

УДК: 543.84+616-099+546.173

П. Г. Лихацький, Л. С. Фіра, І. І. Медвідь, О. І. Грималюк

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ НІТРИТНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

В експерименті на щурах різних вікових груп встановлена активація процесів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації білків, яка відмічається у сироватці крові, печінці, шлунку, 12-палій кишці та нирках після потрапляння до організму нітриту натрію. Протягом 72 годин після отруєння у крові тварин збільшується вміст метгемоглобіну та знижується вміст загального гемоглобіну, що є показником прооксидантного ефекту токсичного чинника. Найбільш чутливими до дії токсиканта виявились статевонезрілі щури.

Ключові слова: нітритна інтоксикація, нітрит-йон, гемоглобін, метгемоглобін, ТБК-реактанти, тканинна гіпоксія, гемічна гіпоксія.

ВСТУП

Численними дослідженнями встановлено, що широке застосування мінеральних добрив у сільському господарстві призвело до забруднення навколишнього середовища [2] зокрема: атмосферного повітря, питної води і споживаної їжі, що створило реальну загрозу як для життя людини, так і для інших живих істот [3, 6, 8].

Нітрати, будучи типовими ксенобіотиками, залучаються мікрофлорою людини і тварин у метаболічні процеси, в ході яких відновлюються спочатку до нітриту [4, 11], а потім до утворення низки проміжних продуктів, що спричиняють токсичний вплив на організм людини [15].

Великого значення набуває дослідження метаболізму нітритів [17] у різних вікових групах, як відомо, що саме така чутливість дозволяє виявити найбільш слабкі ланки організму до дії токсичних чинників та підібрати відповідні схеми корекції виявлених порушень, зважаючи на їх віковий аспект [7, 9, 13, 16].

Метою даної роботи є дослідження активності процесів вільнорадикального окиснення у тканинах щурів різного віку за умов гострої нітритної інтоксикації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведено на білих нелінійних щурах-самцях, яких утримували на стандар-

ному раціоні віварію ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського». У роботі користувались «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2007) та узгодженими з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, Франція, 1986). Усіх тварин було поділено на групи: 1-ша група – контрольні (інтактні) тварини (щури статевонезрілі, статевозрілі та старечі (3, 6 та 18 місяців з вихідною масою тіла 80-90, 180-200 і 300-320 г)); 2-га група – щури статевонезрілі, уражені нітритом натрію в дозі 45 мг/кг маси тіла; 3-тя група – щури статевозрілі, отруєні нітритом натрію в тій же дозі; 4-та група – щури старечі, отруєні нітритом натрію в дозі 45 мг/кг (від LD₅₀). Щури контрольної групи (інтактні тварини) отримували фізіологічний розчин за такою самою схемою. Нітрит натрію вводили інтрагастрально дворазово. Через 24 та 72 години після введення нітриту натрію здійснювали евтаназію всіх дослідних груп під тіопенталовим наркозом.

Об'єктом досліджень слугували гомогенат печінки, шлунка, 12-палої кишки та нирок, а також сироватка крові та цільна кров. Активність вільнорадикальних реакцій оцінювали за інтенсивністю процесів окиснювальної модифікації білків [10] та вмістом ТБК-реактантів [14]; ступінь тяжкості гемічної гіпоксії оцінювали за

© П. Г. Лихацький, Л. С. Фіра, І. І. Медвідь, О. І. Грималюк, 2012

вмістом гемоглобіну (Hb) [5, 8] та метгемоглобіну (MetHb) [5, 8] в крові щурів різних вікових груп. Статистичну обробку даних проводили на ПК за допомогою програм «Microsoft Excel» та «STATISTICA 6,0» із розрахунку середніх величин, їх похибок, критерію Стьюдента [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених досліджень нами встановлено, що введення прогіпоксичного фактора (нітриту натрію 45 мг/кг) у всіх групах тварин призводить до активації процесів ОМБ та підвищення вмісту ТБК-реактивів як показників метаболічної інтоксикації. Зафіксовано вірогідне підвищення продуктів окисної модифікації білків, що супроводжується збільшенням вмісту 2,4-динітрофенолгідрозонів (2,4-ДНФГ) нейтрального (370 нм) та основного характеру (430 нм) як в сироватці крові, так і гомогенатах печінки, шлунка, нирок і 12-палої кишки після ураження NaNO₂. Як видно з табл. 1 вміст 2,4-динітрофенолгідрозонів нейтрального характеру в сироватці крові збільшився на 33 % у тварин II та III груп та на 83 % у тварин IV групи віднос-

но інтактного контролю, у печінці – на 25, 28 та 56 % відповідно.

При вивченні вмісту 2,4-ДНФГ основного характеру відмічено вірогідне зростання їх вмісту на 40, 21 та 50 % у сироватці крові тварин різних вікових груп відповідно та на 17, 14 та 25 % у їх печінці через 24 години після отруєння (табл. 2). Аналогічна тенденція до підвищення спостерігалась при вивченні вмісту 2,4-ДНФГ нейтрального та основного характеру в шлунку та 12-палій кишці тварин усіх дослідних груп через 72 години після ураження. Вміст 2,4-ДНФГ як нейтрального, так і основного характеру через 24 години від початку експерименту зазнав незначного підвищення у нирках досліджуваних щурів, але це підвищення не виявилось вірогідним.

Через 72 години після потрапляння до організму нітриту натрію у сироватці крові тварин усіх вікових груп вірогідно підвищився вміст продуктів окисної модифікації білків основного характеру. У печінці та шлунку відмічена активація даного процесу, вміст продуктів ОМБ у 1,2-1,3 разу перевищував рівень інтактного контролю всіх вікових категорій. Даний показ-

Таблиця 1

ВМІСТ 2,4-ДНФГ НЕЙТРАЛЬНОГО ХАРАКТЕРУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ, ПЕЧІНЦІ, НИРКАХ, ШЛУНКУ ТА 12-ПАЛІЙ КИШЦІ (ММОЛЬ/Г БІЛКА) ЩУРІВ, РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП, ЯКІ ОТРУЄНІ НІТРИТОМ НАТРІЮ (M±M; N = 6)

Досліджувані тканини	Статевонезрілі			Статевозрілі			Старечі		
	інтактний контроль	уражені		інтактний контроль	уражені		інтактний контроль	уражені	
		24 год	72 год		24 год	72 год		24 год	72 год
Сироватка	0,24±0,01	0,32±0,05	0,37±0,02*	0,21±0,01	0,28±0,04	0,31±0,02*	0,18±0,01	0,33±0,05*	0,35±0,02*
Печінка	0,47±0,02	0,59±0,03*	0,61±0,05*	0,52±0,04	0,67±0,03*	0,55±0,05	0,48±0,02	0,75±0,04*	0,57±0,04
Шлунок	0,51±0,03	0,63±0,05	0,72±0,05*	0,35±0,02	0,37±0,01	0,45±0,03	0,39±0,02	0,42±0,03	0,47±0,02*
12-пала кишка	0,53±0,03	0,77±0,06*	0,75±0,05*	0,49±0,05	0,51±0,04	0,56±0,05	0,50±0,04	0,57±0,05	0,59±0,04
Нирки	0,70±0,04	0,82±0,05	0,86±0,04*	0,62±0,02	0,65±0,04	0,69±0,04	0,64±0,03	0,69±0,04	0,72±0,04

Примітка: * – розбіжність достовірна відносно інтактного контролю, p ≤ 0,05.

Таблиця 2

**ВМІСТ 2,4-ДНФГ ОСНОВНОГО ХАРАКТЕРУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ, ПЕЧІНЦІ,
НИРКАХ, ШЛУНКУ ТА 12-ПАЛІЙ КИШЦІ (ММОЛЬ/Г БІЛКА) ЩУРІВ,
РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП, ЯКІ ОТРУЄНІ НІТРИТОМ НАТРІЮ (M±M; N = 6)**

Дослід- жувані тканини	Статевонезрілі			Статевозрілі			Старечі		
	інтактний контроль	уражені		інтактний контроль	уражені		інтактний контроль	уражені	
		24 год	72 год		24 год	72 год		24 год	72 год
Сироватка	0,25± 0,01	0,35± 0,02*	0,38± 0,01*	0,23± 0,01	0,28± 0,02	0,30± 0,03	0,20± 0,01	0,30± 0,01*	0,33± 0,02*
Печінка	0,62± 0,03	0,73± 0,05	0,75± 0,02*	0,64± 0,04	0,73± 0,05	0,77± 0,06	0,68± 0,05	0,85± 0,04*	0,91± 0,05*
Шлунок	0,45± 0,01	0,59± 0,03*	0,61± 0,04*	0,31± 0,02	0,34± 0,01	0,39± 0,02*	0,33± 0,01	0,35± 0,02	0,41± 0,02*
12-пала кишка	0,57± 0,04	0,69± 0,06	0,70± 0,05	0,52± 0,05	0,57± 0,04	0,59± 0,05	0,55± 0,04	0,63± 0,05	0,61± 0,04
Нирки	0,66± 0,05	0,71± 0,05	0,76± 0,04	0,59± 0,02	0,65± 0,04	0,69± 0,04	0,63± 0,03	0,66± 0,04	0,68± 0,05

Таблиця 3

**ВМІСТ ТБК-РЕАКТАНІВ В СИРОВАТЦІ КРОВІ (МКМОЛЬ/Л), ПЕЧІНЦІ,
НИРКАХ, ШЛУНКУ ТА 12-ПАЛІЙ КИШЦІ (МКМОЛЬ/КГ) ЩУРІВ, РІЗНИХ
ВІКОВИХ ГРУП, ЯКІ ОТРУЄНІ НІТРИТОМ НАТРІЮ (M±M; N = 6)**

Досліджувані тканини	Статевонезрілі			Статевозрілі			Старечі		
	інтактний контроль	уражені		інтактний контроль	уражені		інтактний контроль	уражені	
		24 год	72 год		24 год	72 год		24 год	72 год
Сироватка	7,07± 0,21	19,29± 0,56*	23,09± 1,58*	7,29± 0,23	21,19± 1,27*	27,13± 1,23*	12,86± 0,26	37,56± 2,07*	44,22± 2,17*
Печінка	2,31± 0,12	3,35± 0,15*	4,75± 0,23*	2,50± 0,12	4,12± 0,28*	4,91± 0,34*	2,41± 0,12	4,30± 0,21*	5,12± 0,37*
Шлунок	9,22± 0,65	20,76± 1,54*	15,20± 1,43*	11,15± 1,01	18,92± 1,06*	17,70± 1,94*	7,57± 0,74	16,70± 1,97*	14,71± 0,98*
12-пала кишка	7,62± 0,73	10,68± 1,58	14,80± 1,70*	8,69± 0,74	15,48± 0,98*	14,30± 1,24*	9,63± 1,65	18,80± 1,43*	21,17± 1,07*
Нирки	9,70± 0,98	23,73± 1,13*	17,50± 1,53*	14,14± 0,93	29,04± 1,12*	22,18± 1,94*	13,79± 1,50	30,02± 1,02*	34,25± 1,07*

ник у 12-палій кишці та нирках практично не зазнав змін і залишився майже на рівні норми, незначно її перевищуючи.

Результати досліджень, наведені в табл. 3, показали, що за умов гострої нітритної інтоксикації відбувається активація процесів ліпопероксидації. Це проявляється підвищенням у 2,7 разу вмісту ТБК-реактивів у сироватці крові дослідних тварин II групи, майже у 3 рази у тварин III та IV груп через 24 години після ураження. На 72 годину після застосування нітриту натрію вміст ТБК-реактивів був дещо вищим, ніж через 24 години після ураження, що свідчить про розвиток патологічного процесу до кінця дослідження.

Аналогічні дані отримані при дослідженні продуктів ПОЛ у гомогенатах печінки, нирок, шлунка та 12-палої кишки (табл. 3). Встановлено, що після введення в організм NaNO_2 проходить нагромадження токсичних продуктів у цих органах.

Вміст ТБК-реактивів у печінці уражених тварин підвищився майже у 2 рази у статевозрілих та старечих тварин: у 1,5 рази у статевонезрілих на 24 години після ураження та у 2 рази у тварин II і III груп, у 2,12 разу у тварин IV групи на 72 години. У шлунку вміст ТБК-реактивів на 24 години після ураження зріс у 2,2 разу у статевонезрілих та старечих тварин та у 1,7 разу у статевозрілих, на 72 години у 1,7 разу у тварин II і III дослідних груп та у 1,9 разу у тварин IV групи відповідно. При дослідженні вмісту даного показника у 12-палій кишці спостерігається вірогідне зростання у тварин III і IV групи (у 2 рази), та підвищення у тварин II групи (у 1,4 раза) на 24 години після застосування ксенобіотика. У нирках вміст ТБК-реактивів збільшувався у 2 та 2,5 разу як на 24, так і на 72 години у всіх дослідних групах після застосування натрію нітриту.

Одним із показників розвитку вільнорадикальних процесів в ураженому нітритом натрію організмі є вміст метгемоглобіну, так як відомо, що метгемоглобіноутворення це перша реакція організму на потрапляння до нього досліджуваного нами токсиканта.

З літератури відомо, що в основі розвитку гіпоксичного пошкодження за гемічним типом лежить знижене забезпечення тканин киснем внаслідок підвищення рівня інактивованого гемоглобіну-метгемоглобіну [5, 12].

Нами досліджено вміст загального гемоглобіну та метгемоглобіну у крові щурів після ураження їх нітритом натрію (табл. 4).

Як свідчать дані табл. 4, нітрит натрію сприяє розвитку гемічної гіпоксії середньої тяжкості у статевозрілих тварин та старечих, гемічної гіпоксії більш важкого ступеня – у статевонезрілих як через 24 години, так і через 72 години після його застосування. Встановлено, що у статевонезрілих щурів вміст MetHb після ураження підвищився на 90 % через 24 години та на 101 % через 72 години, у статевозрілих – 31 і 56 % на 24 і 72 години відповідно, у старечих вміст даного показника – через 24 години підвищився на 54 %, а через 72 години – на 34 % у порівнянні з контрольними тваринами усіх вікових груп.

На тлі метгемоглобінемії у тварин всіх вікових груп після ураження нітритом натрію нами відмічено зниження вмісту загального гемоглобіну, найменше значення якого відмічалось через 72 години від початку експерименту.

Таким чином, потрапляння до організму натрію нітриту викликає активацію процесів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації білків та посилене утворення метгемоглобіну в крові щурів. Оскільки гемоглобін, як субстрат окиснення, перетворюючись у метгемоглобін, стає каталізатором окисдаивних процесів в організмі, то останній проявляє прооксидантний

Таблиця 4

ВМІСТ ГЕМОГЛОБІНУ ТА МЕТГЕМОГЛОБІНУ В КРОВІ ЩУРІВ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП, ОТРУСЕНИХ НІТРИТОМ НАТРІЮ (M±M; N = 6)

Досліджувані тканини	Статевонезрілі			Статевозрілі			Старечі		
	інтактний контроль	уражені		інтактний контроль	уражені		інтактний контроль	уражені	
		24 год	72 год		24 год	72 год		24 год	72 год
Hb, г/л	122,70±1,87	110,50±1,67*	108,33±1,31*	130,27±3,72	124,25±2,98	121,39±2,41	118,73±4,12	112,45±2,31	111,54±3,27
MetHb, г/л	1,55±0,07	2,95±0,14*	3,12±0,12*	1,51±0,08	1,98±0,09*	2,35±0,11*	1,48±0,04	2,28±0,08*	1,99±0,09

ефект. Так, нітрит-іони після потрапляння у кров за досить короткий проміжок часу проникають крізь еритроцитарні мембрани, ініціюючи в останніх вільнорадикальні перетворення, зокрема утворення активних форм кисню, таких, як $O^{\cdot -}$, HO^{\cdot} та ін. [8, 12], що і підтверджено нашими експериментальними даними.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що нітрит натрію в дозі 45 мг/кг викликає інтенсифікацію процесів перекисного окиснення ліпідів та окиснювальної модифікації білків, що підтверджується збільшенням в сироватці крові, печінці, шлунку, 12-палій та нирках уражених тварин всіх вікових груп вмісту ТБК-реактивних та 2,4-динітрофенілгідразонів як через 24, так і 72 години після його введення. Відмічено вірогідне зростання вмісту метгемоглобіну в крові уражених тварин різних вікових груп в обидва терміни дослідження, що, звичайно призводить до розвитку тканинної гіпоксії.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика : [пер. с англ.] – М. : Практика, 1998. – 459 с.
2. Гоженко А.И. Изменение функции почек при острой интоксикации нитритом натрия в эксперименте/ А.И. Гоженко, А.С. Федорук, С.Г. Котюжинская // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2003. – № 1. – С. 28-30.
3. Горішна О.В. Нітратно-нітритне забруднення продуктів харчування: методи, які сприяють його зниженню / О.В. Горішна // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник УМСА. – 2002. – Т. 2. – № 3. – С. 6-8.
4. Гунчак В.М. Особливості сучасних тлумачень токсикодинаміки нітратно-нітритних інтоксикацій в організмі щурів за умов навантаження його свинцем / В.М. Гунчак, Д.Ф. Гуфрій, В.Й. Скорохід // Науковий вісник Львівської державної академії ветеринарної медицини ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2001. – Т. 3, № 3. – С. 34-38.
5. Гуфрій Д.Ф. Метгемоглобінемія – як тест ранньої діагностики нітратно-нітритної інтоксикації / Гуфрій Д.Ф., Скорохід В.Й., Гунчак В.М., Хомик Р.І. // Науковий вісник Львівської державної академії ветеринарної медицини ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2000. Вип. 1, Част. I. – С. 33-37.
6. Иргашев Т.А., Влияние нитратов на организм человека и животных. / Т.А. Иргашев, А. И. Каримов / (обзор). – Душанбе, «Нодир», – 2009. – 58с.
7. Каримов А.И. Воздействие нитратов на пищевые продукты и его последствия. /А.И. Каримов //Вестн. Тадж. гос. ун-та. – Естеств. науки. – Душанбе, 2001. – № 1. – С. 87-90.
8. Каримов А.И. Влияние нитратов на периферическую картину крови. /А.И Каримов, Ш.Н. Шамсудинов //Адаптационные закономерности животных в экстремальных условиях / Тр. каф. физиол. чел и жив. – Душанбе, 2003. – С. 25-28.
9. Методичні рекомендації з профілактики, діагностики та лікування тварин при отруєнні нітратами та нітритами // Розробники: співробітники кафедри фармакології і токсикології Національного аграрного університету, Львівської державної академії ветеринарної медицини ім. С.З. Гжицького та Центральної лабораторії ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України /Затверджено науково-технічною радою Державного департаменту ветеринарної медицини України. – Харків, 2001. – 58 с.
10. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения /Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Поротов //Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.
11. Паніна Л.В. Варіабельність периферійного пульсу у експериментальних тварин з різною резистентністю до гіпоксії за умов введення нітриту натрію // Зб. наук. праць співробітників КМАПО ім. П.Л. Шупика. – 2003. – Вип. 12, Книга 1. – С. 938 – 943.
12. Паніна Л.В., Оцінка ендогенної інтоксикації організму за умов експериментальної гемічної гіпоксії. / Л.В. Паніна, О.І. Терлецька, С.М. Ковальчук, М.Р. Гжегоцький // Здобутки клініч. та експерим. медицини. – 2008. – № 2 – С. 72-76.
13. Сафаров Х.М. Влияние азотосодержащих соединений на содержание белков сыворотки крови и ткани печени крыс в онтогенезе. / Х.М. Сафаров, А.И. Каримов // Аграрный университет. Научно-производственный журнал. – Душанбе, 2004. – № 2. – С.42-47.
14. Спосіб оцінки функціонально-метаболических параметрів при інтоксикації організму/ М.Р. Гжегоцький, Л.В. Паніна, О.І. Терлецька, С.М. Ковальчук //Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я. – Київ, 2005. – № 80. – 4 с.
15. Numbers of nitrate-reducing bacteria in the rumen as estimated by competitive polymerase chain reaction / N. Asanuma, M. Iwamoto, M. Kawato, T. Hino // Animal Sci. J. – 2002. – Vol. 73, № 3. – P. 1334-1349.

16. Yoshii T. Effect of ethanol on nitrate and nitrite reduction and methanogenesis in the ruminal microbiota / T. Yoshii, N. Asanuma, T. Hino // Anim. Sci. J. – 2005. – Vol. 76. – P. 37–42.
17. Yoshii T. Number of nitrate- and nitrite reducing *Selenomonas ruminantium* in the rumen, and possible factors affecting its growth / T. Yoshii, N. Asanuma, T. Hino // Animal Sci. J. – 2003. – Vol. 74. – P. 483-491.

УДК: 543.84 +616-099 +546.173

П. Г. Лихацкий, Л. С. Фира, И. И. Медвидь, О. И. Грималюк

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ НИТРИТНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В эксперименте на крысах разных возрастных групп установлена активация процессов липопероксидации и окисной модификации белков, отмечается в сыворотке крови, печени, желудке, 12-перстной кишке и почках после попадания в организм нитрита натрия. В течение 72 часов после отравления в крови животных увеличивается содержание метгемоглобина и снижается содержание общего гемоглобина, что является показателем прооксидантного эффекта токсического фактора. Наиболее чувствительными к действию токсиканта оказались неполовозрелые крысы.

Ключевые слова: нитритная интоксикация, нитрит-ион, гемоглобин, метгемоглобин, ТБК-реактанты, тканевая гипоксия, гемическая гипоксия.

UDC 543.84 +616-099 +546.173

P. G. Lyhatsky, L. S. Fira, I. I. Medvid, O. I. Hrymalyuk

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE FREE RADICAL PROCESSES ACTIVITY IN THE TISSUES OF RATS OF THE DIFFERENT AGES UNDER NITRITE INTOXICATION

In experiments on rats of different age groups established activation of the lipid peroxidation and oxidative modification of proteins, which was observed in serum, liver, stomach, duodenum and kidney after the getting of the sodium nitrite into the organism. During 72 hours after poisoning the content of methemoglobin increases and content of the total hemoglobin decreases in the blood of animals, this indicates the prooxidant effect of the toxic factor. Immature rats were the most sensitive to the toxicants.

Key words: nitrite intoxication, nitrite ions, hemoglobin, methemoglobin, MDA-reagents, tissue hypoxia, hemic hypoxia.

Адреса для листування:
E-mail: ludafira@mail.ru

Надійшла до редакції:
21.11.2012