

**ДИНАМІКА МЕТАБОЛІЧНИХ ЗМІН В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ
ЗА УМОВ УРАЖЕННЯ НІТРИТОМ НАТРІЮ****ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет****імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (м. Тернопіль)****marya_k@ukr.net**

Дана робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Вивчення порушень метаболічних процесів у тварин, отруєних ксенобіотиками, та корекція їх за допомогою антиоксидантів», № державної реєстрації 0106U001760.

Вступ. За останні десятиріччя використання мінеральних добрив, в тому числі азотних, значно збільшилось, що зумовило різке зростання залишкової кількості нітратів та нітритів у довкіллі, а в кінцевому результаті – збільшення нітритного навантаження на людину [4,7,9,15]. В ґрунті, а також у поверхневих і ґрунтових водах нітрати утворюються при природньому розкладі мікроорганізмами органічних азотовмісних речовин. Утворений іон амонію окиснюється в нітрити та нітрати. Частина їх знову засвоюється рослинами, а частина попадає у відкриті водоймища [7,9]. Крім того, застосування азотних добрив та забруднення довкілля промисловими та побутовими відходами призводить до збільшення вмісту нітратів у питній воді та сільськогосподарських продуктах [13], зокрема нітриту натрію, який є класичним метгемоглобіноутворювачем, за його дії на організм розвивається гемічна гіпоксія. За даними літератури [4,15], нітрит натрію в контакт з оксигемоглобіном призводить до утворення радикалів, які є активними реагентами, що пошкоджують біологічні системи, проявляють виражену цитотоксичну дію, ініціюють процеси пероксидації ліпідів, білків, нуклеїнових кислот, що свідчить про виражену токсичну дію нітратів та нітритів на організм людини і тварин [12,15]. Незважаючи на значний об'єм досліджень, ряд питань, що стосуються впливу їх на різні системи організму ще не з'ясовані, що потребує серйозної уваги та подальшого вивчення.

Метою дослідження було вивчити вплив нітриту натрію на динаміку показників пероксидного окиснення ліпідів, ендогенної інтоксикації та функціональний стан плазматичних мембран у щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проведено на 60 безпородних білих щурах-самцях масою 180-190 г, яких утримували на стандартному раціоні виварію. Гостре токсичне ураження моделювали шляхом одноразового внутрішньошлункового введення нітриту натрію в дозі 70 мг/кг маси тіла [12]. Піддослідних тварин було поділено на такі групи: 1-а – інтактні щури (контроль), 2-а – щури, уражені нітритом натрію. Щурів виводили з експерименту шляхом кро-

вопускання за умов тіопентал-натрієвого наркозу на 1, 4, 7 і 14-у доби від моменту інтоксикації. Для досліджень використовували цільну кров, сироватку крові, гомогенат печінки. Всі маніпуляції з експериментальними тваринами проводили із дотриманням правил відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» та «Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними» [10,16].

Стан пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за рівнем дієнових кон'югатів (ДК) [6] та вмістом ТБК-активних продуктів (ТБК АП) у реакції з тіобарбітуровою кислотою [3]. Ступінь ендогенної інтоксикації визначали за відсотком еритроцитарного індексу інтоксикації (EII) – за кількістю поглинутого барвника (метиленового синього) еритроцитарними мембранами [11] та кількістю метгемоглобіну (MetHb) в крові, який визначали ціангідриновим методом [2]. Функціональний стан плазматичних мембран визначали за активністю аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспаратамінотрансферази (АсАТ) – в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином [5].

Отриманий в результаті експерименту цифровий матеріал був систематизований та оброблений за допомогою методів варіаційної статистики із використанням програм «Excel Microsoft» [8] та «Statsoft STATISTICA».

Результати досліджень та їх обговорення. Про інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення ліпідів судили за вмістом ДК та ТБК АП. Результати досліджень показали, що за умов гострої нітритної інтоксикації відбуваються значні зміни в процесах ліпопероксидації. Результати дослідження концентрації ДК показали, що даний показник вірогідно ($p < 0,001$) зростає в усі досліджувані терміни (**табл. 1**): на 1-шу добу – на 88,4% відносно групи неуразжених щурів, на 4-ту добу – на 128,7%, порівняно з аналогічним показником інтактної групи тварин. В наступні доби досліді концентрація ДК знижувалась, порівняно з попереднім показником, але рівня норми не досягала. Так, за дії нітриту натрію на організм щурів на 7-му добу експерименту вміст ДК в сироватці крові знижувався на 7,3% відносно попередньої доби, а на 14-й день – на 38% порівняно з 4-ою добою досліді. Вміст ТБК АП у сироватці крові на 1-шу добу досліді, в порівнянні з контролем, вірогідно зростає на 41,3%.

Таблиця 1.

Показники ПОЛ в сироватці крові та печінці щурів з гострим отруєнням організму нітритом натрію ($M \pm m$)

Показник	Група тварин				
	контрольна (інтактна)	уражені тварини, доба експерименту			
		1	4	7	14
ДК сироватки, ум.од./мл	0,467±0,018	0,880±0,024 ***	1,068±0,030 ***	0,990±0,027 ***	0,683±0,018 ***
ТБК АП сироватки, мкмоль/л	6,44±0,15	9,10±0,24 ***	12,50±0,36 ***	10,72±0,30 ***	8,55±0,24 ***
ДК печінки, ум.од./г	0,161±0,005	0,310±0,006 ***	0,402±0,012 ***	0,340±0,009 ***	0,195±0,006 ***
ТБК АП печінки, мкмоль/кг	38,35±1,20	51,07±1,50 ***	71,26±2,10 ***	60,68±1,80 ***	51,39±1,80 ***

Примітки. Тут і в наступній таблиці зірочкою позначені величини, що статистично достовірно відрізняються від контрольних: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Найбільше зростання вмісту ТБК АП виявлено на 4-ту добу експерименту – на 94,1% більше, у порівнянні з групою інтактних тварин. На 7-му і 14-ту доби даний показник вірогідно зростав відповідно на 66,4 і 32,7%. У печінці отруєних тварин спостерігалась аналогічна закономірність змін вмісту продуктів ліпопероксидації (**табл. 1**). Так, вміст ДК у печінці отруєних тварин вірогідно зростав на 1-й день досліджу – на 92,5%.

Найбільше зростання ДК спостерігалось на 4-ту добу експерименту – на 149,7%, у порівнянні з групою інтактних тварин. На високому рівні даний показник знаходився і на 7-й день дослідження – 211,2%. Рівень ДК в печінці щурів був на 14-ту добу на 121,1% більшим, порівняно з контрольною групою щурів. При вивченні вмісту ТБК АП в печінці вірогідно зростав на 33,2% через добу від моменту введення отрути. Найбільших величин рівень ТБК АП досягнув на 4-ту добу експерименту, порівняно з групою інтактних тварин. Такий високий вміст ТБК АП свідчить про розвиток дистрофічно-некротичних змін у печінці протягом перших чотирьох днів при нітритному ураженні. В наступні дні експерименту вміст ТБК АП в печінці отруєних нітритом натрію тварин був більшим на 58,3% (7-ма доба) і 34,0% (14-та доба) від групи контрольних тварин. Ці факти свідчать, що за умов нітритної інтоксикації у гепатоцитах і крові піддослідних щурів спостерігається інтенсифікація вільнорадикальних процесів, яка призводить до активації процесів ліпопероксидації та нагромадження ендогенних токсичних продуктів.

Токсична дія нітритну натрію проявляється гіпоксією, що розвивається внаслідок утворення MetHb та порушення транспорту кисню кров'ю. Активні форми кисню, які утворюються в організмі при надходженні токсичних чинників, викликають посилене окиснення Hb до MetHb. При дослідженні вмісту MetHb в крові щурів, отруєних нітритом натрію, ми відмітили вірогідне зростання його на 69,1% через 24 год. від початку експерименту (**табл. 2**). На 4-ту добу вміст MetHb був найвищим (180,0%), порівняно з контрольною групою щурів. На 7-му добу експерименту спостерігалось деяке зниження даного показника, що становило 162,7% відносно контролю, а на 14-й день – 140%.

Метгемоглобіноутворення – вільнорадикальний процес, який проходить з утворенням активних форм кисню, що спричиняють деструктивну дію на мембрани еритроцитів і полегшують цим самим вивільнення гемоглобіну з останніх.

Одним із способів діагностики ендогенної інтоксикації є дослідження проникності мембран еритроцитів. У **таблиці 2** наведені дані, які вказують

на зміну ЕП під впливом нітритну натрію, в порівнянні з контрольним показником. На 1-шу добу експерименту відсоток ЕП зростав на 60,3%, на 4-ту – на 92,5%, а на 7-му і 14-ту доби досліджу спостерігалось деяке зменшення даного показника відносно групи інтактних щурів. Результати виявились вірогідними ($p < 0,001$) в усіх випадках, що свідчить про підвищення проникності мембрани еритроцитів після отруєння щурів нітритом натрію. Очевидно, це є наслідком дії на мембрану АФК, які утворюються при надходженні в організм хімічного чинника.

Про порушення структури і функції клітинних мембран за умов дії нітритну натрію вказують і результати досліджень, наведені в **таблиці 2**. В них представлені результати досліджень активності цитозольних ферментів (АлАТ та АсАТ) у сироватці крові здорових та уражених тварин. Як відомо, вміст цитозольних форм у сироватці крові та позаклітинному просторі тканин знаходиться на відносно низькому рівні. Пошкодження плазматичних мембран або підвищення клітинної проникності призводить до виходу ферментів із цитозоля, і активність їх вказує

Таблиця 2.

Динаміка показників ендогенної інтоксикації та стану плазматичних мембран в сироватці крові щурів з гострим отруєнням організму нітритом натрію ($M \pm m$)

Показник	Група тварин				
	контрольна (інтактна) n=12	уражені тварини, n=32; доба експерименту			
		1	4	7	14
MetHb, г/л	1,10±0,03	1,86±0,06 ***	1,98±0,06 ***	1,79±0,06 ***	1,54±0,04 ***
ЕП, %	43,94±1,27	70,45±2,03 ***	84,60±2,44 ***	77,20±2,23 ***	66,24±1,91 ***
АлАТ, Од/л	52,55±7,06	66,77±4,24 ***	113,60±10,26 ***	141,80±26,10 ***	72,54±6,86 ***
АсАТ, Од/л	147,9±69,9	171,7±15,7 ***	221,8±6,6 ***	303,9±15,1 ***	175,4±9,9 ***

на ступінь пошкодження мембран, що супроводжува-лося синдромом ендogenous інтоксикації.

Крім того, відомо, що незалежно від фактору, що ініціює реакції окиснення, відбувається зростання проникності мембран, яке призводить до ряду змін всередині клітини і завершується пошкодженням клітинних органел і виходом ферментів [1, 14].

Активність АлАТ в сироватці крові, уражених нітритом натрію тварин, збільшилася протягом усього експерименту: на 1-шу добу – на 27,1%, на 4-й день досліджу активність ферменту зростала на 116,2%, у порівнянні з групою інтактних тварин. Максимальне збільшення активності АлАТ було відмічено на 7-му добу і становило 169,8%. На 14-й день досліджу активність ферменту була знижена на 38%, відносно рівня контрольних щурів.

Аналогічну спрямованість змін зазнавав ще один цитозольний фермент печінки – АсАТ, активність якої у сироватці крові вірогідно збільшувалася на 16,1% на 1-шу добу експерименту і на 50,0% на 4-ту добу, відносно групи інтактних тварин. Найвищою активність вказаного ферменту була на 7-й день дослідження і становила 105,5% порівняно з інтактними щурами. Підвищення активності АсАТ протягом всіх термінів дослідження за абсолютною величиною було меншим, ніж АлАТ, хоча зміни виявилися вірогідними ($p < 0,001$). Ця відмінність між АлАТ і АсАТ, мабуть, пов'язана з тим, що перша знаходиться пе-

реважно в цитоплазмі клітин, і її підвищення віддзеркалює стан плазматичних мембран. АсАТ розміщена як в цитоплазмі, так і в мітохондріях і менша зміна її активності, очевидно, вказує на те, що використаний токсикант не викликав помітних змін зовнішніх мітохондріальних мембран.

Таким чином, отримані результати досліджень дають можливість стверджувати, що отруєння щурів нітритом натрію призводить до утворення продуктів, які спричиняють деструктивну дію на клітинні мембрани, чим поглиблюють розвиток ендogenous інтоксикації організму.

Висновки. Отже, наведені результати свідчать про те, що гостре отруєння організму щурів нітритом натрію призводить до посиленого метгемоглобіноутворення, активації процесів ліпопероксидації. Це супроводжувалося нагромадженням продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активних форм кисню, які викликають деструкцію мембран еритроцитів та гепатоцитів, що поглиблює розвиток ендogenous інтоксикації.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження процесів пероксидного окиснення ліпідів, ендogenous інтоксикації та функціонального стану плазматичних мембран у щурів за умов ураження нітритом натрію дозволить удосконалити ранню діагностику хімічних отруєнь та методи їх профілактики і корекції.

Література

1. Бакалюк О. Й. Синдром ендogenous інтоксикації, механізм виникнення, методи ідентифікації / О. Й. Бакалюк, Н. Я. Панчишин, С. В. Дзига // Вісник наук. досл. – 2000. – № 1. – С. 11–13.
2. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. – М.: Изд-во «Медицина», 1969. – 652 с.
3. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М., 1972. – 252 с.
4. Гоженко А. И. Причины и механизмы интоксикации нитратами (обзор) / А. И. Гоженко, В. С. Доренский, С. Г. Котюжинская // Мед. тр. и пром. экол. – 1996. – № 4. – С. 15–21.
5. Горячковский А. М. Справочное пособие по клинической биохимии / А. М. Горячковский. – Одеса: Ока, 1994. – 415 с.
6. Колесова О. Е. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О. Е. Колесова, А. А. Маркин, Т. Н. Федорова // Лабораторное дело. – 1984. – № 9. – С. 540–546.
7. Коршун М. М. Проблема комбінованої дії на організм пріоритетних хімічних забруднювачів ґрунту (огляд літератури) / М. М. Коршун // Довкілля та здоров'я. – 2002. – № 4 (23). – С. 51–56.
8. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич – К.: Морион, 2000. – 320 с.
9. Нариси вікової токсикології / за ред. І. М. Трахтенберга. – К.: Авіцена, 2005. – 256 с.
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. – 156 с.
11. Тогайбаев А. А. Способ диагностики эндogenous интоксикации / А. А. Тогайбаев, А. В. Кургузкин, И. В. Рикун, Р. М. Карибжанова // Лабораторное дело. – 1988. – № 9. – С. 22–24.
12. Фіра Л. С. Метаболічні порушення в організмі тварин, уражених нітритом натрію / Л. С. Фіра, Я. І. Гонський // Медична хімія. – 2003. – Т. 5, № 3. – С. 64–67.
13. Циганенко О. І. Нітрати в харчових продуктах / О. І. Циганенко. – К.: Здоров'я, 1990. – 231 с.
14. Чаплик В. В. До питання ендogenous інтоксикації / В. В. Чаплик, В. Г. Литвинчук // Експерим. та клін. фізіол. і біохімія. – 2006. – № 3. – С. 65–68.
15. Шугалей І. В. О токсическом действии нитрита натрия / И. В. Шугалей, И. В. Целинский, Т. В. Малинина // Гигиена и санитария. – 1991. – № 4. – С. 49–53.
16. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 56 p.

УДК 616-008.9-02:616-099:546.33'173

ДИНАМІКА МЕТАБОЛІЧНИХ ЗМІН В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ЗА УМОВ УРАЖЕННЯ НІТРИТОМ НАТРІЮ

Куліцька М. І.

Резюме. В експерименті на безпородних білих щурах-самцях досліджено вплив нітриту натрію на показники пероксидного окиснення ліпідів, ендogenous інтоксикації та функціональний стан плазматичних мембран у щурів в динаміці (1-а, 4-а, 7-а і 14-а доба). Встановлено, що гостра токсична дія нітриту натрію на організм

шурів призводить до посиленого метгемоглобіноутворення, активації процесів ліпопероксидації. Це супроводжується нагромадженням продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активних форм кисню, які викликають деструкцію мембран еритроцитів та гепатоцитів, що поглиблює розвиток ендогенної інтоксикації.

Ключові слова: пероксидне окиснення ліпідів, ендогенна інтоксикація, шурі, нітрит натрію.

УДК 616-008.9-02:616-099:546.33'173

ДИНАМИКА МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС ПРИ ПОРАЖЕНИИ НИТРИТОМ НАТРИЯ

Кулицкая М. И.

Резюме. В эксперименте на беспородных белых крысах-самцах исследовано влияние нитрита натрия на показатели пероксидного окисления липидов, эндогенной интоксикации и функциональное состояние плазматических мембран у крыс в динамике (1-е, 4-е, 7-е и 14-е сутки). Установлено, что острое токсическое действие нитрита натрия на организм крыс приводит к усиленному образованию метгемоглобина, активации процессов липопероксидации. Это сопровождается накоплением продуктов пероксидного окисления липидов и активных форм кислорода, которые вызывают деструкцию мембран эритроцитов и гепатоцитов, что углубляет развитие эндогенной интоксикации.

Ключевые слова: пероксидное окисление липидов, эндогенная интоксикация, крысы, нитрит натрия.

UDC 616-008.9-02:616-099:546.33'173

COURSE OF METABOLIC CHANGES IN RATS WITH UNDERLYING SODIUM NITRITE AFFECT

Kulitska M. I.

Abstract. The aim of the research was to study the influence of sodium nitrite on the course of lipid peroxidation rate, endointoxication and functional status of cell membranes in rats affected with sodium nitrite.

The experiments were made on 60 outbred male rats, 180-190 g in weight, which were kept on a standard vivarium diet. Acute toxic affect was simulated by a one intragastric sodium nitrite administration, dose 70 mg per kg of body weight. The experimental animals were divided into the following groups: the first group – intact rats (control group), the second group – rats affected with sodium nitrite. The rats were taken out of the experiment by depletion under thiopental sodium anaesthetic on the 1st, 4th, 7th and 14th days after the intoxication date. Whole blood, blood serum, liver homogenate were used in the research. All manipulations for experimental animals were carried out following the rules according to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

The lipid peroxidation rate was evaluated due to diene conjugates level and thiobarbituric acid substances content. The degree of endointoxication rate was determined by the percentage of intoxication erythrocyte index; the functional status of the cell membranes was determined by alanine and aspartate aminotransferase levels.

The digital results of the experiment were systematized and processed by means of variation statistics system using applications Excel Microsoft and Statsoft STATISTICA.

The results of the research showed that significant changes in the lipid peroxidation processes occurred with underlying acute nitrate intoxication. The concentration of diene conjugates in blood serum of rats after sodium nitrite intoxication increased: on the 1st day for 88.4% ($p < 0.001$), on the 4th day for 128.7% ($p < 0.001$), in comparison with intact groups of animals. On the next few days of the experiment the diene conjugates content decreased in comparison with the previous data. The thiobarbituric acid substances content in the blood serum increased the most on the 4th day of the experiment for 94.1% ($p < 0.001$) in comparison with the intact group of animals. In the liver of the poisoned rats the similar changes in the lipid peroxidation products content were observed. Toxic effects of sodium nitrite was manifested by methaemoglobin formation for 69.1% ($p < 0.001$) in 24 hours from the experiment beginning. On the 4th day the methemoglobin content was the highest (180.0%) in comparison with the control group. On the 7th and 14th days of the experiment, there was a slight decrease in this rate in comparison with the previous day. The study of the erythrocyte membrane permeability is one of the methods of endogenous intoxication diagnostic. On the 1st day of the experiment the intoxication erythrocyte rate increased for 60.3%, on the 4th day for 92.5%; on the 7th and 14th days of the experiment there was a slight decrease in intoxication erythrocyte rate. The results were consistent ($P < 0.001$), proving the erythrocyte membrane permeability increase with underlying sodium nitrite poisoning of rats. Obviously, this was caused by the reactive oxygen intermediates effect on the membrane; the reactive oxygen intermediates were caused by underlying body intoxication. The research results on cytosolic enzymes activity, alanine and aspartate transaminase, which was increasing during the experiment and increased the most on the 7th day of the experiment in comparison with the affected group of animals, evidenced the cell membranes structure violations and function disorders in cases of sodium nitrite effect. The content of cytosolic forms in blood serum and tissue extracellular was relatively low. Cell membranes affect or cell permeability increase caused the enzymes output out of cytosol, and their activity indicated the degree of membranes affection, causing the syndrome of endointoxication.

So, these results evidence that acute sodium nitrite poisoning leads to increased methemoglobin and lipid peroxidation with further accumulation of lipid peroxidation products and reactive oxygen intermediates that cause the red blood cell and hepatocytes membranes destruction, which develops the endointoxication.

Keywords: lipid peroxidation, endointoxication, rats, sodium nitrite.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 12.10.2015 року