

Резуенко Ю.К.,
Жуков В.І.,
Прокопов В.О.

АНАЛІЗ ІНТЕНСИВНОСТІ БІОХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ СИРОВАТКИ КРОВІ ТА ПЕЧІНКИ БІЛИХ МИШЕЙ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ЛЕТАЛЬНИХ ДОЗ КСЕНОБІОТИКІВ

Харківський національний медичний університет

Одним з пріоритетних завдань у санітарно-гігієнічних дослідженнях є не тільки регламентація хімічних забруднювачів довкілля за умов зростаючого антропогенного навантаження, але й оптимізація та удосконалення заходів щодо його охорони на основі комплексного наукового аналізу і пошуку інформативних показників оцінки здоров'я населення. Незважаючи на наявність великої кількості наукових робіт, присвячених вивченню різних аспектів дії промислових органічних хімічних речовин на об'єкти довкілля, організм людини й тварин, проблема охорони від їх негативного впливу залишається надзвичайно гострою [1, 3, 4]. Перш за все це пов'язано зі збільшенням синтезу та впровадженням нових груп сполук, які знаходять широкого кола застосування. До числа останніх відносяться прості та макроциклічні ефіри, оксиетильовані алкілфеноли, які характеризуються великим об'ємом синтезу, широким використанням у різних галузях народного господарства та побуті як основа промислового випуску пластмас, пінопластів, епоксидних смол, лаків, поліуретанів, миючих засобів, емульгаторів, антикорозійних і бактерицидних препаратів, флоторегентів, гідравлічних, гальмівних та охолоджуючих речовин тощо [9]. Останнім часом широке використання у медичних дослідженнях отримав біохемілюмінесцентний (БХЛ) метод, який характеризується високою чутливістю, експресністю, вибірковістю для кількісних вимірювань та значною інформативністю для якісної характеристики параметрів [6].

Метою дослідження було проведення аналізу інтенсивності біохемілюмінесценції сироватки крові та печінки білих мишей протягом середньо-ефективному часу загибелі за умов впливу LD100 різних ксенобіотиків.

Робота виконана у рамках науково-дослідної роботи Харківського національного медичного університету "Вивчення механізмів біологічної дії простих поліефірів у зв'язку з проблемою охорони навколишнього середовища" (номер держреєстрації 0110U001812).

Матеріали та методи. Експерименти з використанням БХЛ методу вважали доцільним провести на речовинах, які суттєво відрізняються за хімічною структурою, природою, ступенем токсичності. У роботі використано зразки промислових хімічних речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: макроциклічний ефір 15-краун-5 (МЕ-15K5) – 1, 4, 7, 10, 13 – пентаоксаціклопентадекан, оксиетильований алкілфенол на основі тримерів пропілену (ОЕАФ 9-10), монометилловий ефір етиленгліколю (ММЕЕГ), поліетиленоксид – поліол-402-2-100 (П-402). Експерименти проведено на стате-возрілих білих мишах-самцях масою (20–23) г. Проведення процедур з експериментальними тваринами здійснено згідно з вимогами Державного комітету з етики. Тварини утримувалися у стаціонарних умовах віварію за постійної температури та природного освітлення [7]. Їх піддавали одноразово пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин у дозі LD100, що відповідно складало для МЕ-15K5 – 3,0 г/кг, ОЕАФ 9-10 – 5,5 г/кг, ММЕЕГ – 2,5 г/кг, П-402 – 60,0 г/кг маси. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми води. Інтенсивність БХЛ сироватки крові та гомогенатів печінки тварин реєстрували на медичному хемілюмінометрі ХЛМ1Ц-01. Принцип БХЛ методу базується на вимірюванні інтенсивності надслабкого світіння біологічного матеріалу в області спектра 400–600 нм, що виникає внаслідок хемілюмінесцентних реакцій [5, 8]. Чутливість хемілюмінометру складала не менш 0,005 імп/квант; відносна погрішність вимірювань – $\pm 3,5\%$ за нормальних умов, спектральний діапазон випромінювання – 400–600 нм. Обробку та оформлення результатів вимірювань проводили з використанням програми Excel, носієм отриманої інформації була крива БХЛ, записана на стрічці самописця. Реєстрували кінетичні залежності інтенсивності спонтанного світіння I (імп/с) від часу для кожної речовини. Час спостереження відповідав середньо-ефективному часу загибелі тварин (ET50), який відповідно складав для МЕ-15K5, ОЕАФ 9–10,

ММЕЕГ і П-402 – 1,4; 11,6; 20,1 і 31,8 год. Інтенсивність БХЛ сироватки крові дослідних груп тварин порівнювали з інтенсивністю світіння сироватки крові контрольної групи. Статистичний аналіз цифрового матеріалу здійснювали за допомогою комп'ютерного пакета для обробки й аналізу статистичної інформації Statistica 6.0 [2]. Для перевірки гіпотез щодо рівності генеральних середніх двох незалежних, незв'язаних вибірок використовували t-критерій Стюдента з попередньою перевіркою нормальності розподілу варіант. Визначали середнє арифметичне варіаційного ряду (M) і середню помилку середнього арифметичного (m). Відмінності між двома вибірками вважали достовірними, якщо імовірність випадкової різниці не перевищувала 0,05 (p<0,05).

Результати та їх обговорення. У таблиці 1 представлені результати інтенсивності БХЛ сироватки крові та печінки білих мишей в динаміці спостереження від моменту введення речовин у LD100 до загибелі тварин з урахуванням ET50. Фонове світіння при цьому складало від 50 до 150

імп/с. Звертає увагу, що при цьому всі криві інтенсивності БХЛ мали характерний максимум з наступним спадом протягом середньоефективного часу загибелі тварин до фонових значень. Крім того, максимальна інтенсивність світіння спостерігалася через деякий час, характерний для кожної речовини.

Так, дія ME-15K5 у дозі LD100 призводила до максимального підвищення інтенсивності БХЛ сироватки крові та печінки через 12 хвилин від моменту перорального введення. Максимальне значення інтенсивності світіння збільшувалося, порівняно з контролем, для сироватки крові та печінки на 100% і 58% відповідно. Через 24, 36, 48 і 60 хвилин рівні надслабкого світіння поступово знижувалися до фонових, при цьому на 42 та 24-й хвилині дорівнювали значенням контролю. Мінімальні значення інтенсивності БХЛ для сироватки крові та печінки реєструвалися вже на 55-й хвилині спостереження, тоді як рівні в контролі залишалися незмінними.

Подібна динаміка інтенсивності БХЛ відзначалася й у тварин, яким вводили ОЕАФ 9-10, од-

Таблиця 1

Інтенсивність біохемілюмінесценції сироватки крові та печінки білих мишей за дії LD100 досліджуваних ксенобіотиків (M±m, n=10)

Речовина	Час спостереження, год	Інтенсивність біохемілюмінесценції, імп/с	
		сироватка крові	печінка
Контроль		635±29	1143±44
Макроциклічний ефір 15-краун 5	0,2	1419±54*	1803±79*
	0,4	1158±63*	1146±57
	0,6	835±36*	917±64*
	0,8	272±19*	353±29*
	1,0	74,3±7,1*	111±14*
Оксиетильований алкілфенол 9-10	1,0	1434±59*	1817±123*
	3,0	937±60*	1309±74*
	6,0	685±47	578±38*
	9,0	326±31*	391±34*
	12,0	77,1±8,4*	122±11*
Монометилловий ефір етиленгліколю	1,5	1566±150*	1846±86*
	3,0	1244±78*	1530±71*
	6,0	976±54*	1135±60
	9,0	780±46*	951±45*
	12,0	245±12*	560±37*
Поліол 402	15,0	73,4±2,5*	131±16*
	5,0	1480±60*	1685±66*
	10,0	1106±73*	1206±52*
	15,0	716±55	754±44*
	20,0	302±49*	471±33*
	25,0	88,6±4,3*	112±15*

Примітка: * - p<0,05 відносно контролю

нак строки її підйому і спаду укладалися в більш широкий часовий діапазон, а саме від 1 до 12 годин. Максимальні рівні в сироватці крові та печінці рееструвалися через одну годину від моменту введення речовини. Через 3, 5 і 6 годин інтенсивність досягала контрольних значень, а через 12 і 6 – знижувалася до мінімальних значень, які відповідали рівням фонових показників.

Для ММЕЕГ відзначалося досягнення максимального значення інтенсивності БХЛ через 1,5 години. На 6, 9, 12 та 15-ту годину інтенсивність знижувалася. Приблизно через 13 і 9 годин інтенсивність БХЛ сироватки крові та печінки досягала контрольних значень, а через 15 годин рівень БХЛ знижувався до фонових показників.

У тварин, яким вводили П-402 у LD100, високі рівні БХЛ сироватки крові та печінки відзначалися на п'ятій годині спостереження. На 10, 15 та 20-ту годину інтенсивність значно знижувалася, досягаючи контрольних значень на 16 і 11-ту годину відповідно для сироватки крові та печінки, а на 25-ту годину спостереження вже дорівнювала 89 і 112 імп/с, що відповідало фоновим.

Для більш наочного подання отриманих результатів було розраховано коефіцієнти нормування I_n – співвідношення інтенсивності БХЛ у досліді I до інтенсивності БХЛ у контролі I_k . За дії LD100 речовин динаміка зміни інтенсивності БХЛ сироватки крові та печінки білих мишей мала різний характер. Так, кожна речовина характеризувалася характерною для неї швидкістю наростання та падіння відповідних областей кінетичних кривих, що можна продемонструвати величиною тангенсів кутів нахилу ($tg\alpha$ і $tg\alpha^*$); різним часом, через який спостерігалася максимальне значення інтенсивності (t_m); різним часом виходу кривих на контрольне значення (t_k); різною світлосумою світіння до виходу на контроль ($S_k = I_n/t_k$) (табл. 2). Найбільшу швидкість

наростання та спаду, найменший час досягнення максимального і контрольного значень інтенсивності БХЛ, найменшу світлосуму світіння, порівняно з іншими речовинами, мав МЕ-15К5.

Детальний аналіз інтенсивності БХЛ, строків максимального підйому та спаду її рівнів на даному етапі досліджень свідчить, що кожна речовина має свої токсикокінетичні та токсикодинамічні особливості впливу на організм тварин. У всіх випадках за умов дії абсолютно летальної дози LD100 спостерігаються наступні події: виникнення стрес-реакції (підвищення інтенсивності БХЛ) – активація захисно-компенсаторних процесів – поступовий їх зрив (падіння інтенсивності БХЛ) – загибель тварин.

Узагальнюючи отримані результати, можна зробити наступні висновки.

1. Різде зниження інтенсивності біохемілюмінесценції до рівня контролю і значно нижче з наступним наближенням до фонових показників є прогностично несприятливою ознакою і свідчить про 100% загибель тварин в умовах токсифікації організму.
2. Інтенсивність біохемілюмінесценції сироватки крові можна розглядати не тільки як показник активності вільнорадикальних процесів в організмі, але й як інтегральний показник оцінки ступеня отруєння за умов впливу шкідливих хімічних факторів у летальних дозах.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується провести комплекс досліджень, спрямованих на оцінку інтенсивності БХЛ сироватки крові теплокровних тварин за дії інших доз речовин, а саме LD50, 1/2 LD50, 1/5 LD50, 1/10 LD50 та обґрунтування доцільності застосування біохемілюмінесцентного методу при нормуванні промислових хімічних речовин в об'єктах довкілля.

Таблиця 2

Показники, що характеризують динаміку змін інтенсивності біохемілюмінесценції сироватки крові білих мишей за умов впливу LD100 досліджуваних ксенобіотиків

Речовина	LD 100 г/кг	$tg\alpha$	$tg\alpha^*$	t_m год	t_k год	S_k ум. од	ET 50 год
Макроциклічний ефір 15-краун-5	3,0	11,27	5,0	0,2	0,7	0,2	1,4±0,11
Оксиетильований алкілфенол 9-10	5,5	2,31	0,5	1,0	6,0	1,5	11,6±1,1
Монометилловий ефір етиленгліколю	2,5	1,66	0,3	1,5	10,0	4,5	20,1±1,4
Поліол 402	60,0	0,47	0,2	5,0	16,5	4,8	31,8±1,6

АНАЛИЗ ИНТЕНСИВНОСТИ БИОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ПЕЧЕНИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЛЕТАЛЬНЫХ ДОЗ КСЕНОБИОТИКОВ

Резуненко Ю.К., Жуков В.И., Прокопов В.А.

Резюме. Целью данной работы была оценка интенсивности биоchemиллюминесценции сыворотки крови и печени белых мышей на протяжении среднеэффективного времени гибели в условиях воздействия летальных доз промышленных химических загрязнителей окружающей среды: макроциклического эфира 15-краун-5 ($LD_{100}=3,0$ г/кг), оксиэтилированного алкилфенола 9-10 ($LD_{100}=5,5$ г/кг), монометилового эфира этиленгликоля ($LD_{100}=2,5$ г/кг), полиола 402 ($LD_{100}=60,0$ г/кг). Установлено, что все кривые интенсивности биоchemиллюминесценции на протяжении среднеэффективного времени гибели животных имеют характерный максимум с последующим спадом до контроля и приближением к фоновым показателям. Наибольшую скорость нарастания и падения, наименьшее время достижения максимального и контрольного значений интенсивности биоchemиллюминесценции, наименьшую светосумму свечения, по сравнению с другими веществами, имеет макроциклический эфир 15-краун-5. Полученные результаты свидетельствуют о возможном применении биоchemиллюминесцентного метода для экспресс-оценки острой токсичности новых групп ксенобиотиков.

Ключевые слова: ксенобиотики, летальная доза, среднеэффективное время гибели животных, интенсивность биоchemиллюминесценции.

ANALYSIS OF BIOCHEMILUMINESCENCE INTENSITY OF BLOOD SERUM AND LIVER OF WHITE MICE UNDER THE INFLUENCE OF LETHAL DOSES OF XENOBIOTICS

Resunenko U.K., Zhukov V.I., Prokopov V.O.

Abstract. The objective of the present research was the investigation of biochemiluminescence intensity of blood serum and liver of white mice during the median effective time of death under the influence of lethal doses of industrial chemical environmental pollutants: macroheterocyclic crown-ether 15-crown-5 ($LD_{100}=3,0$ g/kg), oxyethylated alkylphenol 9-10 ($LD_{100}=5,5$ g/kg), ethylene glycol monomethyl ether ($LD_{100}=2,5$ g/kg), polyol 402 ($LD_{100}=60,0$ g/kg). The given compounds are characterized by great amounts of their production, their wide application with the possible negative influence on human health. Established that all the curves of biochemiluminescence intensity during the median effective time of death of the animals have a characteristic maximum with a subsequent drop to the control and the approach to background rates. The highest rate of rise and fall, the smallest time to reach maximum and control values of biochemiluminescence intensity, the lowest light sum emission, as compared with other substances, has a macrocyclic ether 15-crown-5. The obtained results show the possible application of the biochemiluminescence method for rapid assessment of acute toxicity of new groups of xenobiotics.

Key words: xenobiotics, lethal dose, median effective time of death of the animals, biochemiluminescence intensity.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белозерова С.М. Особенности формирования заболеваемости в условиях индустриального труда и новых технологий / С.М. Белозерова // Медицина труда и промышленная экология. - 2011. - № 3. - С. 13-19.
2. Боровиков В.А. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере / В.А. Боровиков. - СПб.: Питер, 2003. - 688 с.
3. Пнатейко О.З. Екогенетичні аспекти патології людини, спричиненої впливом шкідливих факторів зовнішнього середовища / О.З. Пнатейко, Н.С. Лук'яненко // Здоровье ребенка. - 2007. - № 6 (9). - С. 15-24.
4. Коленчукова О.А. Особенности иммунометаболического статуса у лиц, подверженных воздействию техногенных факторов промышленного производства / О.А. Коленчукова, А.А. Савченко // Гигиена и санитария. - 2011. - № 2. - С. 19-22.
5. Корниенко И.В. Микрометод измерения перекисной люминесценции плазмы крови / И.В. Корниенко // Клиническая лабораторная диагностика. - 1996. - № 4. - С. 51-53.
6. Корнышев Н.П. Телевизионная визуализация и обработка изображений люминесцирующих объектов в криминалистике, молекулярной биологии и медицине / Корнышев В.П. - Новгород: НовГУ им. Ярослава Мудрого, 2004. - 230 с.
7. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А. та ін.]. - К.: Авіценна, 2002. - 156 с.
8. Применение метода биоchemиллюминесценции в санитарно-токсикологическом исследовании / Г.Н. Красовский, В.И. Жуков, Л.А. Бондаренко [и др.] // Гигиена и санитария. - 1989. - № 11. - С. 35-39.
9. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / Л.Д. Попова, О.В. Зайцева, Р.И. Кратенко и др.; Под ред. В. И. Жукова. - Х.: Торнадо, 2000. - 438 с.