

UDC 612.015.13/14:543.395:616-099-092.9

Maksymova I.G.

The Process of Protein Oxidative Modification and Lipid Peroxidation Activity in Rats under Prolonged Imidazoline Mixture Action

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine, e-mail: babuzjuk@mail.ru

Abstract The process of protein oxidative modification and lipid peroxidation activity in rats under prolonged exposure of widely distributed industrial chemical pollutants of environment - an imidazoline mixture were investigated in article to be necessary to disclose the biological mechanisms of their action. Sexually mature males rats of WAG subjected to oral administration of aqueous solutions of compounds once daily per 30 days in 1/10 and 1/100 DL50 doses by probe. Spectrophotometric and chemiluminescent methods at 30 th day of experiments determined the content of neutral and basic aldehyde- and ketondinitrofenilhydrazones in hemolysated erythrocytes, induced by hydrogen peroxide level chemiluminescence intensity and TBA-active products in the blood serum, liver homogenate and brain. Mixtures of imidazolines with alkyl radicals S7-9 and S9-15 on 30 th day of exposure by 1/10 and 1/100 DL50 doses were led to statistically significant all the studied parameters increase relatively to control. Imidazoline mixture with alkyl radicals S7-9 is proved to be mostly toxic. The getting results suggest the oxidative stress with the destruction of protein and lipid molecules development in rats under prolonged intoxication by imidazoline-containing mixtures. Changes in activity of protein oxidative modification and lipid peroxidation processes are one of the pathogenic mechanisms of biochemical imidazoline-containing mixtures links should be considered during the developing the means of correction.

Key words: imidazoline mixtures, rats, dinitrophenylhydrazones, TBA-active products, chemiluminescence intensity.

Recently, humans organisms are increasingly exposed to significant amounts of chemicals coming from different environmental objects. In most cases, their impact negatively reflected on human health, prompting experts to conduct research aimed at disclosure of metabolic disorders in order to develop means of pathochemical change prevention and correction [1, 2]. Imidazolines mixtures (MIM) belong to wide industrial chemical environmental pollutants characterized by relatively large volumes of chemicals, frequently used in various sectors of the economy (as a basis for industrial production of detergents, antistatic, anticorrosive agents, adhesive additives, etc.), revenues sources of drinking water and thus the possible impact on human health [10-12]. The action of many chemical factors on the body is proved to lead to oxidative stress, based on the increased formation of free radicals able to interact with lipids, amino acids, modified proteins, forming primary products of oxidation and reactive carbonyl intermediates [6]. The latter can undergo detoxification involving antioxidants or form secondary products, which, as a source of reactive oxygen species cause oxidation of proteins and lipid membranes, leading to non-specific changes in their structure and functions [3, 4]. State of oxidative metabolism under conditions of prolonged exposure MIM especially its consideration is necessary for full disclosure mechanisms of the body and develop means of correction studied insufficiently.

The aim of the study was to investigate the process of protein oxidative modification and lipid peroxidation activity in rats at the 30 th day imidazoline mixture in 1/10 and 1/100 DL50 doses influence.

Work is carried out in the framework of KhNMU research "Biochemical mechanisms of dismetabolic processes under conditions of chemical environmental factors" (state registration number 0115U000240).

Material and methods of research

The paper uses examples from MIM with alkyl radicals S7-9 (MIM7-9) and S9-15 (MIM9-15). Experiments conducted on mature male rats line WAG, weight (180-220) g Alimentation and manipulation with animals carried out according to the principles of bioethics. They were subjected to oral administration of aqueous solutions of compounds once daily per 30 days in 1/10 and 1/100 DL50 doses using

probe. Medium lethal dose (DL50) was: for MIM7-9 - 1.8 g / kg; MIM9-15 - 5.0 g / kg of body weight. The animals of the control group was administered the correspondent amounts of drinking water. The study of parameters performed 30 days after the experiment began. Slaughter was performed by decapitation, after anesthesia by sodium thiopental. Evaluation of oxidative modification of proteins in red blood cells hemolysate was conducted by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine at 356 nm (aldehyde group neutral), 370 nm (ketone group neutral), 430 nm (the basic aldehyde group) and 530 nm (basic ketone group) [5]. Red blood cells were separated from plasma by heparin stabilized blood centrifugation per 15 minutes at 3000 g (final dilution heparin / whole blood - 1: 100). Induced by H₂O₂ chemiluminescence (CL) intensity of blood serum, brain homogenates and liver were recorded on chemiluminometer HLMITS-01. Design and processing of measurement results was performed using the program Excel, the carrier of received information was CL curve fixed on a tape recorder. The level of TBA-active products in the blood serum, liver homogenate and brain were evaluated by spectrophotometer at 532 nm by trimethylene complex formed in the reaction between malondialdehyde and tiobarbituric acid [9]. The liver tissue homogenate got by sample crushing and homogenization in the cold per 1-2 minutes using a glass Potter homogenizer with teflon pestle in a refrigerated medium (0.25 M sucrose solution, which was prepared in 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 with the addition of 1 mM EDTA); the ratio of tissue / medium (weight / volume) was 1 g / ml 9. Brain homogenate was prepared similarly but with the selection medium were 0.32 M sucrose 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4.

Statistical analysis was performed by using the computer application package for statistical data processing Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., USA). Parametric characteristics - the average indicator (M) and standard deviation (s) are used in the case of the normal data distribution; in his absence nonparametric - median (Me) and interquartile scope. p<0,05 was accepted as the critical level of significance during statistical hypotheses testing.

Results and discussion

The increase ($r \leq 0,005$) of aldehyde-dinitrofenilhidrazoniv (DNFH) neutral (356 nm) and basic (430 nm) according to nature 28 and 131%, and the level of ketone-neutral DNFH (370 nm) and basic (530 nm) - respectively 109 and 54% (Table. 1) were observed compared with the control in erythrocytes of rats at the 30 th day of action at a dose MIM7-9 1/100 DL50. Prolonged exposure by MIM9-15 was accompanied by less distinct changes: the content of neutral aldehyde group increased only on 15% ($p=0,007$) against the background of basic - 36% ($p < 0,001$), and the content of neutral ketone groups increased by 57% ($p < 0,001$). The MIM9-15 influence on the level of basic ketone-DNFH was unreliable ($p = 0,17$).

The results suggest accumulation in rat erythrocytes of carbonyl-modified proteins mainly due to fixed-DNFH aldehyde and ketone-neutral DNFH. The free radical oxidation products

Table 1. Content aldehyde- and ketondinitrophenylhydrazones in rat erythrocyte hemolysate after 30 days exposure by imidazoline-containing organic compounds in a 1/100 DL50 dose (un. opt. density/mg of protein, n=15; Me [25%; 75%] or M±s)

Mixture	356 nm	370 nm	430 nm	530 nm
MIM7-9	0,73 [0,63; 0,78] $p=0,005$	0,96±0,084 $p<0,001$	0,83±0,044 $p<0,001$	0,043 [0,031; 0,050] $p=0,002$
MIM9-15	0,67±0,082 $p=0,007$	0,72±0,178 $p<0,001$	0,49±0,082 $p<0,001$	0,032 [0,024; 0,043] $p=0,17$
Control	0,57±0,134	0,46±0,079	0,36 [0,33; 0,39]	0,028±0,0064

Note: p – level of significance compared with control

Table 2. Intensity of hydrogen peroxide induced chemiluminescence of blood serum and homogenates of the internal organs of rats after 30 days imidazoline-containing organic compounds exposure (imp/s, n=15; Me [25%; 75%] or M±s)

Mixture	Dose, DL50	Blood serum	Brain	Liver
MIM7-9	1/10	1126 [990;1303] p<0,001	1035 [877;1088] p<0,001	1255±1158 p<0,001
	1/100	965±130 p<0,001	820 [647; 920] p<0,001	1189 [1016; 1256] p<0,001
MIM9-15	1/10	1056 [985;1124] p<0,001	900 [747; 965] p<0,001	1200 [1100;1324] p<0,001
	1/100	814 [710; 1045] p=0,007	693±168 p=0,003	1056 [890; 1086] p=0,005
Control		690±128	588 [477; 623]	845±182

Note: * - p<0,05 relatively to control

of lipids, proteins acting as strong oxidants can contribute in increase their level. On the other side, the significant change in functional activity occurs in oxidatively modified protein, they are degraded by proteolytic enzymes and parallelly can serve as a source of free radicals [8].

The statistically significant compared to the control, differences of blood serum brain homogenate and liver CL in experimental and control animals (Table. 2) were observed at the 30 th day of action MIM in 1/10 and 1/100 DL50 doses. Thus, MIM7-9 and MIM9-15 at a 1/10 DL50 dose increase (p<0.001) intensity of chemiluminescence respectively 63 and 53% in blood serum. Mixture in a 1/100 DL50 dose action accompanied by less expressive effect: for MIM7-9 - 40% (p<0.001), and MIM9-15 - only 18% (p = 0.007). Increase (r<0,003), relatively to control CL intensity, was also recorded in the brain: 76 and 53% in the case of MIM7-9 action in 1/10 and 1/100 DL50 doses; 39 and 18% - in the case of MIM9-15 action. The same CL intensity dynamic was observed in rat liver: an average increase of 45% in terms of MIM impact in 1/10 DL50 dose and 33% - in a 1/100 DL50 dose. It should be noted that chemiluminograms of control animals, compared with experimental, showed slower recovery and fewer low light-sum of impulses. This indicates the presence of small number of peroxide compounds and antioxidants that are in equilibrium. Chemiluminograms of animals injected MIM, oppositely, showed a steep climb and a high second peak luminescence was not found. According to the literature [7], this gives reason to suppose the accumulation of lipid peroxidation (LPO) products in rats under prolonged exposure by MIM on the background of decreased activity of antioxidant system.

Quantitative determination of malone dialdehyde, which reacts with tiobarbituric acid (TBA), forming a complex of active ingredients is widely used to evaluate the intensity of lipid peroxidation. TBA-active products are obtained as reliable markers of oxidative stress, tissue damage and severity of endogenous intoxication [6]. Results showed an increase (p<0,001) of TBA-active products under long-term MIM7-9 in a 1/10 DL50 dose, 83% serum, 75% in the brain and most significantly - by 217% - in the liver of rats (Table. 3), compared to control levels. As for the MIM7-9 action in a 1/100 DL50 dose, the significant changes were observed in serum (increase by 61%, p = 0.001) and liver (117%, p<0.001). MIM9-15 effect in a 1/10 DL50 dose at the 30th day also led to an increase (r<0,001) content of TBA-active products in the blood serum, brain and liver of rats, but clearly less than MIM7-9 action: on 70, 63 and 100% respectively. Prolonged MIM9-15 exposure in a 1/100 DL50 dose was accompanied by statistically significant (p = 0.005), relatively to controls, increase levels of TBA-active products only in blood serum (35%). The comparison index distribution in the brain, liver research and control animals to each other did not show any statistically significant difference (p = 0.32 and p = 0.125).

The summarizing of the results shows that prolonged intoxication

Table 3. The content of TBA-active products in the blood serum and homogenate of internal organs of rats after 30 days imidazoline-containing organic compounds exposure (n=15; Me [25%; 75%] or M±s)

Mixture	Dose, DL50	Blood serum, μmol/L	Brain, nmol/mg of protein	Liver, nmol/mg of protein
MIM7-9	1/10	4,2 [3,3; 5,5] p<0,001	1,4 [0,9; 2,0] p<0,001	1,9 [1,2; 2,4] p<0,001
	1/100	3,7±1,18 p=0,001	1,0±0,27 p=0,062	1,3 [0,9; 1,7] p<0,001
MIM9-15	1/10	3,9±1,21 p<0,001	1,3 [0,9; 1,6] p=0,001	1,2±0,29 p<0,001
	1/100	3,1±0,87 p=0,005	0,9±0,31 p=0,32	0,8±0,31 p=0,125
Control		2,3±0,56	0,8±0,23	0,6 [0,4; 0,8]

Note: * - p<0,05 relatively to control

by MIM in 1/10 and 1/100 DL50 doses initiate processes of oxidative stress with the destruction of protein and lipid molecules displayed increased intensity of CL, content of TBA-active products, dinitrophenylhydrazones. In turn, products of protein oxidative modification and lipid peroxidation due to high reactogenic capacity and selectivity of biological action can serve as the primary link, limiting state resistance to prolonged exposure to MIM by changing physical and chemical characteristics of cell membranes, membrane-bound enzyme activity and receptor complexes.

Summarizing the results, the following conclusions

1. Processes of oxidative stress with the destruction of protein and lipid molecules are initiated among prolonged toxicity by MIM in 1/10 and 1/100 DL50 doses in rats, as evidenced by increased levels of chemiluminescence intensity, the content of TBA-active products and dinitrophenylhydrazones.
2. Changes in activity of protein oxidative modification and lipid peroxidation process are one of the pathogenetic links of biochemical mechanisms of MIM action that must be considered during the means of correction developing.

Perspectives further research

In future the complex research conduction is planned aimed to study the biochemical mechanisms of MIM, including evaluation of antiradical activity and antyperoxide protection.

Literature

1. Amanzhol I.A. The organism reaction on the harmful industrial factor action: evaluation of professional risk / I.A. Amanzhol, Z.T. Muhametzhanova, D.S. Abitayev. – Lambert Academic Publishing, 2013. – 116 p.
2. Xenobiotics: accumulation, detoxification and excretion from living organisms / [B.O. Tsudzevych, O.B. Stolyar, I.V. Kalinina et al.]. – Ternopil: Publisher TNTU n. I. Pulyui, 2012. – 384 p.
3. Novikov K.N. The free-radical processes in biological systems under the influence of environmental factors / K.N. Novikov, S.V. Kotelevtsev, Yu.P. Kozlov. – M.: RPFU, 2011. – 199 p.
4. Oxidative modification of proteins: problems and perspectives study / L.Ye. Muravleva, V.B. Molotov-Luchanskiy, D.A. Klyuyev [et al.]. // Fundamental research. – 2010. – № 1 – P. 74-78.
5. Oxidative modification of proteins of human serum, the method of its determination / Ye.Ye. Dubinina, S.O. Burmistrov, D.A. Hodov [et al.] // Questiona of medical chemistry. – 1995. – V. 41, № 1. - P. 24-26.
6. Oxidative stress: pathological states and diseases / [Ye.B. Menshikova, N.K. Zenkov, V.Z. Lankin et al.]. – M.: ARTA, 2008. – 284 p.
7. Rezenenko Yu.K. Analysis of serum and liver of white mice biochemiluminescence intensity under conditions of lethal doses of xenobiotics influence / Yu.K. Rezenenko, V.I. Zhukov, V.O. Prokopov // Scientific Bulletin n. O.O. Bogomolets. - № 4. – 2011. – P. 40-43.
8. The toxicological effects of oxidative modification of proteins in various pathological conditions (review) / Yu.I. Gubskiy, I.F. Belenichev, S.V. Pavlov [et al.] // Modern problems of toxicology. - 2005. - № 3. - P. 20-26.

9. Fedorova T. N. Reaction with thiobarbituric acid to determine blood malone dialdehyde by fluorometry / T. N. Fedorova, T. S. Korshunova, E. G. Larskiy // Laboratory Work. - 1983. - № 3. - P. 25-28.

10. Ecological and hygienic characteristics of nitrogen-containing surface-active substances such as pollutants of water bodies / [V.I. Zhukov, V.V. Myasoyedov, S.A. Stetsenko et al.]; ed. V.I. Zhukov – Kh. : Tornado, 2000. – 180 p.

11. Bajpai D. Fatty imidazolines, chemistry, synthesis, properties and their industrial application / D. Bajpai, V.K. Tyagi // Journal of Oleo Science. – 2006. – Vol. 55, № 7. – P. 319-329.

12. Tyagi R. Imidazoline and its derivatives: an overview / R. Tyagi, V.K. Tyagi, S.K. Pandey // Journal of Oleo Science. – 2007. – Vol. 56, № 5. – P. 211-222.

Максимова І.Г.

Активність процесів окислювальної модифікації білків та перекисного окислення ліпідів у щурів при тривалій дії сумішей імідазолінів

Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна, e-mail: babuzjuk@mail.ru

Резюме. У роботі досліджено активність процесів окислювальної модифікації білків та перекисного окислення ліпідів у щурів за умов тривалого впливу розповсюджених промислових хімічних забруднювачів довкілля - сумішей імідазолінів, що є необхідним для розкриття механізмів їхньої біологічної дії. Статевозрілі щури-

самці лінії WAG піддавалися пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами сумішей щоденно одноразово протягом 30 днів у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50. Спектрофотометричним і хемілюмінесцентним методами на 30-ту добу експериментів визначалися вміст альдегід- і кетондинітрофенілгідразонів нейтрального та основного характеру у гемолізаті еритроцитів, інтенсивність індукованої перекисом водню хемілюмінесценції та рівень ТБК-активних продуктів у сироватці крові, гомогенаті печінки та головного мозку. Суміші імідазолінів з алкільними радикалами C₇₋₉ і C₉₋₁₅ на 30-ту добу впливу у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 призводили до статистично значущого, по відношенню до контролю, підвищенню всіх досліджуваних показників. Найбільш токсичною виявилася суміш імідазолінів з алкільним радикалом C₇₋₉. Отримані результати свідчать про розвиток в організмі щурів за умов тривалої інтоксикації імідазолінвмісними сумішами окислювального стресу з деструкцією білкових і ліпідних молекул. Зміни активності процесів окислювальної модифікації білків і перекисного окислення ліпідів є однією з патогенетичних ланок біохімічних механізмів дії імідазолінвмісних сумішей, що необхідно враховувати при розробленні засобів їх корекції.

Ключові слова: суміші імідазолінів, щури, динітрофенілгідразони, ТБК-активні продукти, інтенсивність хемілюмінесценції.

Received 22.06.2015.

УДК 612.751.1 : 577.118: 616-089.583.29] 578.08

Малишкіна С.В.¹, Пошелок Д.М.¹, Нікольченко О.А.¹, Вельямінова В.В.¹, Батурін О.А.², Фоміна Л.П.²

Мінеральний склад компактної кістки у щурів після змодельованої легкої гіпотермії

¹ – Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України», Харків, Україна

² – Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Харків, Україна

E-mail: s_malysh@ukr.net

Резюме. Остеотропні макро- та мікроелементи є важливими структурними складовими кісткової тканини, а також компонентами макромолекул, які регулюють біоорганічні взаємодії. Порушення їхнього балансу з віком та під дією різних несприятливих факторів (зокрема, холодого впливу, який спричинює гіпотермію організму) призводять до структурних змін у кістках та розвитку такого захворювання як остеопороз. **Мета роботи:** дослідити вміст макро- та мікроелементів у компактній кістці щурів різного віку після змодельованої легкої гіпотермії. **Матеріали та методи.** Рентгеноспектральним флуоресцентним методом аналізували вміст макроелементів (Ca, P, Mg) та мікроелементів (Zn, Fe, Cu) у діафізах стегнових кісток щурів 6- та 24-місячного віку після гіпотермії організму внаслідок холодого впливу (перебування тварин у холодовій камері при температурі - 20°C впродовж 5 днів по 5 годин на добу). **Результати.** Встановлено, що у 6-місячних щурів на 14 добу після легкої гіпотермії порівняно з контролем спостерігався більший вміст фосфору (на 6,5 %) і менший показник співвідношення Ca/P (на 9,1 %), а на 28 добу ці показники та вміст інших мінеральних елементів (Mg, Zn, Fe, Cu) не відрізнялися від контрольних. У 24-місячних щурів на 14 добу після гіпотермії на відміну від контролю виявлено збільшений вміст фосфору (на 9,9 %), магнію (на 12 %), заліза (на 36 %) та зменшений показник співвідношення Ca/P (на 8,4 %). На 28 добу вміст фосфору перевищував контрольний показник на 11,3 %, а співвідношення Ca/P було меншим на 5,1 %. Показник вмісту магнію залишався високим порівняно з контролем (на 9,3 %), і не відрізнявся від показника на 14 добу. Зафіксовано зниження на 68 % вмісту заліза порівняно з 14 добою, і не виявлено відмінностей від контролю. Достовірних відмінностей показників вмісту цинку та міді щодо 14 доби і контрольних тварин не встановлено. **Висновок.** Гіпотермія призводить до дисбалансу макро- та мікроелементів у компактній кістці, який більш виражений у 24-місячних щурів.

Ключові слова: макроелементи, мікроелементи, стегнова кістка, гіпотермія, щури.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Особливості перебудови кістки в умовах дії різних несприятливих факторів становлять собою фундаментальну проблему біології та медицини [8, 14]. Остеотропні макро- та мікроелементи є важливими структурними складовими кісткової тканини, а також компонентами макромолекул, які регулюють біоорганічні взаємодії. Саме мінеральна складова кісткового матриксу відповідальна за складну архітектуру кістки. Дослідженнями встановлено, що макро- та мікроелементний склад кісткової тканини неоднаковий у різних кістках скелету та змінюється з віком, а також під впливом різних фізичних та хімічних факторів навколишнього середовища [3, 4, 9, 10]. В літературі є дані про негативний вплив гіпотермії на структурну організацію губчастої і компактної кісток, а також наведені результати досліджень про значні деструктивні зміни у кістковому матриксі, який містить мінеральні компоненти [1, 6]. Але робіт, в яких би вивчали макро- та мікроелементи у відновному періоді після змодельованої легкої гіпотермії у тварин, ми не знайшли.

Мета роботи: дослідити вміст макро- та мікроелементів у компактній кістці щурів різного віку після змодельованої легкої гіпотермії.

Матеріал і методи дослідження

В експерименті використано 48 нелінійних білих щурів-самців 6- та 24-місячного віку. Дослідних тварин (24 щури) піддавали впливу холоду, утримуючи їх впродовж 5 днів в окремих секціях холодової камери при температурі “20°C щодобово по 5 годин (з 10⁰⁰ до 15⁰⁰). Щури контрольних груп (24 тварини) знаходились при кімнатній температурі 18-22°C. Температуру тіла щурів вимірювали медичним електронним термометром МТ-3001 ректально. Наприкінці експерименту температура тіла у щурів молодого віку