є похідні 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти, а саме амінна сіль 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-ДА). Більшість пестицидів цієї групи належать до малотоксичних засобів зі середньо вираженими кумулятивними властивостями - при щоденному введенні 1/10 LD<sub>50</sub> коефіцієнт кумуляції дорівнює 1-2 [11; 13; 16]. Але при довготривалому контакті з пестицидами, особливо при порушенні техніки безпеки та недотриманні заходів індивідуального захисту можуть виникати морфофункціональні зміни різних органів та систем [1; 6], що, на думку деяких авторів, зумовлено активацією вільнорадикального перекисного окислення (ВРПО) ліпідів.

Метою запропонованої роботи є дослідження біохімічних показників ВРПО ліпідів та активності антиоксидантних ферментів при хронічному надходженні пестициду 2,4-ДА у щурів.

#### Матеріали та методи дослідження

Експеримент проведений на 3 групах щурів-самців

лінії Вістар вагою 170-195г. 10 щурів склали інтактну групу, яка протягом експерименту утримувалася в умовах віварію по 5 тварин в клітках (1 група). Раціон включав всі необхідні компоненти. 2 група включала 7 щурів-самців, яким протягом 15 діб вводили внутрішньошлунково пестицид 2,4-ДА аміну сіль в дозі 1/10 LD<sub>50</sub>. Щурам-самцям 3 групи (14 тварин) вводили токсикант внутрішньошлунково протягом 30 діб у тій же дозі. Евтаназію щурів здійснювали під гексеналовим наркозом (50мг/кг маси тіла, внутрішньочеревинно) шляхом забору крові з серця до його зупинки.

Проведена оцінка загальносоматичних показників - ваги, стану шерсті, рухливості та дослідження біохімічних показників. У крові визначали рівень спонтанного гемолізу еритроцитів (СГЕ), для чого досліджували фізико-хімічні властивості еритроцитів при інкубації в фосфатному буфері (рН – 7,4) протягом 4 годин при температурі 37°C. Рожеве забарвлення, яке спостерігається, обумовлене гемоглобіном еритроцитів, внаслідок перекисного окислення фосfolіпідів мембран, що дає підстави стверджувати про забезпеченість мембран еритроцитів гідрофобними антиоксидантами АО [15]. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за здатністю адреналіну самоокислюватись в лужному середовищі з генерацією супероксиданіонрадикалу; у присутності СОД швидкість реакції знижується. Порівняння швидкість окислення контрольної і дослідної проби дає змогу судити про активність ензиму [3]. У сироватці визначали активність

\* Стаття є фрагментом планової НДР „Дослідження специфічної фармакологічної активності біологічно-активних речовин рослинного походження”; № держреєстрації 0101U001130.

## Актуальні проблеми сучасної медицини

церулоплазміну за реакцією окислення п-фенілендіаміну, яка відбувається за його присутності [8]. Рівень ВРПО оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів [5], принцип метода базується на їх властивості поглинати світлове випромінювання в ультрафіолетовому відрізку спектра. В тканинах печінки, мозку та сім'яників досліджували рівень продуктів ВРПО – продуктів, що реагують із 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реактанти) [3]. Принцип ґрунтується на здатності малонового діальдегіду реагувати із ТБК з утворенням триметинового комплексу, який має рожеве забарвлення, інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації ТБК-реактантів. Активність каталази печінки, мозку та сім'яників досліджували за здатністю перекису водню утворювати з солями молібдену стійкий пофарбований комплекс [9]. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію Ст'юдента.

### Результати та обговорення

Хронічне надходження пестициду 2,4-ДА обумовило зміни загальносоматичних та біохімічних показників крові та тканин у щурів і самців. Тварини 2 групи повільно набирали вагу (з 180,0 до 189,0,  $p < 0,1$ ), в них знизився апетит, спостерігалась агресивність, кволість, тьмяна, волога шерсть. При більш тривалому впливі токсиканту (3 група) спостерігалась тенденція до зниження ваги ( $p < 0,1$ ), значне випадіння шерсті, зниження рухливості та апетиту.

Введення пестициду протягом 15 днів (2 група) призвело до достовірного зростання рівня проміжних продуктів (дієнові кон'югати, ТБК-реактанти) ВРПО ліпідів. Так, вміст дієнових кон'югатів у сироватці крові тварин 2 групи -  $10,2 \pm 1,9$  ( $p < 0,002$ ), у тварин 3 групи -  $12,1 \pm 2,3$  ( $p < 0,002$ ) мМоль/л, тоді як у інтактних -  $3,9 \pm 0,9$  мМоль/л (таб. 1).

Таблиця 1  
Вплив 2,4-ДА на біохімічні показники в крові щурів

Біохімічні показники	Інтактні (1 група)	Введення 2,4-ДА 15 діб (2 група)	Введення 2,4-ДА 30 діб (3 група)
СГЕ, %	$7,2 \pm 1,9$	$23,6 \pm 2,8$ $P_{1-2} < 0,001$	$27,3 \pm 3,7$ $P_{1-3} < 0,001$ $P_{2-3} < 0,25$
Церулоплазмін, ед/мл	$56,7 \pm 3,1$	$34,5 \pm 2,4$ $P_{1-2} < 0,001$	$39,8 \pm 2,4$ $P_{1-3} < 0,001$ $P_{2-3} < 0,1$
Дієнові кон'югати, мМоль/л	$3,8 \pm 0,56$	$10,06 \pm 1,02$ $P_{1-2} < 0,001$	$12,3 \pm 1,4$ $P_{1-3} < 0,001$ $P_{2-3} < 0,1$
СОД, % Т	$78,9 \pm 3,2$	$62,4 \pm 3,1$ $P_{1-2} < 0,002$	$57,3 \pm 3,7$ $P_{1-3} < 0,001$ $P_{2-3} < 0,25$

Рівень ТБК-реактантів в тканинах щурів 2 групи зріс у порівнянні з показниками інтактних тварин ( $p < 0,001$ ). При більш тривалому надходженні токсиканту (3 група) також спостерігається достовірне зростання цього показника порівняно з інтактними. Зіставлення на 15 і 30 день експерименту рівня ТБК-реактантів у тварин показало достовірне зниження їх рівня наприкінці експерименту (таб. 2). При дослідженні показника СГЕ спостерігається його прогреси-

вне зростання у щурів 2 ( $p < 0,001$ ) та 3 групи ( $p < 0,001$ ) порівняно з показниками інтактних тварин. Однак, зіставлення показників СГЕ у щурів 3 групи, в порівнянні з показниками тварин 2 групи, не виявило достовірних змін, що свідчить про гальмування падіння рівня гідрофобних АО в еритроцитарних мембранах в другій половині експерименту (таб. 1).

Таблиця 2  
Біохімічні показники у тканинах щурів при хронічному надходженні пестициду 2,4-ДА

Біохімічні показники	Інтактні (1 група)	Введення 2,4-ДА 15 діб (2 група)	Введення 2,4-ДА 30 діб (3 група)
ТБК-реактанти, нМоль/г печінка	$79,5 \pm 5,7$	$191,0 \pm 18,4$ $P_{1-2} < 0,001$	$130,08 \pm 11,8$ $P_{1-3} < 0,002$ $P_{2-3} < 0,01$
мозок	$31,2 \pm 3,9$	$67,4 \pm 6,4$ $P_{1-2} < 0,001$	$49,5 \pm 4,2$ $P_{1-3} < 0,01$ $P_{2-3} < 0,02$
сім'яники	$14,8 \pm 2,6$	$38,53 \pm 3,9$ $P_{1-2} < 0,001$	$29,21 \pm 2,74$ $P_{1-3} < 0,002$ $P_{2-3} < 0,05$
Каталаза, мМоль/мин г печінка	$2,01 \pm 0,32$	$1,54 \pm 0,02$ $P_{1-2} < 0,1$	$1,37 \pm 0,1$ $P_{1-3} < 0,05$ $P_{2-3} < 0,1$
мозок	$0,204 \pm 0,016$	$0,104 \pm 0,013$ $P_{1-2} < 0,001$	$0,121 \pm 0,017$ $P_{1-3} < 0,001$ $P_{2-3} < 0,5$
сім'яники	$0,433 \pm 0,03$	$0,249 \pm 0,018$ $P_{1-2} < 0,001$	$0,272 \pm 0,015$ $P_{1-3} < 0,001$ $P_{2-3} < 0,25$

СОД, % Т печінка	71,2±3,5	54,29±4,9 P <sub>1-2</sub> <0,01	57,5±2,6 P <sub>1-3</sub> <0,01 P <sub>2-3</sub> <0,5
мозок	83,4±4,6	70,5±3,8 P <sub>1-2</sub> <0,05	59,2±3,7 P <sub>1-3</sub> <0,001 P <sub>2-3</sub> <0,05
сіменники	74,7±3,1	59,8±2,7 P <sub>1-2</sub> <0,01	52,23±2,78 P <sub>1-3</sub> <0,001 P <sub>2-3</sub> <0,05

Вивчення активності антиоксидантних ферментів у крові показало, що при хронічному надходженні токсиканту у тварин 2 та 3 груп достовірно знизилась активність досліджених ферментів - СОД та церулоплазміну порівняно з інтактними тваринами (табл. 1). Але, зіставлення активності цих ферментів у тварин 2 та 3 групи не виявило достовірних змін їхньої активності.

У тканинах також виявлено зниження активності антиоксидантних ферментів: каталази в печінці в 1,3 рази у тварин 2 групі та в 1,5 разів - 3 групи порівняно з інтактними, в мозку - в 2 рази у тварин 2 групи та в 1,7 разів - 3 групи, у сіменниках - в 1,7 та 1,6 разів відповідно порівняно з показниками інтактних тварин; СОД в печінці в 1,3 рази у щурів 2 групи та в 1,2 рази у щурів 3 групи, у мозку - в 1,2 рази при 15-денному впливі та в 1,4 рази при 30-денному, в сіменниках у 1,2 та 1,4 рази відповідно у порівнянні з показниками тварин 1 групи (табл. 2). Але зіставлення активності антиоксидантних ферментів у тканинах тварин 2 і 3 групи не виявило достовірного зниження їх активності, крім активності СОД в тканинах мозку ( $p < 0,05$ ) та сіменниках ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, на підставі отриманих результатів виявлено, що хронічне введення пестициду 2,4-ДА призводить до змін загальносоматичних та біохімічних показників, а саме: під впливом токсиканта протягом 15 днів спостерігалась тенденція до збільшення ваги тварин, а при 30-денному впливі - тенденція до зниження ваги. Шерсть при тривалому впливі токсиканту втрачала блиск, помітно випадала. У щурів знизився апетит, спостерігалась агресивність, загальмованість.

У тварин дослідних груп спостерігалась активізація процесів ВРПО ліпідів у крові та тканинах печінки, мозку та сіменниках. Зростання рівня СГЕ свідчить про зниження забезпеченості еритроцитарних мембран гідрофобними АО. При дослідженні активності антиоксидантних ферментів крові та тканин виявлено пригнічення їхньої активності, але зіставлення активності досліджених ферментів в різних тканинах (печінка, мозок, сіменники) у залежності від тривалості надходження прооксиданта виявило фазні зміни їхньої активності: з прогресивним падінням їхньої активності в тканинах мозку та сіменників (СОД) відсутні достовірні зміни, в порівнянні з величинами 15 та 30 доби експерименту.

На наш погляд, інтенсифікація ВРПО ліпідів у щурів при хронічному надходженні пестициду 2,4-ДА зумовлено розбігом процесів окисного фосфорилування з подальшим порушенням енергетичного обміну та переведенням його на вільнорадикальний шлях, що, з рештою, призводить до посилення  $\beta$ -окислення жирних кислот та підвищення ВРПО ліпідів [17]. Це сприяє активації ВРПО ліпідів та зниженню антиоксидантної забезпеченості, на що вказує підвищення рівня СГЕ. Вивчення активності антиоксидантних фермен-

тів свідчить про наявність двох фаз: в першій половині досліджу спостерігається зниження їхньої активності за рахунок блокади активних центрів антиоксидантних ферментів, на можливість такого механізму ряд авторів вказував раніше [12]. У другій фазі спостерігається гальмування падіння активності антиоксидантних ферментів, при цьому їхня активність значно нижча величин інтактних тварин. Можливий також і другий механізм пригнічення активності антиоксидантних ферментів - за рахунок пошкодження геному антиоксидантних ферментів продуктами надлишкового ВРПО ліпідів. Раніше ми згадували про підвищену чутливість геному антиоксидантних ферментів до впливу продуктів аутоокислення [2].

Отримані результати є основою для можливого подальшого дослідження диференційованого застосування препаратів АО для профілактики морфофункціональних змін при тривалому надходженні пестициду 2,4-ДА в залежності від тривалості надходження токсиканту. Перші дослідження використання препаратів з антиоксидантною активністю в таких умовах дали позитивні результати [7].

#### Література

1. Балан Г.М., Сергеев С.Г., Мыренко Т.В. и др. Острое групповое отравление гербицидом диканит 600 на основе 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и меры профилактики // Современные проблемы токсикологии. - 2003. - №3. - С. 52-58.
2. Воскресенский О.Н., Бобырев В.Н.. Изменение активности антиоксидантных ферментов при экспериментальном синдроме пероксидации у кроликов // Вопросы медицинской химии. - 1982. - т. 28. №2. - С.75-78.
3. Брусов О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на аутоокисление адреналина // Бюлл. эксперим. биол. и мед. - 1976. - №1. - С. 33-35.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М.: Наука, 1972. - 252 с.
5. Воскресенский О.М., Дельва В.А., Дудченко М.А. Методы диагностики метаболических нарушений при атеросклерозе и дифференцированное применение противоатеросклеротических средств: Методические рекомендации. - Полтава, 1982. - 26 с.
6. Гришук М.І.. Вплив токсикантів кадмію та пестициду 2,4-ДА на стан слизової оболонки тонкої кишки // Вісник проблем біології та медицини. - 2004. - Вип. 3. - С. 63-66.
7. Жанаева С.Я., Зыков А.А., Мичурин С.В. Повреждение печени экологическим токсикантом 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой и защитное действие биофлавоноидного комплексного препарата манжетки обыкновенной // Бюлл. СО РАМН. - 1999. - №3-4. - С. 83-87.
8. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. - Минск: Беларусь, 1976. - 311 с.
9. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. - 1988. - №1. - С. 16-19.
10. Курляндский Б.А. Основные направления международной деятельности по медицинским проблемам химиче-

- ской безопасности и возможность их реализации в Российской Федерации // Токсикологический вестник. - 2001. - №6. - С. 2-5.
11. Малинин О.А. Ветеринарная токсикология: Учеб. пособие. - Корсунь-Шевченковский: ЧП Майданченко, 2002. - 464 с.
  12. Островська Г.Ю., Бобирьов В.М. Активность системы антиоксидантной защиты в условиях хронического поступления диэтилдитиокарбамата при разных уровнях антиоксидантной обеспеченности организма // Современные проблемы токсикологии. - 1999. - №1. - С.50-52.
  13. Пестициды: Справочник / Мартыненко В.И., Промоненко В.К., Кукаленко С.С. и др. - М.: Агропромиздат, 1992. - с. 368.
  14. Проданчук М.Г., Великий В.І., Кучак Ю.А. Методологічні підходи до оперативної екогігієнічної оцінки асортименту та обсягів застосування пестицидів у сільському господарстві // Довкілля та здоров'я. - 2004. - №2. - С. 75-78.
  15. Спиричев В.В., Матиус И.И., Кронштейн Л.М. Витамин Е // Экспериментальная витаминология. Минск: Наука и техника. - 1979. - С. 18-57.
  16. Garabrant P. Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). Epidemiology and Toxicology // Critical Reviews in Toxicology. - 2002. - №32(4). - P. 233-257.
  17. Watt B.E., Bradberry S.M., Vale J.A. Chlorophenoxy herbicides - mechanisms of toxicity // J. Toxicol. Clin. Toxicol. - 1999. - V. 37, N3. - P. 357-358.

### Реферат

ПОКАЗАТЕЛИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОСТУПЛЕНИИ ПЕСТИЦИДА АМИННОЙ СОЛИ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Бобырев В.Н., Цветкова Я.А.

Ключевые слова: пестициды, антиоксиданты, свободнорадикальное перекисное окисление липидов

В эксперименте на белых крысах вводили пестицид 2,4-ДА в дозе 1/10 от LD<sub>50</sub>. Срок эксперимента 15 и 30 суток. Под влиянием хронического воздействия пестицида 2,4-ДА наблюдается активизация процессов СРПО липидов в крови и тканях печени, мозга и семенниках, снижение антиоксидантного обеспечения и фазное угнетение активности антиоксидантных ферментов. Полученные результаты являются основой для возможного исследования препаратов с антиоксидантной активностью при хронической интоксикации 2,4-ДА.

### Summary

INDICES OF THE FREE RADICAL PEROXIDATION OF LIPIDS OF RATS UNDER CHRONICAL RECEIPT OF 2,4-DICHLOROPHOXYACETIC ACID PESTICIDE

V.N. Bobyrev, Y.A. Cvetkova

Key words: pesticides, antioxidant, free radical peroxide oxygenation of lipids

In experiment the pesticide 2,4-DA in dose 1/10 from LD<sub>50</sub> was administered white rats during 15-30 days. Under the chronic influence of 2,4-DA pesticide the activation of the processes of lipid FRPO in blood and hepatic tissues, brain and testis, the reduction of antioxidant defense and phase suppression of antioxidant enzyme activity may be observed. This investigation is basis for research of agents with antioxidant activity under chronic intoxication of 2,4-DA.

УДК: 616.099-092:612.112.94.015.2:612.6+612.017.1.06

## ТИМАЛІН ВІДНОВЛЮЄ ЕКСПРЕСІЮ ПОВЕРХНЕВИХ АНТИГЕННИХ ДЕТЕРМІНАНТ ЛІМФОЦИТІВ, ПОПЕРЕДНЬО ОБРОБЛЕНИХ ТРИПСИНОМ

Весніна Л.Е., Кайдашев І.П.

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Досліджено пептидний комплекс тимусу тималін з метою визначити, яким чином тималін впливає на експресію поверхневих антигенних детермінант лімфоцитів, попередньо оброблених трипсином та порівняти його вплив з пептидним комплексом нирок. Попередня обробка лімфоцитів трипсином призвела до вірогідного зниження експресії поверхневих імунoglobulinових рецепторів, антигенних детермінант CD3, CD4 та CD8, за винятком CD72. Використання тималіну (0,5 мкг/мл) характеризувалося відновленням експресії поверхневих рецепторів лімфоцитів, попередньо видалених з поверхні мембрани за допомогою трипсину, та зміною перегрупувань рецепторів. Спрямованість дії тималіну цілком узгоджується, впливом пептидного комплексу нирок та підтверджує нашу думку стосовно механізмів цієї відновлювальної дії.

Ключові слова: лімфоцити, антигенні детермінанти, експресія, тималін, трипсин.

Структурна та функціональна сталість клітинних популяцій підтримується складною системою біорегуляції, серед якої важлива роль відводиться пептидним біорегуляторам, які мають аутокринну, паракринну та дистантну дію. На теперішній час вони виділені практично із усіх органів та тканин людини, перш за все – із центрального органу імуногенезу – тимусу (тимопоетин, тимозин, тималін). Вказані пептиди характеризуються широким спектром біологічної активності. Тималін, зокрема, безпосередньо впливає на реакції клітинного імунітету та системи, які знаходяться в залежності від змісту та функціональної активності Т-лімфоцитів, в

умовах патології сприяє відновленню цілої низки фізіологічних функцій організму: імунологічної реактивності, гемостазу, нейроендокринної регуляції [6,7].

Пептиди змусили дослідників змінити погляд на багато ключових принципів регуляції функцій на усіх рівнях інтеграції організму – від мембрани до функціональної системи в цілому. Біологічні ефекти регуляторних пептидів опосередковані їхньою взаємодією з мембранними рецепторними білками клітин, такими, як специфічні антигенні детермінанти, так звані кластери диференціювання - CD. Мембранні маркери CD окрім властивості виконувати функцію рецепторів, також є