

БІОХІМІЯ

УДК: 599.32+615.9] – 001.5

Л.А. БОЙКО, Л.С. ФІРА, П.Г. ЛИХАЦЬКИЙ

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»
майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001

ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПІСЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ МЕКСИДОЛУ В УМОВАХ ОДНОЧАСНОГО УРАЖЕННЯ ЩУРІВ КАРБОФОСОМ І ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

В експериментах на щурах за умов одночасного їх ураження карбофосом та тетрахлорметаном виявлені глибокі порушення в антиоксидантній системі, що проявляється зниженням концентрації відновленого глутатіону та змінами в активності каталази у печінці та міокарді тварин, а також вмісту церулоплазмину в сироватці крові. Доведена ефективність застосування за даної патології препарату мексидолу, після використання якого в уражених тварин показники антиоксидантної системи наближаються до рівня таких у тварин інтактного контролю.

Ключові слова: карбофос, тетрахлорметан, мексидол, антиоксидантна система, відновлений глутатіон, каталаза, церулоплазмін

Фосфорорганічні сполуки (ФОС) сьогодні досить інтенсивно виробляються та використовуються в сільському господарстві. Серед них є речовини отруйні (метафос, меркаптофос) і високотоксичні (фосфамід), застосування яких повністю заборонено; є сполуки середньої токсичності (хлорофос, карбофос), які поки що використовуються обмежено; є низько-токсичні препарати (метилацетофос, авенін), які застосовуються досить широко. Більшість ФОС, навіть низькотоксичні, характеризуються кумулятивним ефектом і тому можуть становити небезпеку для здоров'я людини [1, 5].

Токсичними властивостями наділені такі речовини, як вихідні, проміжні і кінцеві продукти хімічної промисловості, до складу яких входить тетрахлорметан. Це речовини, які накопичуються в печінці, головному мозку, м'язах, жировій тканині [2, 9]. Потрапляючи до організму людини дані ксенобіотики можуть викликати зміни активності показників антиоксидантної системи, для усунення якої використовують препарати, що обмежують активність процесів вільнорадикального окислення. Представником таких препаратів є мексидол, що проявляє антиоксидантні, антигіпоксичні та мембраностабілізуючі властивості.

Виходячи з цього, актуальним є вивчення впливу даного коригуючого чинника на стан антиоксидантної системи організму за умов одночасного ураження щурів карбофосом та тетрахлорметаном, що і стало метою даної роботи.

Матеріал і методи досліджень

Досліди проведені на білих щурах масою тіла 175 -200 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського». Виконували їх згідно із Загальними принципами експериментів на

тваринах, схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна 2001 [4, 10]. Тварини були розділені на дев'ять груп: 1-а – інтактний контроль; 2-а – тварини, уражені карбофосом протягом 10 днів та 4-та доба ураження тетрахлорметаном, 3-я група тварин (ураження як у 2-ої групи та після застосування мексидолу); 4-а група – 10 днів ураження карбофосом та 7-ма доба отруєння CCl_4 , 5-а група – щури, уражені карбофосом протягом 10 днів та 7-а доба розвитку токсичного гепатиту (тварини цієї групи отримували мексидол протягом 10 днів); 6-та група – щури, уражені карбофосом протягом 30 днів та 4-та доба розвитку тетрахлорметанового гепатиту, 7-а група – щури, які після ураження токсикантами як у попередній групі, та після отримування мексидолу протягом всього експерименту; 8-а група тварин – 30 днів введення карбофосу та 7-а доба ураження CCl_4 ; 9-а група – уражені щури як у 8-ій групі та після 30-денного введення мексидолу.

Карбофос вводили щоденно внутрішньошлунково у вигляді водного розчину з розрахунку 20 мг/кг маси тіла тварини, що становить 1/10 від LD_{50} [13]. Тетрахлорметан вводили внутрішньочеревно, дворазово - через добу у вигляді 50% олійного розчину у дозі 1,0 мл/кг маси тварини [3]. Мексидол тварини отримували щоденно внутрішньочеревно з розрахунку 16 мг/кг маси тіла. Дозу мексидолу розраховували, виходячи із середньотерапевтичної дози на добу для людини і перераховували для тварин [12]. Щурів піддавали евтаназії з використанням тіопенталу натрію.

Для досліджень обрали сироватку крові, міокард та печінку тварин, де визначали концентрацію відновленого глутатіону (ВГ), як одного з головних компонентів неферментативної ланки антиоксидантної системи. Для визначення концентрації ВГ використовували метод [11], принцип якого полягає у взаємодії 5,5-дитіобіс (2-нітробензойної) кислоти (реактив Елмана) з вільними SH-групами ВГ з утворенням тіонітрофенільного аніону жовтого кольору, кількість якого прямо пропорційна вмісту SH-груп. Ативність каталази (КТ) визначали за методом [7], принцип якого ґрунтується на здатності перекису водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс жовтого кольору. Вміст церулоплазміну визначали за методом [6]. Принцип методу базується на здатності п-фенілендіаміну в присутності церулоплазміну окиснюватись з утворенням забарвлених сполук рожевого кольору. Кількість церулоплазміну пропорційна інтенсивності забарвлення.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою методу «Statistika 6,0» з використанням критерію Стюдента [8].

Результати досліджень та їх обговорення

Після проведених досліджень встановлено, що вміст ВГ значно зменшився в сироватці крові та печінці щурів при ураженні ксенобіотиками (табл. 1). З таблиці видно, що вміст ВГ при десятиденному введенні карбофосу та на четверту добу після ураження CCl_4 у сироватці крові знизився на 27 %, у печінці на 24 %. При десятиденній інтоксикації карбофосом та на 7 добу введення тетрахлорметану даний показник змінився таким чином: у сироватці крові знизився на 31 %, у печінці на 26,5 %.

Після тридцятиденного введення карбофосу та на 4 добу отруєння CCl_4 вміст ВГ знизився у сироватці крові на 27 %, у печінці уражених тварин - на 21 % відносно рівня інтактних тварин. На тридцяті та сьому добу введення токсинів вміст ВГ знизився у сироватці крові на 35 %, у печінці на 15 % відносно рівня інтактного контролю. Отримані дані свідчать про глибокі порушення у неферментативній ланці антиоксидантної системи. Після використання антиоксиданту мексидолу спостерігається підвищення вмісту ВГ як в сироватці крові, так і в печінці уражених щурів.

Так, при десятиденному введенні карбофосу та на четверту добу ураження CCl_4 у сироватці крові вміст ВГ підвищився на 19 %, у печінці на 12 %. При десятиденній інтоксикації карбофосом та на 7 добу введення тетрахлорметану показники зросли таким чином: у сироватці крові на 27 %, у печінці на 18 %. Після тридцятиденного введення карбофосу та на 4 добу отруєння CCl_4 при введенні мексидолу вміст ВГ збільшився у сироватці крові на 23 %, у печінці уражених тварин на 18 %. На тридцяті та сьому добу введення токсинів вміст ВГ зріс у сироватці крові на 27 %, у печінці на 12 % відносно контролю.

Вміст відновленого глутатіону у сироватці крові (мкмоль/л) та печінці (мкмоль/кг) щурів, одночасно уражених карбофосом та тетрахлорметаном після застосування мексидолу ($M \pm m$; $n = 18$)

| Матеріал дослідження | Групи тварин | Строк дослідження, доба | | | |
|----------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | 10 ФОС + 4 CCl ₄ | 10 ФОС +7 CCl ₄ | 30 ФОС +4 CCl ₄ | 30ФОС +7 CCl ₄ |
| Сироватка крові | інтактний контроль | 0,263±0,020 | | | |
| | уражені | 0,190± 0,015* | 0,182± 0,017* | 0,186± 0,018* | 0,173± 0,018* |
| | уражені+ мексидол | 0,236± 0,013 | 0,246± 0,011** | 0,250± 0,011** | 0,248± 0,017** |
| Печінка | інтактний контроль | 0,338±0,016 | | | |
| | уражені | 0,260± 0,010* | 0,250± 0,019* | 0,266± 0,020* | 0,286± 0,011* |
| | уражені+ мексидол | 0,303± 0,016 | 0,312± 0,011** | 0,335± 0,014** | 0,330± 0,011** |

Примітка: тут і в наступних таблицях:

- 10 та 30 ФОС – ураження карбофосом протягом 10 та 30 діб,

- 4 та 7 CCl₄ – ураження тетрахлоретаном, 4 та 7 доба,

*- вірогідні зміни між тваринами інтактного контролю та ураженими

** - вірогідні зміни між ураженими тваринами та тваринами, які отримували мексидол

Нами досліджувався вплив мексидолу на ферментативну ланку антиоксидантної системи, зокрема на активність каталази, яка розщеплює токсичний для організму пероксид водню (табл. 2).

Таблиця 2

Активність каталази у сироватці крові, печінці та міокарді(мкатал/г білка) щурів, одночасно уражених карбофосом та тетрахлорметаном після застосування мексидолу ($M \pm m$; $n = 18$)

| Матеріал дослідження | Групи тварин | Строк дослідження, доба | | | |
|----------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | 10 ФОС + 4 CCl ₄ | 10 ФОС +7 CCl ₄ | 30 ФОС +4 CCl ₄ | 30ФОС +7 CCl ₄ |
| Сироватка крові | інтактний контроль | 91,83±2,18 | | | |
| | уражені | 113,17± 5,05* | 128,33± 3,03* | 137,50± 2,75* | 134,67± 6,19* |
| | уражені+ мексидол | 96,83± 3,41** | 98,83± 3,06** | 109,00± 3,89** | 105,00± 5,63** |
| Печінка | інтактний контроль | 104,67±4,66 | | | |
| | уражені | 89,67± 2,27* | 87,00± 2,11* | 89,00± 2,41* | 86,33± 2,50* |
| | уражені+ мексидол | 98,67± 2,76 | 97,00± 3,78 | 98,67± 2,67** | 102,00± 3,42** |
| Міокард | інтактний контроль | 87,33±1,91 | | | |
| | уражені | 77,00± 2,05* | 76,00± 2,92* | 74,00± 2,73* | 77,00± 2,35* |
| | уражені+ мексидол | 80,33± 3,77 | 85,00± 1,53** | 83,67± 1,50** | 85,00± 1,34** |

При десятиденному отруєнні карбофосом та на четверту добу ураження CCl_4 після введення мексидолу активність досліджуваного ензиму в сироватці крові знизилась на 18 %, у наступний термін дослідження – 10 днів ураження карбофосом та 7 діб отруєння тетрахлорметаном – активність КТ знизилась на 32 %. Після тридцятиденного введення карбофосу та на 4 добу отруєння CCl_4 активність КТ виявилась на 31 % нижчою у тварин, які отримували мексидол, порівняно з ураженими щурами, на тридцяті та сьому добу введення токсикантів – на 33 %.

Після введення антиоксиданту ми спостерігали підвищення активності КТ в печінці та серці тварин. В уражених щурів активність КТ в даних органах знижувалась. У групі отруєних тварин, які отримували мексидол, на десяту та четверту доби ураження токсикантами активність КТ незначно збільшилась, на сьому добу розвитку токсичного гепатиту на тлі ураження карбофосом активність КТ зросла на 10 % у печінці та серці тварин. При тридцятиденному введенні карбофосу та на 4 добу ураження тетрахлорметаном при дії мексидолу досліджуваній показник зріс на 9 % у печінці та на 11 % у міокарді уражених щурів. На тридцяті та сьому добу введення токсикантів ми спостерігали підвищення активності КТ у печінці на 17 %, у міокарді - на 9 %.

У відповідь на введення в організм тварин токсичних чинників проходить активація захисно – компенсаторних сил організму, що проявляється зміною вмісту Су-депонуємого протеїну гострої фази – антиоксиданту ЦП (табл. 3).

При десятиденному введенні карбофосу та на 4 добу ураження CCl_4 вміст церулоплазміну у сироватці крові збільшився в 1,6 раза, після застосування мексидолу зменшився на 30 % порівняно з ураженими тваринами. На сьому добу токсичного гепатиту на тлі 10-денного введення карбофосу даний показник зріс в 1,4 раза. Після застосування коригуючого чинника у даний термін дослідження вміст ЦП зменшився на 24 %.

Після тридцятиденного введення карбофосу та на 4 добу отруєння CCl_4 вміст ЦП підвищився в 1,7 раза та при введенні антиоксиданту зменшився на 26 % відносно уражених тварин.

Таблиця 3

Вміст церулоплазміну у сироватці крові (мг/л) щурів, одночасно уражених карбофосом та тетрахлорметаном після застосування мексидолу ($M \pm m$; $n = 18$)

| Матеріал дослідження | Групи тварин | Строк дослідження, доба | | | |
|----------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 10 ФОС + 4 CCl_4 | 10 ФОС + 7 CCl_4 | 30 ФОС + 4 CCl_4 | 30 ФОС + 7 CCl_4 |
| Сироватка крові | інтактний контроль | 3,35±0,11 | | | |
| | уражені | 5,27±0,26* | 4,83±0,16* | 5,57±0,24* | 4,95±0,19* |
| | уражені+ мексидол | 4,27±0,26** | 4,03±0,12** | 4,70±0,15** | 3,97±0,20** |

На тридцяті та сьому добу введення токсинів вміст ЦП зріс в 1,5 раза, при використанні мексидолу знизився на 30 %.

Отже, нами виявлено зміни в акти вності показників антиоксидантної системи у тварин після одночасного ураження їх карбофосом та тетрахлорметаном. Встановлено, що застосування даних токсикантів викликає зниження вмісту відновленого глутатіону у сироватці крові та печінці тварин, підвищення активності каталази та вмісту церулоплазміну у сироватці крові та зниження активності каталази у печінці та міокарді щурів після ураження. Очевидно, печінка та міокард є мішенями для прояву токсичної дії використаних нами ксенобіотиків.

Використаний нами антиоксидант мексидол проявив позитивний вплив на показники антиоксидантної системи щурів після ураження, що підтверджується отриманими результатами досліджень.

Висновки

Встановлено, що розвиток токсичного гепатиту, викликаного введенням в організм тетрахлорметану на тлі 30-денного ураження щурів карбофосом приводить до глибоких порушень у неферментативній та ферментативній ланках антиоксидантної системи. На це вказують зміни активності каталази, концентрації відновленого глутатіону та вмісту церулоплазмину у сироватці крові, активності каталази та концентрації відновленого глутатіону в печінці та міокарді щурів після ураження. Проведені дослідження з вивчення ефективності застосування за даної патології мексидолу підтверджують його антиоксидантні властивості, що дає можливість запропонувати використання даного препарату за токсичних гепатитів та інтоксикаціях хімічного генезу.

1. *Воронко Е. А.* Острые отравления фосфоорганическими веществами / Е. А. Воронко // Медицина. — 2004. — № 4. — С. 26—29.
2. *Губський Ю. І.* Біохімічні та молекулярно-біологічні механізми хімічної загибелі клітин за ураження високотоксичними ксенобіотиками / [Ю. І. Губський, Є. Л. Левицький, О. В. Задорина, та ін.] // Буков. мед. вісн. — 2005. — Том 9, № 2. — С. 76—77.
3. *Губский Ю.И.* Коррекция химического поражения печени / Ю.И. Губский. — К.: Здоров'я, 1989. — 168 с.
4. *Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідях* // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. — 2003. — Т. 22, № 2. — С. 108—109.
5. *Карабалин С.К.* Клинико-морфологическая характеристика и дифференциальная диагностика профессиональных поражений печени у рабочих фосфорного производства / С. К. Карабалин // Медицина труда и промышленная экология. — 2005. — № 4. — С. 15—21.
6. *Колб В.Г., Камишников В.С.* Визначення активності церулоплазмину в крові / В.Г. Колб, В.С. Камишников // В кн.: Клиническая биохимия. — Минск: Беларусь, 1976. — С. 219—220.
7. *Королюк М.А.* Метод определения активности каталазы / [М.А.Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев] // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16—19.
8. *Лапач С. Н.* Статистические методы в медикобиологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. — К: Морион, 2000. — 320 с.
9. *Лісничук Н. Є.* Дослідження параметрів вільнорадикального окиснення та стан антиоксидантної системи білих щурів з експериментальним токсичним ураженням печінки / Н. Є. Лісничук // Вісник проблем біології і медицини. — 2007. — Вип. 2. — С. 83—88.
10. *Науково – практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними* / [Ю.М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова]. — К.: Авіцена, 2002. — 136 с.
11. *Прохорова М.И.* Методы биохимических исследований / М.И. Прохорова. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 168 с.
12. *Рыболовлев Ю.Р.* Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // Доклады АН СССР. — 1979. — Т. 247, № 6. — С. 1513—1516.
13. *Фомичев А.В.* Экспериментальное исследование эффективности 5-ти компонентной антиоксидантной рецептуры в качестве средства ранней реабилитации при отравлениях карбофосом средней степени тяжести / [А.В. Фомичев, А.Е.Сосюкин, В.П.Федонюк и др.] // Биомедицинский журнал. — 2004. — Т. 5. — С. 381—385.

Л. А. Бойко, Л. С. Фіра, П. Г. Лихацький

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского МЗО Украины»

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕКСИДОЛА В УСЛОВИЯХ ОДНОВРЕМЕННОГО ПОРАЖЕНИЯ КРЫС КАРБОФОСОМ И ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

В экспериментах на крысах при одновременном их поражении карбофосом и тетрахлорметаном выявлены глубокие изменения в антиоксидантной системе, которые проявляются снижением количества восстановленного глутатиона и изменениями активности каталазы в печени и миокарде животных, а также содержанием церулоплазмину в сыворотке крови. Доказана эффективность применения при данной патологии препарата мексидола, после

применения которого у пораженных животных показатели антиоксидантной системы приближены к уровню животных интактного контроля.

Ключевые слова: карбофос, тетрахлорметан, мексидол, антиоксидантная система, восстановленный глутатион, каталаза, церулоплазмин

L.A. Boyko, L. S. Fira, P.G. Lyhatskiy

I. Ya Horbachevsky Ternopil state medical university

DYNAMIC OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AFTER THE APPLYING OF MEXYDOL AT THE CONDITION OF THE COMBINED AFFECTING WITH TETRACHLOROMETHANE AND CARBOPHOS

It was established the strong disorders in the antioxidant system, that characterized by the decreasing of the reducing glutathione's quantity and the changing in the activity of catalase in the animal's liver and myocard, in the amount of ceruloplasmin in the blood serum during the experiments on the rats at the condition of the combined affecting with tetrachloromethane and carbophos. It was confirmed the effectiveness of mexydol at this pathology. After its applying the indicators of the antioxidant system in the affecting animals approached to the level of the antioxidant system in the intact animals.

Keywords: carbophos, tetrachloromethane, mexydol, antioxidant system, reducing glutathione, catalase, ceruloplasmin

Рекомендує до друку

Надійшла 03.09.2014

О.Б. Столяр

УДК 57.083.3 + 616-71 + 543.9

¹О.Ю. ГАЛКІН, ¹О.Б. БЕСАРАБ, ²Ю.В. ГОРШУНОВ, ¹О.М. ДУГАН

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»
пр-т. Перемоги, 37, Київ, 03056

²Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства
вул. Урицького, 35, Київ, 03035

БІОАНАЛІТИЧНА ВАЛІДАЦІЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО НАБОРУ ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ІМУНОГЛОБУЛІНУ Е ЛЮДИНИ

У статті наведено науково-методичне обґрунтування процедури біоаналітичної валідації імуноферментного набору для кількісного визначення загального IgE людини. Валідаційні характеристики (прецизійність, діагностична та аналітична специфічність, діагностична чутливість, правильність, лінійність) визначали як на момент випуску діагностичного набору, так і на момент закінчення терміну придатності (як елемент дослідження стабільності). Середнє значення діагностичної специфічності склало 99,3%. Методика імуноферментного аналізу забезпечила лінійний характер залежності у діапазоні 10-1000 МО/мл, а невизначеність калібрувального графіку була незначущою. Межа виявлення становила 1,42 МО/мл, а межа кількісного визначення (аналітична чутливість) – 4,33 МО/мл. Межа відтворюваності співпадала із аналітичною чутливістю набору. Правильність, виражена через систематичну похибку, склала 0,25 МО/мл та була статистично незначущою.

Ключові слова: імуноферментний аналіз, валідація, IgE людини

Оцінка придатності аналітичних методик є одним із найважливіших елементів системи забезпечення якості продукції фармацевтичної та біотехнологічної галузей. Державна фармакопея України (ДФУ) визначає валідацію аналітичних методик як процедуру