

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Колісник І.Л.

УДК 616.36–018.1–099–092.9:612.015.1

### СТАН АНТИОКСИЛЮВАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ МАЛИХ ДОЗ ФТОРИДУ НАТРІЮ\*

Колісник І.Л.

Харківська медична академія післядипломної освіти, м. Харків, Україна

*На крысах популяции Вистар исследовано, в подостром опыте, действие малых субтоксических доз фторида натрия на антиокислительную активность печени. Об интенсивности перекисного окисления липидов судили по содержанию его молекулярных продуктов - диеновых конъюгатов (ДК), ТБК-реактантов и шифовых оснований в гомогенате печени крыс (N = 30), которым вводили малые субтоксической дозы фторида натрия. Изучено, что пероральное введение крысам фторида натрия в дозах 1/10 и 1/100 LD50 способствует повышению содержания диеновых конъюгатов во все сроки наблюдения. В печени крыс, с 20-го дня, четко определялось постепенное повышение уровня ТБК-реактантов и шифовых оснований. Выявлено повышение уровня оценочного показателя интенсивности хемилюминисценции (ХЛ) на 37 и 134% в случае действия фторида натрия в дозе 1/10 LD50 соответственно.*

**Ключевые слова:** свободнорадикальные процессы, фторид натрия, печень крыс.

Вивчення тонких механізмів адаптації біологічних систем є важливою складовою сучасної патофізіології. Системно-антисистемна взаємодія біологічних процесів організму регулює і відповідає за нормальну життєдіяльність теплокровних. Порушення стану антиоксидантної системи організму пов'язано з формуванням патологічних процесів. За думкою багатьох дослідників, у розвитку метаболічно обумовлених захворювань виступає активація вільно радикальних процесів та перекисного окислення ліпідів. [1,2,3,4]. Порушення антиокислювальної системи печінки впливатиме на резистентність організму до факторів довкілля, зокрема хімічних чинників, які можуть діяти безпосередньо як природний фактор або завдяки діяльності людини і призводити до порушень систем та функцій організму та створювати умови для передчасного старіння. [9,10,11].

Враховуючи вищенаведене, метою дослідження було вивчення стану системи антирадикального та антиперекисного захисту печінки щурів популяції Вістар, які отримували малі дози фториду натрію.

#### Матеріали і методи дослідження

В роботі були задіяні тварини - статевозрілі щури лінії Wistar – вагою 180-220 г. Перорально вранці натщесерце, одноразово, в стандартних умовах віварію, щурам вводили за допомогою зонда водні розчини фториду натрію (ФН) протягом 60 днів у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 LD<sub>50</sub>, що відповідно становило 20 мг/кг,

2 мг/кг та 0,2 мг/кг маси тіла (середньолетальна доза ФН для щурів, отримана перорально, становить 200 мг/кг). Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Дослідження показників проводили через 10, 20, 30, 50 і 60 днів після початку експерименту. У кожній групі було по 10 тварин. Забій проводили шляхом декапітації гільйотинним ножом, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію у дозі 50 мг/кг маси.

Рівень вільнорадикальних процесів у печінці щурів, яким протягом 60-ти днів вводили ФН у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub>, оцінювали за інтенсивністю H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-індукованої хемілюмінесценції [7]. Вміст діенових кон'югатів у гомогенаті печінки щурів оцінювали спектрофотометрично [5,6,7]. Вміст діенових кон'югатів розраховували, виходячи з коефіцієнта молярної екстинкції  $\epsilon=2,2 \cdot 10^5$  моль<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Вміст ТБК-реактантів у гомогенаті печінки щурів визначали за реакцією між малоновим діальдегідом і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка при високій температурі та кислому середовищі відбувається з утворенням забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм [7]. Кількість ТБК-реактантів розраховували, виходячи з молярного коефіцієнта екстинкції  $\epsilon=1,56 \cdot 10^5$  моль<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Рівень шифових основ - продуктів взаємодії карбонільних сполук і аміногруп білків, амінокислот, нуклеїнових кислот – визначали у гомогенаті печінки спектрофлюориметрично при дов-

\* Цитування при атестації кадрів: Колісник І.Л. Стан антиокислювальної активності печінки щурів під впливом малих доз фториду натрію // Проблеми екології і медицини. – 2016. – Т. 20, № 5-6. – С. 31–36.

жині хвилі збудження 360 нм і довжині хвилі емісії 430 нм з попереднім екстрагуванням сумішшю Фолча (хлороформ-метанол) [8].

Статистичний аналіз результатів проводився за допомогою комп'ютерного пакета прикладних програм для обробки статистичної інформації Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США).

### Результати та їх обговорення

Оцінювали рівень вільнорадикальних процесів за (табл.1). Інтенсивність  $H_2O_2$ -індукованої хемілюмінесценції

(ХЛ) вимірювали на 10 і 20-ту добу (протягом 60-ти діб) експерименту у печінці щурів, яким вводили ФН у дозах 1/10 і 1/100  $LD_{50}$ . Виявлено, статистично значиме ( $p < 0,001$ ) по відношенню до контролю, підвищення рівня оціночного показника інтенсивності ХЛ відповідно до доз на 37 і 134 %. Цікавим виявився той факт, що на 60-ту добу перорального введення щурів ФН у дозі 1/10  $LD_{50}$  відбувалося статистично значиме ( $p < 0,001$ ) зниження на 33 % рівня інтенсивності ХЛ у печінці щурів порівняно з контролем.

Таблиця 1  
Інтенсивність  $H_2O_2$ -індукованої хемілюмінесценції у гомогенаті печінки щурів при дії фториду натрію у субтоксичних дозах ( $n=10$ ; Me [25%; 75%] або  $M \pm s$ )

Доба спостереження	Інтенсивність хемілюмінесценції, імп/с		
	контроль	доза, $LD_{50}$	
		1/10	1/100
10	294±23,5	403±29,5 $p < 0,001$	398 [320; 418] $p = 0,002$
20	296 [280; 335]	707±26,2 $p < 0,001$	428 [415; 440] $p < 0,001$
30	321±14,0	650 [638; 689] $p = 0,003$	598 [575; 607] $p < 0,001$
50	317±18,1	539 [498; 550] $p < 0,001$	445 [432; 487] $p < 0,001$
60	343±14,5	229±19,9 $p < 0,001$	409±19,7 $p < 0,001$

Примітка:  $p$  – рівень статистичної значущості по відношенню до контролю

Дія ФН у дозі 1/100  $LD_{50}$  супроводжувалася достовірно значимим ( $p \leq 0,002$ ) при зіставленні з контролем підвищенням інтенсивності надслабкого світіння у всі терміни спостереження, особливо виражене на 30-ту добу - в середньому на 85 %. У наступні терміни рівень інтенсивності ХЛ у печінці щурів поступово знижувався і на 60-ту добу введення ФН становив 19 % підвищення в порівнянні з контролем.

Доведено, що будь-які порушення рухомої рівноваги між про- та антиоксидантами при багатьох патологічних станах організму відображаються на інтенсивності ХЛ біосубстратів [7,8]. Ураховуючи це, підвищення інтенсивності ХЛ гомогенату печінки щурів за дії ФН у дозах 1/10 і 1/100  $LD_{50}$  можна пояснити зсувом прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у бік підвищеного утворення прооксидантів, зокрема АФК. Але останнім часом у літературі дуже широко дискутується факт участі АФК у передачі сигналу від рецепторів до клітинного ядра та існування залежної від АФК регуляторної редокс-сигнальної системи [6;7;8]. Особливістю останньої є властивість АФК викликати експресію генів, продукти яких мають антиоксидантну активність, що призводить до підвищення буферної ємності та відновлення редокс-гомеостазу. Однак тривала генерація аномально значної кількості АФК може призвести до стійких змін в трансдукції сиг-

налу та експресії генів, порушенню редокс-балансу клітини, розвитку оксидативного стресу, дисрегуляції апоптозу і, як наслідок, розвитку патологічних станів. Окремо слід підкреслити той факт, що АФК у значній кількості виступають як індуктори окислювального пошкодження основних макромолекул клітин, у першу чергу білків, з порушенням їх функціональної активності [9]. Зміна будь-якого компонента редокс-гомеостазу призводить до його дисбалансу, розвитку компенсаторних реакцій на локальному рівні, що ймовірно виникає й за умов дії на щурів ФН і відображається підвищенням інтенсивності ХЛ. Неспецифічність та розповсюдженість оксидативного стресу у клітинах спричиняє використання енергетичних субстратів та важливих білків для збалансування редокс-системи. Залежно від тривалості оксидативного стресу та функціональних резервів антиоксидантної системи відбуваються виснаження репараційних та адаптаційних можливостей організму, що ймовірно відбувається на 60-ту добу перорального введення ФН у дозі 1/10  $LD_{50}$  і підтверджується зниженням інтенсивності ХЛ у гомогенаті печінки щурів.

Динаміку змін інтенсивності ХЛ у печінці щурів у відсотковому відношенні до контролю наведено на рисунку 1.

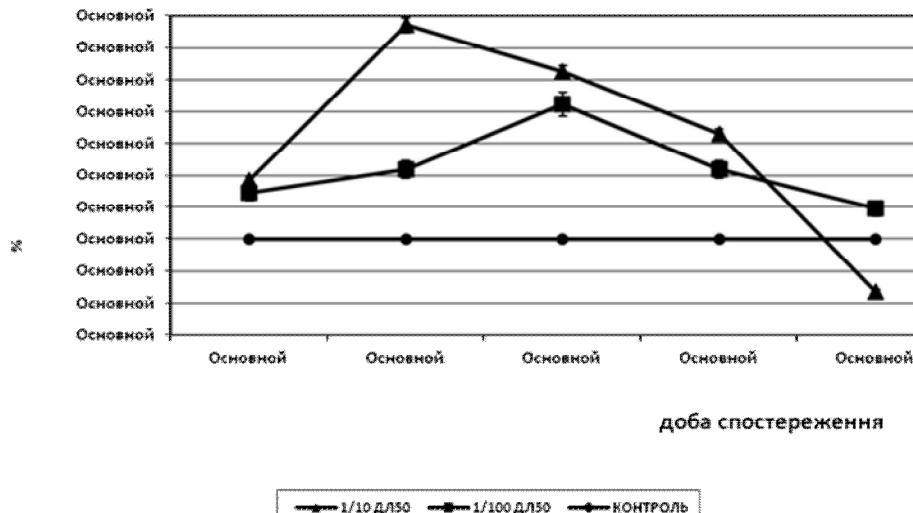


Рис. 1. Динаміка змін інтенсивності ХП у печінці щурів при токсифікації фторидом натрію у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub>

Про інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у печінці щурів, яким тривалий час перорально вводили ФН у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub>, судили за вміс-

том його молекулярних продуктів – дієнових кон'югатів (ДК), ТБК-реактивів і шифових основ (табл. 2).

Таблиця 2  
Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів у гомогенаті печінки щурів при дії фториду натрію у субтоксичних дозах (n=10; Me [25%; 75%] або M±s)

Доза	Доба спостереження	Дієнові кон'югати нМ/мг білка	ТБК-реактивні нМ/мг білка	Шифові основи ум.од/мг ліпідів
1/10 ДЛ50	10	9,09±0,88 p<0,001	0,70±0,07 p=0,059	0,37 [0,28; 0,40] p=0,545
	20	8,12±0,88 p<0,001	0,91±0,08 p=0,001	0,33 [0,20; 0,47] p=0,290
	30	7,64±0,60 p<0,001	1,04±0,12 p=0,001	1,08 [0,90; 1,15] p<0,001
	50	6,9 [6,2; 7,8] p<0,001	1,45±0,15 p<0,001	1,53±0,16 p<0,001
	60	6,2 [5,9; 7,2] p<0,001	1,76±0,16 p<0,001	1,83 [1,50; 1,91] p<0,001
1/100 ДЛ50	10	7,65 [6,94 8,5] p=0,001	0,66 [0,60; 0,70] p=0,199	0,29±0,07 p=0,791
	20	8,75 [8,54 9,8] p<0,001	0,89 [0,75; 0,94] p=0,019	0,24 [0,20; 0,33] p=0,821
	30	7,35 [6,64 8,0] p<0,001	1,28±0,11 p=0,002	0,79±0,15 p<0,001
	50	6,8 [6,0; 7,2] p<0,001	1,38±0,04 p<0,001	0,90±0,12 p<0,001
	60	6,30±0,72 p=0,002	1,49±0,12 p<0,001	0,97±0,09 p<0,001
Конт-роль	10	2,49±0,54	0,58 [0,52; 0,69]	0,33 [0,19; 0,50]
	20	2,5 [2,3; 2,8]	0,72±0,13	0,29±0,15
	30	2,9 [2,5; 3,2]	0,75 [0,59; 0,86]	0,39±0,09
	50	2,68±0,58	0,81±0,12	0,33±0,10
	60	3,15 [2,8; 3,5]	0,74 [0,65; 0,88]	0,36±0,07

Примітка: p – рівень статистичної значущості по відношенню до контролю

Одержані результати свідчили, що пероральне введення щурам ФН у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub> сприяє статистично значимому (p<0,002) по відношенню до контрольної групи тварин підвищенню вмісту ДК у всі терміни спостереження. У випадку дози 1/10 LD<sub>50</sub>

найбільш суттєвим збільшення цього показника спостерігалось на 10-ту добу експерименту – на 265 %, а у випадку дози 1/100 LD<sub>50</sub> – на 20-ту добу в середньому на 234 % (рис. 2).

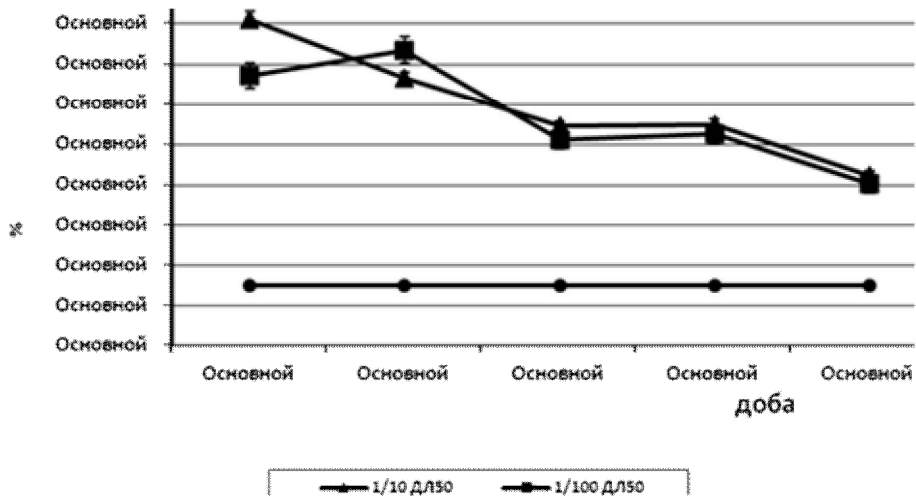


Рис. 2. Динаміка змін вмісту дієнових кон'югатів у печінці щурів при токсифікації фторидом натрію у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub>

У печінці щурів, токсифікованих ФН, виявилось також й підвищення вмісту ТБК-реактантів (табл. 2). На 10-ту добу експерименту збільшення рівня показника при зіставленні зі значенням у контролі було недостовірним для обох доз ( $p=0,059$  і  $p=0,199$ ). У випадку дози 1/10 LD<sub>50</sub>, починаючи з 20-ї доби, чітко визначалося

поступове підвищення ( $p \leq 0,001$ ) рівня ТБК-реактантів по відношенню до контролю – на 27, 41, 78, 133 %. Аналогічна динаміка змін була характерна й для дії ФН у дозі 1/100 LD<sub>50</sub> – збільшення ТБК-реактантів становило 19, 73, 70, 99 % відповідно на 20, 30, 50 і 60-ту добу спостереження (рис. 3).

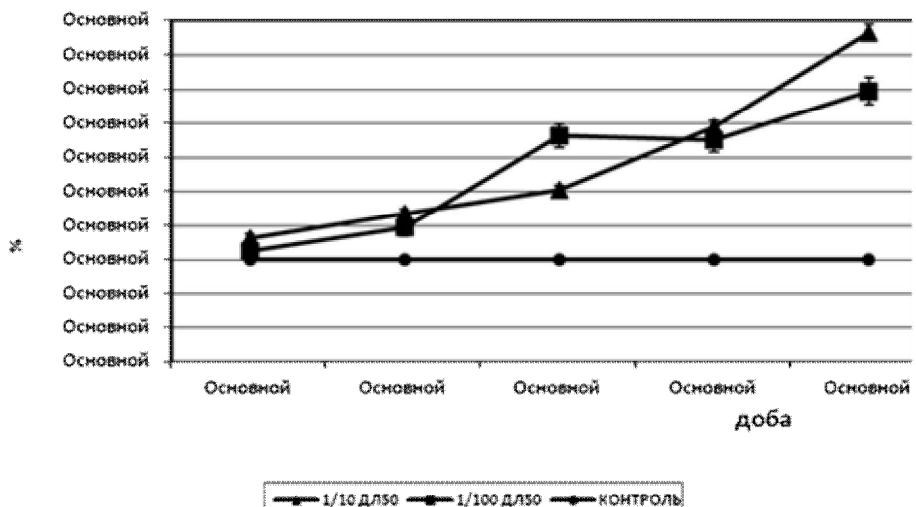


Рис. 3. Динаміка змін вмісту ТБК-реактантів у печінці щурів при токсифікації фторидом натрію у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub>

На 10 і 20-ту добу дії ФН у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub> не спостерігалось при порівнянні з контролем статистично значимих змін вмісту кінцевих продуктів ПОЛ – шифових основ. Результати свідчили про суттєве по-

ступове підвищення ( $p < 0,001$ ) рівня цього показника на 30, 50 і 60-ту добу – на 172, 370 і 380 % відповідно. Аналогічну, але менш виражену динаміку виявлено й для дози 1/100 ДЛ50 – на 103, 173 і 169 % (рис. 4).

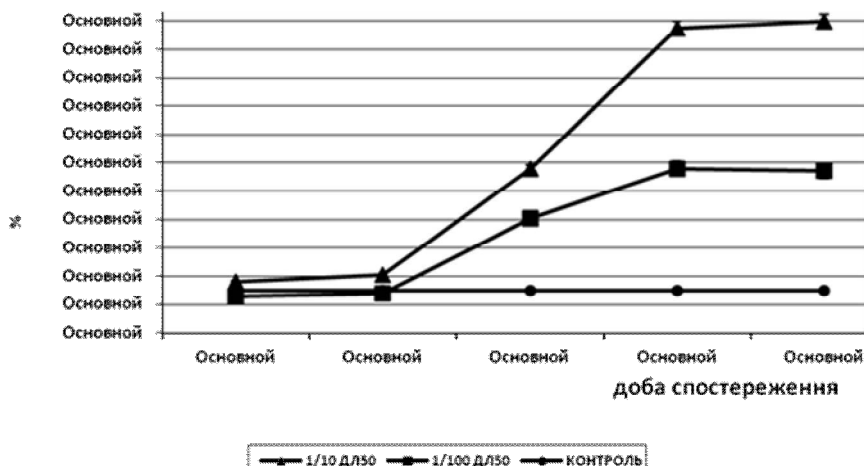


Рис. 4. Динаміка змін вмісту шифових основ у печінці щурів при токсифікації фторидом натрію у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub>

У цілому одержані результати відображують ініціацію процесу ПОЛ, що можна розглядати як механізм реагування організму щурів на тривалу дію ФН. Динаміка змін вмісту продуктів ПОЛ має певну залежність від строку дії ФН. На початкових етапах (10 і 20-та доба) перорального введення ФН у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub> реєструється більш виражене збільшення первинних продуктів ПОЛ – ДК, що свідчить про активацію початкового ланцюга процесу. ДК є найбільш нестабільними продуктами ПОЛ, підвищення їх рівня, як правило, відображує значну інтенсивність впливу прооксидантів, наприклад, АФК [10; 11]. Закономірним наслідком активації ПОЛ у печінці щурів за умов дії ФН є підвищення рівня вторинних продуктів – ТБК-реактантів (особливо, починаючи з 30-ї доби), що свідчить про більш інтенсивний та глибокий перебіг про-

цесу. Але у печінці щурів, починаючи з 50-ї доби дії ФН активація ПОЛ більш виражена на рівні утворення кінцевих продуктів – шифових основ, які розглядають як показники хронізації процесів вільно радикального окислення. Вторинні та кінцеві продукти ПОЛ, що виявляються при тривалій дії ФН, так чи інакше сприятимуть порушенню мікроструктури мембран гепатоцитів, їх проникності, зниженню їх ділення та регенерації, а також пригніченню активності ферментів мітохондріального дихального ланцюга та мікросомальної монооксигеназної системи.

Для підтвердження динаміки спрямованості ПОЛ в організмі щурів за умов тривалої дії ФН у дозах 1/10 і 1/100 LD<sub>50</sub> обчислювали коефіцієнт співвідношення шифові основи/(ДК+ТБК-реактанти) (табл. 3).

Таблиця 3  
Коефіцієнт співвідношення шифові основи/(дієни+ТБК-реактанти) у печінці щурів при дії фториду натрію у субтоксичних дозах (n=10; Ме [25%; 75%] або M±s)

Доба спостереження	Шифові основи/(дієни+ТБК-реактанти), ум.од.		
	контроль	доза, ДЛ50	
		1/10	1/100
10	0,101±0,043	0,037±0,010 p<0,001	0,036±0,012 p=0,001
20	0,075 [0,053;0,154]	0,038±0,014 p=0,016	0,028±0,008 p=0,005
30	0,105±0,022	0,122±0,017 p=0,096	0,093±0,021 p=0,226
50	0,096±0,036	0,191 [0,160; 0,200] p<0,001	0,112±0,021 p=0,198
60	0,084 [0,071;0,115]	0,202 [0,187; 0,245] p<0,001	0,126±0,014 p=0,008

Примітка: p – рівень статистичної значущості по відношенню до контролю

Доведено статистично значиме (p≤0,016) по відношенню до контролю зниження значення коефіцієнта на 10 і 20-ту добу дії ФН у дозі 1/10 ДЛ50 відповідно на 63 і 59 %, тоді як на 30, 50 і 60-ту добу, навпаки, підвищення відповідно на 16, 92 і 120 %. При пероральному введенні ФН у дозі 1/100 LD<sub>50</sub> значення коефіцієнту знижувалося на 10, 20 і 30-ту добу експерименту (відповідно на 69, 70 і 11 %), а на 50 і 60-ту добу – підвищувалося на 17 і 32% по відношенню до значень контролю.

## Висновки

Посилення процесів антиоксидантного захисту ймовірно пов'язане з надлишковою кількістю вільних радикалів та АФК, яке виникає під впливом тривалої дії малих субтоксичних доз фториду натрію. Виявлене підвищення коефіцієнта співвідношення шифові основи/(дієни+ТБК-реактанти) у печінці щурів за дії ФН переконливо свідчить про спрямованість процесу ПОЛ у бік утворення токсичних кінцевих продуктів - шифових основ, а зменшення – про активацію ПОЛ на рівні

утворення первинних і вторинних продуктів. За даними літератури (1-4) така динаміка у печінці антиоксидантного захисту здатно приводити до полімеризації, руйнування, модифікації структур, зміни активності функцій та порушення метаболізму.

#### Література

1. Жуков В.И., Мясоєдов В.В., Пивень В.И., Козин Ю.И. и др. Детергенты-модуляторы радиомиметических эффектов. – Белгород, 2000, - 376 С.
2. Жуков В.И., Попова Л.Д., Зайцева О.В., Кратенко Р.И. и др. Простые и макроциклические эфиры: Научные основы охраны водных объектов. – Харьков, Торнадо, 2000. – 438 С.
3. Щербань Н.Г., Жуков В.И., Мясоєдов В.В., Капустник В.А. Биохимические механизмы радиомиметических эффектов поверхностно-активных веществ. – Харьков «Раритеты Украины», 2012. -126 С.
4. Жуков В.И., Зайцева О.В., Пивень В.И., Сидоренко Н.А. и др. Фториды: биологическая роль и механизм действия. – Белгород, 2006. - 220 с.
5. Меерсон Ф. З. Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации / Ф. З. Меерсон. – М.: Нурохиа Medical, 1993. – 331с.
6. Дубинина Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты / Е. Е. Дубинина. – СПб. : Медицинская пресса, 2006. – 400 с.
7. Закарян А. Е. Различные методы хемилюминесцентного анализа в оценке уровня свободнорадикального перекисного окисления липопротеинов сыворотки крови человека при развитии патологических процессов в организме / А. Е. Закарян, З. А. Закарян, А. А. Трчунян // ДНАН Армении. – 2012. – Т. 112, № 1. - С. 79-86
8. Лесовская М. И. Хемилюминесцентная диагностика и антиоксидантная коррекция нарушений здоровья при окислительном стрессе / М. И. Лесовская // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 7. – С. 190-192
9. Клименко М.О. Тривалий субтоксичний вплив лапроксидів на метаболічну активність монооксигеназної системи гепатоцитів у підгострому досліді/ М.О. Клименко, М.О.Кучерявиченко, І.Ю.Багмут, В.І.Жуков //Проблеми безперервної медичної освіти та науки. – 2014. – 4 [16] – С. – 57-60.
10. Состояние гидроксилующей монооксигеназной системы гепатоцитов под влиянием разных доз олигоэфиров / Багмут И.Ю., Клименко Н.А., Жуков В.И. //Достижения высшей школы 2013: материалы IX международной научно-практической конференции (Болгария, София, 17-25 ноября 2013) . – Болгария, София: «Бял ГРАД-БГ» ООД, 2013. – Т. 37. – С. 15-20.
11. Багмут І.Ю. Вплив олігоєфірів на стан мітросомоальної монооксигеназної системи гепатоцитів білих щурів в експерименті / І.Ю.Багмут // Стратегические вопросы мировой науки – 2014: материалы IX международной научно-практической конференции (Polska, Przemysl: «Nauka i studia7-15 февраля 2014) –Polska, Przemysl: «Nauka i studia», 2014. – Т. 26. – С. 41-45.
12. . Багмут И.Ю. Подострое влияние олигоэфиров на антиокислительную активность печени у белых крыс / Багмут И.Ю., Зайцева О.В., Жуков В.И., Книгавко В.Г. // Ключевые вопросы в современной науке – 2014: материалы X международной научно-практической конференции (Болгария, София , 17-25 апреля 2014). – Болгария, София: «Бял ГРАД-БГ» ООД, 2014. – Т. 28. - С. 80-85.