

Ляшев Ю.Д., Королев В.А., Грибач И.В., Кирищева Н.Е.

Влияние острой или хронической интоксикации банколом на состояние процессов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, 305041, Россия, г.Курск, ул. Карла Маркса, д. 3

Цель исследования: изучение влияния острой и хронической интоксикации банколом на течение процессов перекисного окисления (ПОЛ) и состояние ферментов антиоксидантной защиты в организме, а также поиск путей коррекции неблагоприятного действия исследуемого инсектицида. **Методика.** опыты выполнены на 32 крысах-самцах Вистар (180—220 г). Для моделирования интоксикации банколом использовали модели острой и хронической интоксикации: острая — внутрижелудочное введение банкола в дозе 1/50 LD₅₀ (4,42 мг на животное) в течение 3 сут. ежедневно; хроническая — введение банкола ежедневно в течение 28 сут. внутрижелудочно через зонд в той же дозе. Животные были разделены на 4 группы: интактные, острая интоксикация банколом, хроническая интоксикация банколом, хроническая интоксикация + мексидол. Мексидол применяли в течение 14 суток в дозе 50 мг внутримышечно, начиная с 15 дня моделирования хронической инсектицидной интоксикации. Определяли содержание в плазме и ткани печени ацилгидроперекисей (АГП), малонового диальдегида (МДА), активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, которые оценивали стандартизованными методами спектрофотометрически. **Результаты.** Установлено, что при остром или хроническом применении банкола наблюдается повышение содержания в плазме и ткани печени МДА и АГП, повышение активности обоих ферментов в плазме и снижение в ткани печени. Применение мексидола вызывало снижение содержания МДА и АГП, повышение активности каталазы и СОД в печени. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что интоксикация банколом сопровождается активацией перекисного окисления липидов и мексидол проявляет выраженное антиоксидантное действие.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, банкол, антиоксидантные ферменты

Для корреспонденции: Ляшев Юрий Дмитриевич, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии; e-mail: yu-ashhev@yandex.ru

Для цитирования: Ляшев Ю.Д., Королев В.А., Грибач И.В., Кирищева Н.Е. Влияние острой или хронической интоксикации банколом на состояние процессов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016. 60(2): 69—73.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.01.15

Lyashev Yu.D., Korolev V.A., Gribach I.V., Kirishcheva N.E.

The influence of acute or chronic bankol intoxication of the lipid peroxidation processes and the activity of antioxidant enzymes

State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kursk State Medical University» Ministry of Public Health of Russian Federation, 3, ul. Karl Marx, Kursk, 305041, Russia

The purpose is the investigation of the influence of acute and chronic bankol intoxication on lipid peroxidation processes and antioxidant enzymes activity and search of methods to correct the unfavorable action of investigated insecticide. **Methods.** Experiments were carried out on Vistar albino rats (n = 32, 180—220g). For modeling bankol intoxication we used models of acute and chronic intoxication: acute — intragastric injection of bankol in a dose 1/50 LD₅₀ (4,42 mg per animal) during 3 days daily; chronic — injection of bankol daily during 28 days intragastrically in same dose. Animals were divided into four groups: naive control, acute bankol intoxication, chronic bankol intoxication, chronic bankol intoxication + mexidol. Rats received intramuscular mexidol during 14 days (15—28 days of bankol injection) in a dose 50 mg per animal. We determine content of acylhydroperoxides (AHP), malonic dialdehyde (MDA), activity of superoxidismutase (SOD) and catalase, which were analyzed spectrophotometrically using of standardized methods. **Results.** It was established that acute and chronic bankol intoxication is accompanied with the increase of AHP and MDA content in plasma and liver tissue, increase of both enzymes activity in plasma and its decrease in liver tissue. The administration of mexidol caused the decrease of lipid peroxidation, increase of SOD and catalase activity in liver. **Conclusion.** The results obtained were shown

the activation of lipid peroxidation in bancol intoxication and antioxidant effect of mexidol.

Keywords: lipid peroxidation, bancol, antioxidant enzymes.

For citation: Lyashev Yu.D., Korolev V.A., Gribach I.V., Kirishcheva N.E. The influence of acute and chronic bancol intoxication on the lipid peroxidation processes and the activity of antioxidant enzymes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 69–73. (in Russ).

For correspondence: Yuri D. Lyashev, Doctor of Medical Sciences, Professor of Pathophysiology Department «Kursk State Medical University»; 3, ul. Karla Marksa, Kursk, 305041, Russian Federation, e-mail: ylyashev@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Lyashev Yu.D., <http://orcid.org/0000-0003-0536-923X>

Korolev V.A. [Http://orcid.org/0000-0002-4376-4284](http://orcid.org/0000-0002-4376-4284)

Received 19.01.15

Введение

В настоящее время отмечается существенный рост числа отравлений агрохимикатами в связи с постоянно растущим их использованием в агропромышленном комплексе, как в России, так и за рубежом [1]. За последние годы значительно расширился перечень новых инсектицидов. В то же время в научной литературе вопрос о механизмах повреждающего действия инсектицидных препаратов исследован недостаточно [2]. Широкое распространение как в России, так и в зарубежных странах получил инсектицид банкол (наименование по CAS S,S-[2(диметиламино)-1,3-пропанедеил]ди(бензенсульфонотиоат), регистрационный номер CAS 17606-31-4 [3]. Установлен механизм его действия на насекомых-вредителей, однако влияние препарата на организм человека, а также терапия токсических повреждений, вызванных банколом, остаются малоизученными.

Цель работы — изучение влияния острой и хронической интоксикации банколом на течение процессов перекисного окисления (ПОЛ) и состояние ферментов антиоксидантной защиты в организме, а также поиск путей коррекции неблагоприятного действия исследуемого инсектицида.

Методика

Работа выполнена на 32 крысах-самцах Вистар. Животные были разделены на 4 группы по 8 крыс в каждой. 8 животных оставались интактными и составили контрольную группу. У остальных моделировали острую или хроническую интоксикацию банколом.

1. Острую интоксикацию у 8 животных воспроизводили путем введения банкола через зонд внутрижелудочно в дозе $1/50 \text{ ЛД}_{50}$ (4,42 мг на животное) в течение 3 сут. ежедневно.

2. Хроническую интоксикацию банколом моделировали у 16 крыс, для чего ежедневно в течение 28 сут. внутрижелудочно через зонд вводили банкол в дозе $1/50 \text{ ЛД}_{50}$ (4,42 мг на животное).

В качестве антиоксиданта использован мексидол, который применяли при хронической интоксикации банколом. Мексидол применяли в течение 14 сут. в дозе 50 мг внутримышечно, начиная с 15-х сут. моделирования хронической инсектицидной интоксикации.

Расчет доз препарата мексидол проводили, используя коэффициент пересчета доз с отдельного животного на человека согласно методическим указаниям приводимых в «Руководстве по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ» (Р.У. Хабриев, Москва, 2005). Для человека массой 70 кг максимальная суточная терапевтическая доза мексидола при острых гнойно-воспалительных процессах брюшной полости составляет 600 мг. В перерасчете на 1 кг массы тела человека необходимо 8,57 мг/кг препарата. Коэффициент пересчета дозы с отдельного животного на человека составляет 39,0. Для крысы массой 200 г коэффициент пересчета составляет 6,5. Следовательно, расчетная терапевтическая доза для экспериментальных крыс-самцов Вистар массой 200 г составляет: $(8,57 \cdot 39) / 6,5 = 51,42 \text{ мг} \approx 50 \text{ мг}$.

Расчет дозы препарата банкол выполнялся, исходя из токсикологических данных: ЛД_{50} для крыс составляет 1105 мг/кг. В связи с тем, что в эксперименте использовались дозы $1/50 \text{ ЛД}_{50}$, то после расчета доза составила: $1105 \text{ мг/кг} / 50 = 22,10 \text{ мг/кг} \cdot 0,2 = 4,42 \text{ мг}$.

Исследования проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции (г.Страсбург, Франция, 1986) по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей.

О состоянии процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по содержанию в плазме крови

и гомогенате ткани печени продуктов этих реакций: ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА), а также активности ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, которые оценивали традиционными методами [5—7]. Ранее показано, что при попадании в организм банкол способен накапливаться в печени [4], в связи с чем, представляется перспективным использование препаратов, обладающих комбинированным гепатопротекторным эффектом, для коррекции поврежденной органа при инсектицидной интоксикации. Навеску ткани печени массой 100 мг гомогенизировали в 1 мл 0,025 М трис-НС1 буфера (рН 7,4). Уровень ацилгидроперекисей в образце (гомогенате печени или плазме) определяли спектрофотометрически в гептановом слое при длине волны 233 нм против контрольной пробы и выражали в условных единицах. Для определения малонового диальдегида проводили реакцию со смесью тиобарбитуровой кислоты и уксусной кислоты, а затем после инкубации измеряли оптическую плотность при 532 нм и рассчитывали количество малонового диальдегида в мкмоль/г белка ткани в гомогенате и мкмоль/мл в плазме крови. Активность СОД определяли спектрофотометрически, основанным на определении степени торможения реакции восстановления нитросинего тетразолия. За условную единицу активности СОД принимали 50% торможение реакции восстановления нитросинего тетразолия. Активность каталазы определяли методом, основанным на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Интенсивность окраски измеряли фотомет-

рически при 410 нм. Активность каталазы выражали в мкат/г ткани в гомогенате или мкат/мл в плазме крови.

Статистическую значимость различий средних величин вычисляли по t-критерию Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых параметров с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

В наших экспериментах установлено, что при остром или хроническом применении банккола наблюдается значительное усиление процессов ПОЛ, что проявляется статистически значимым повышением содержания в плазме крови и гомогенате ткани печени конечных и промежуточных продуктов ПОЛ: МДА и АГП (таблица).

Установлено, что при хронической интоксикации усиление ПОЛ было более выражено: концентрация МДА выше на 23,4% в плазме крови и на 15,4% в ткани печени, а АГП — на 80,8% и на 56,4% соответственно.

Применение мексидола у крыс с интоксикацией инсектицидом вызывало существенное снижение содержания МДА и АГП по сравнению с крысами, у которых моделировали хроническую интоксикацию банколом (в плазме крови: на 36,4% и 37,8%, в ткани печени: на 40,6% и 45,9% соответственно).

У животных с острой или хронической интоксикацией установлено статистически значимое повышение активности антиоксидантных ферментов: каталазы и СОД, в плазме крови: при острой интоксикации: на

Таблица

Содержание малонового диальдегида и ацилгидроперекисей, активность ферментов антиоксидантной системы в плазме крови и гомогенате печени крыс с острой или хронической интоксикацией банколом

Группа	Показатель							
	Содержание малонового диальдегида, (М ± m)		Содержание ацилгидроперекисей, (М ± m)		Активность каталазы, (М ± m)		Активность супероксиддисмутазы, (М ± m)	
	В плазме, мкмоль\мл	В ткани печени, мкмоль\г белка ткани	В плазме, у.е.	В ткани печени, у.е.	В плазме, мкат\мл	В ткани печени, мкат\мг белка ткани	В плазме, у.е.	В ткани печени, у.е.
Контрольная	1,96 ± 0,12	1,36 ± 0,11	0,53 ± 0,04	0,23 ± 0,02	10,43 ± 1,76	9,84 ± 0,99	15,05 ± 0,33	15,11 ± 0,18
Группа с острой интоксикацией банколом	5,35 ± 0,20 ***	1,75 ± 0,08 *	1,04 ± 0,05 ***	0,39 ± 0,03 **	19,39 ± 0,93 ***	3,76 ± 0,34 ***	19,39 ± 0,7 **	10,69 ± 0,3 ***
Группа с хронической интоксикацией банколом	6,6 ± 0,16 ***	2,02 ± 0,17 ***	1,88 ± 0,12***	0,61 ± 0,05 **	23,29 ± 1,01 ***	3,47 ± 0,47 ***	25,18 ± 0,89 ***	12,95 ± 0,39 **
Группа с хронической интоксикацией банколом, получавшая мексидол	4,2 ± 0,14 xxx	1,2 ± 0,06 xxx	1,17 ± 0,05 xxx	0,33 ± 0,02 xxx	21,21 ± 0,97	5,84 ± 0,77 x	17,8 ± 0,4 xxx	15,85 ± 0,27 xxx

Примечание. * — p<0,05 по сравнению с контрольной группой; ** — p<0,01 по сравнению с контрольной группой, *** — p<0,001 по сравнению с контрольной группой; x — p<0,05 по сравнению с группой с хронической интоксикацией банколом; xx — p<0,01 по сравнению с группой с хронической интоксикацией банколом; xxx — p<0,001 по сравнению с группой с хронической интоксикацией банколом

85,9% и 29,5% соответственно; при хронической интоксикации: на 123,3% и 67,3% соответственно. Напротив, в ткани печени обнаружено существенное снижение активности и каталазы, и СОД при обоих способах применения инсектицида (при острой интоксикации: в 2,62 раза и 29,3% соответственно; при хронической интоксикации: в 2,84 раза и на 14,3%. Использование мексидола приводило к повышению активности каталазы в ткани печени на 68,3%, но не оказывало существенного влияния на активность фермента в плазме. Существенное повышение активности СОД под действием мексидола обнаружено только в ткани печени (на 22,4%, $p < 0,05$). Напротив, в плазме крови обнаружено статистически значимое снижение активности этого фермента на 29,3%.

Повышение концентрации пестицида может вызывать изменение фосфолипидного и липидного состава клеточной мембраны [8], что может приводить к увеличению содержания непредельных жирных кислот, которые являются основным субстратом свободнорадикального окисления. Известно, что механизм действия банккола связан с блокадой чувствительных к никотину холинорецепторов на постсинаптической мембране [9]. Нарушение функциональной активности холинорецепторов вызывает расстройства регуляции сосудистого тонуса в микроциркуляторном русле с последующим развитием тканевой гипоксии. Именно эти два фактора: повышение содержания субстрата ПОЛ и вызванный гипоксией окислительный стресс, приводят, по нашему мнению, к усилению ПОЛ при интоксикации банколом.

Накопление банккола, и длительная стимуляция свободнорадикального окисления вызывают снижение активности антиоксидантных ферментов в ткани печени. Содержание компонентов антиоксидантной системы в тканях снижается в результате их активного потребления в условиях избыточного образования свободных радикалов [10]. Одновременно нарушается поступление новых антиоксидантов вследствие изменения кровотока в капиллярах. В работе показано, что в ткани печени под влиянием банккола наблюдается угнетение активности СОД, что, по-видимому, обусловлено её ингибированием при накоплении продуктов ПОЛ, а также возможными структурными изменениями молекулы фермента, в частности, её гликированием [11]. Кроме того, активность СОД может снижаться в результате развития повреждений гепатоцитов, обусловленных интоксикацией [12]. При этом, как известно, уровень активности каталазы, нейтрализующей перекись водорода, на фоне высокого содержания малонового диальдегида усиливает токсическое действие ПОЛ [13].

В то же время повышение активности СОД и каталазы в плазме крови обусловлено, по нашему мне-

нию, усилением продукции этих ферментов в клетках, в которых не происходит аккумуляции пестицида, в частности, в лейкоцитах.

Известно антиоксидантное, антигипоксическое, мембранопротекторное действие мексидола [14]. В наших экспериментах выявлено положительное терапевтическое действие препарата при хронической интоксикации банколом. Показано стимулирующее действие мексидола на активность СОД в печени, что подтверждает данные литературы о его влиянии на активность этого фермента [15]. Отсутствие подобного влияния мексидола на содержание СОД в плазме крови животных, подвергшихся хронической интоксикации банколом, связано, по-видимому, с тем, что развитие интоксикации вызывает значительное увеличение активности этого фермента в плазме, и препарат не проявляет своего эффекта на фоне высокой исходной активности СОД. В нашем исследовании установлено также стимулирующее влияние мексидола на активность каталазы в ткани печени, что объясняется предупреждением подавления активности фермента избыточным накоплением продуктов ПОЛ.

Таким образом, нами установлено, что острая или хроническая интоксикация банколом вызывает активацию ПОЛ, а мексидол является эффективным средством, снижающим эти проявления интоксикации.

References

1. Walter J., Rogan N., Ragan B. Evidence of effects of environmental chemicals on the endocrine system in children. *Pediatrics*. 2003; 112(2): 247-52.
2. Spravochnik pestitsidov i agrokhimikatov, razreshennykh k primeneniyu v Rossiyskoy Federatsii. M.: Publisher Agorus; 2013. 745 p. (M.: Izdatel'stvo AGRORUS; 2013. 745 s.) (in Russian)
3. Shormanov V.K., Maslov S.V., Duritsyn E.P., Baranov Yu.N. Forensic chemical determination Bankol. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2010; 6(1): 39-41. (in Russian)
4. Korolev V.A., Shormanov V.K., Lyashev Yu. D., Gribach I.V., Kirishcheva N.E., Podturkin A.S. i dr. Distribution of insecticide Bankol in the blood and organs of rats in experimental intoxication. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2014; 12(2): 66-70. (in Russian)
5. Galaktionova L.P., Molchanov A.V., El'chaninova S.A., Varshavskiy B.Ya. State peroxidation in patients with gastric ulcer and duodenal ulcer. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1998; (6): 10-4. (in Russian)
6. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; (1): 16-9. (in Russian)
7. Makarenko E.V. Comprehensive definition of superoxide dismutase and glutathione reductase in erythrocytes of patients with chronic liver disease. *Laboratornoe delo*. (11): 48-50. (in Russian)
8. Mogosh G. *Acute poisoning*. Bucharest. Publisher: IDH; 1984. (Bucharest. Izdatel'stvo: RNI; 1984.) (in Russian)

9. Bryzgunova S.S., Eremina M.V. Assessment of toxicological effects of pesticides on the human body. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2011; (8): 95-6. (in Russian)
10. Negre-Salvayre A., Auge N., Ayala V., Basaga H., Boada J., Brenke R., and other Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine* 2010; 48(10): 2747-53.
11. Zenkov N.K., Lapkin V.Z., Men'shchikova E.B. Oxidative stress. *Biochemical and pathophysiological aspects*. M.: Science; Interperiodika. 2001. 243 p. (M.: Nauka; Interperiodika. 2001. 243 s.) (in Russian)
12. Sahn E., Parlakpinar H., Vardi N. Efficacy of melatonin as protectant against oxidative stress and structural changes in liver tissue in pineal-ectomized rats. *Acta Histochimica*. 2004; 106(4): 331-6.
13. Zor'kina A.V., Inchina V.I., Kostin Ya.V. Antioxidant action of cytochrome C under prolonged immobilization stress. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1997; 123(6): 642-4. (in Russian)
14. Motin V.G., Yasnetsov V.V., Zabozaev A.A., Karsanova S.K., Yasnetsov V.V. Electrophysiological study of the mechanism of action mexidol. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2012; 75(1): 3-7. (in Russian)
15. Volchegorskiy I.A., Miroshnichenko I.Yu., Rassokhina L.M., Malkin M.P., Fayzullin R.M., Pryakhina K.E. i dr. Protective effect of 3-hydroxypyridine with succinic acid, and the acute toxicity in mice alloxan. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2014; 77(1): 13-6. (in Russian)

Сведения об авторах:

Королев Владимир Анатольевич, доктор биол. наук, проф. каф. биологии, медицинской генетики и экологии
Грибач Ирина Владимировна, соискатель кафедры биологии, медицинской генетики и экологии
Кирищева Наталья Егоровна, соискатель кафедры биологии, медицинской генетики и экологии