

КОНЦЕНТРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ ОРГАНИЗМА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ФУНГИЦИДОМ ТИРАМ

CONCENTRATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE BIOLOGICAL ENVIRONMENT OF THE BODY DURING THIRAM FUNGICIDE INTOXICATION

V. Korolev
A. Sedykh
V. Potenko
E. Felker
L. Yachmeneva
E. Korolev

Summary. The intake of thiram with food products into the tissues, organs of animals and humans can lead to the activation of free radical oxidation processes due to the accumulation of reactive oxygen species (ROS). Aim of the study: Determination of the concentration of reactive oxygen species in the biological media of the body during intoxication with the fungicide thiram. This publication investigated the effect of thiram intoxication on the quantitative content of reactive oxygen species (ROS). Modeling of subchronic intoxication was accompanied by a significant increase in the content of ROS in all analyzed body media. Thus, we have shown that the increase in the formation of free radicals occurs due to the intake of micro-amounts of the fungicide thiram into the body.

Keywords: thiram, intoxication, oxidative stress, free radicals, reactive oxygen species.

Королев Владимир Анатольевич

Д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО КГМУ (Курск)
medecol1@yandex.ru

Седых Анастасия Валерьевна

Ассистент, ФГБОУ ВО КГМУ (Курск)
turquoise95@mail.ru

Потенко Владимир Владимирович

Д.б.н., доцент, ГомГМУ (Гомель)
gsmu@gsmu.by

Фелькер Елена Викторовна

К.м.н., доцент, заведующая кафедрой
ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО КГМУ (Курск)
felkerev@kursksmu.net

Ячменева Лилия Александровна

Ассистент, ФГБОУ ВО КГМУ (Курск)
yachmenevala@kursksmu.net

Королев Егор Владимирович

ФГБОУ ВО КГМУ (Курск)
korolevva@kursksmu.net

Аннотация. Поступление тирама с пищевой продукцией в ткани, органы животных и человека может приводить к активации процессов свободно-радикального окисления, за счет накопления активных форм кислорода (АФК). Цель исследования: Определение концентрации активных форм кислорода в биологических средах организма при интоксикации фунгицидом тирам. В данной публикации исследовано влияние интоксикации тирамом на количественные содержания активных форм кислорода (ROS). Моделирование субхронической интоксикации сопровождалось значимым увеличением содержания ROS во всех проанализированных средах организма. Таким образом, нами показано, что усиление образования свободных радикалов происходит вследствие поступления в организм микроколичеств фунгицида тирам.

Ключевые слова: тирам, интоксикация, окислительный стресс, свободные радикалы, реактивные формы кислорода.

Введение

В настоящее время широкое применение в агропромышленном комплексе (АПК) получил пестицидный препарат тирам (тетраметилтиурамдисульфид, ТМДТ), который относится к классу фунгицидов с контактным механизмом действия, II класса опасности [13]. Токсикант обладает высокой экономической эффективностью применения, однако способен проявлять высокие кумулятивные, токсические свойства и сохраняться в продуктах переработки агрокульту-

тур до полутора лет, в связи с чем представляет экологическую опасность [17].

Поступление тирама в ткани, органы животных и человека приводит к активации процессов свободно-радикального окисления и как следствие, к образованию свободных радикалов (СР), в том числе в виде реактивных форм кислорода (ROS) [1; 4; 15]. Это показатель, объединяющий радикальные и нерадикальные производные активного кислорода [18]. В концентрациях, превышающих физиологические, радикальные соеди-

нения являются высокотоксичными для биологических систем всех уровней, от молекулярного до организменного. Являясь химически активными соединениями, свободные радикалы вступают в реакции с молекулами различной химической природы и вызывают деградацию структурных белков и липидов клеточных мембран, ингибирование ферментов, изменение структуры и функциональных свойств гормонов и их рецепторов [5; 6; 11]. Чрезмерное накопление АФК сопровождается разрушением многих компонентов антирадикальной защиты, особенно белковой природы, что ведет к дальнейшему повышению уровня свободнорадикальной реакции. АФК, генерируемые внутриклеточно, а также проникающие внутрь через мембрану, являются пусковым фактором индукции апоптоза [8; 14].

Если скорость образования активных форм кислорода (АФК) превышает способность клетки к детоксикации происходит формирование окислительного стресса. Одним из важнейших следствий повышенного образования ROS является избыточная и неконтролируемая, в этих условиях, активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [17].

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на 50 крысах-самцах линии Вистар массой 200–220 грамм. В эксперименте животные были разделены на 5 групп [3]. 1 группа — здоровые, интактные крысы, которые являлись биологическим контролем. 2, 3, 4 и 5 группы получали фунгицид вместе с гранулированным кормом в дозе 8 мг/кг, что является 1/50 LD50, в течение 28 дней. Гранулы комбикорма измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния, добавляли 2 мл дистиллированной воды и взвешенный тирам, формировали гранулы и сушили на открытом воздухе в течение 12 часов. Таким образом, интоксикация достигалась путем естественного кормления исключая физиологический стресс при проведении эксперимента.

Расчет дозы пестицида тирам выполнялся исходя из токсикологических данных: ЛД50 для крыс составляет 400 мг/кг. В связи с тем, что в эксперименте использовались дозы 1/50 ЛД50, то после расчета доза составила 8 мг/кг [7].

Для исследования отбирали — плазму крови, эритроцитарную массу, гомогенат печени, ротовую жидкость и парадонт экспериментального животного. Забой осуществляли декапитацией животных под эфирным наркозом. Забор крови производили с помощью пункции сердца. Кровь собирали в микроцентрифужные пробирки с гепарином (25 ед/мл), а затем

центрифугировали при 4 °C на 3000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость содержащую плазму отбирали для дальнейшего анализа в микроцентрифужные пробирки объемом 50 мкл. Осадок эритроцитов ресуспендировали в 10,0 мл охлажденного 0,9% раствора NaCl, затем клетки осаждали путем центрифугирования при 2000 об/мин в течение 5 мин. В последующем эритроциты трижды промывали раствором 0,9% NaCl. Плотный осадок эритроцитов использовали для дальнейшей работы. Для получения гомогената печени забирали часть органа, отмывали его от крови холодным 0,9% раствором хлорида натрия в течение 35–50 секунд. Перед исследованием печень и парадонт взвешивали, затем измельчали и гомогенизировали с помощью пестикового гомогенизатора, добавляя при этом 0,1 М калий-фосфатный буфер с pH 7,4, предварительно охлажденный до 0 °C, в соотношении «ткань-буфер» 1:6. Из полученных гомогенатов проводили отбор проб для дальнейших исследований. Пробы хранили при температуре –80 °C (низкотемпературный морозильник SUFsg 5001, Liebherr), в лабораторной зоне без дальнейшей транспортировки. Нестимулированная ротовая жидкость была получена путем её забора с помощью микропипетки в чистую пробирку, которую центрифугировали 20 минут на 1500 об/мин. Ротовую жидкость забирали и помещали в микроцентрифужные пробирки, в объеме 50 мкл.

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

После забора и пробоподготовки биообъектов было проведено лабораторное исследование, включающее определение ROS. Для исследования использовался следующий набор: OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence), STA-347, 96 assays (Cell Biolabs, USA). Для проведения интоксикации использовали тирам (137–26–8) чистотой 97% (Sigma-Aldrich, USA).

Определение ROS

Анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы Cell Biolabs на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 480 нм. Концентрацию перекиси водорода в опытных пробах определяли по калибровочной кривой.

Статистический анализ. Для анализа данных использовались методы стандартной статистики. Для выявления статистических гипотез был использован критерий Стьюдента. Пороговый уровень статистической значимости принимали равным 0,05.

Таблица 1. Влияние тирама на показатель ROS

Показатель	ROS, mkmol/L (M±m)				
	Плазма крови	Эритроцитарная масса крови	Гомогенат печени	Ротовая жидкость	Пародонт
Группа 1. Контроль	0,26±0,02	115,24±12,04	149,64±15,24	26,98±0,47	110,34±40,03
Группа 2. Интоксикация 7-е сутки	0,50±0,05***	148,18±14,24	190,47±19,08	45,81±4,73***	147,64±30,12
Группа 3. Интоксикация 14-е сутки	0,61±0,06***	155,12±15,77	196,22±19,60	49,69±4,99***	153,01±41,37
Группа 4. Интоксикация 21-е сутки	0,72±0,07***	159,23±16,43*	210,42±21,17*	53,71±5,67***	158,64±44,78*
Группа 5. Интоксикация 28-е сутки	0,85±0,08***	164,38±16,48*	212,18±21,53*	55,06±5,68***	162,27±53,19*

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.

Note: * — $p < 0.05$ compared with the control group; ** — $p < 0.01$ compared with the control group; *** — $p < 0.001$ compared with the control group.

Результаты

В результате анализа полученных данных эксперимента было определено количественное содержание ROS (табл. 1).

Содержание ROS увеличивалось во всех проанализированных биологических средах на протяжении всего периода экспериментальной интоксикации тирамом. Максимальные изменения исследуемого показателя были отмечены в группе 5. В плазме крови значение ROS увеличилось в 3,26 раза ($p < 0,001$), в эритроцитарной массе крови — в 1,42 раза ($p < 0,05$), в гомогенате печени лабораторных животных — в 1,41 раза ($p < 0,05$), в ротовой жидкости — в 2,04 раза ($p < 0,001$), в пародонте — в 1,47 раза ($p < 0,05$), в сравнении со значениями группы контроля.

Заключение

АФК могут быть образованы при токсическом влиянии тирама. Клетка защищает себя от накопления ROS с помощью многих сложных систем. Эти системы вклю-

чают индуцируемые различные антиоксидантные ферменты, которые подавляют образование свободных радикалов. При ежедневном введении тирама на протяжении 28-и суток отмечалось значительное увеличение содержания ROS ($p < 0,05$).

Многими исследователями показано, что проведение пестицидной интоксикации приводит к постепенному снижению активности ферментативного звена антиоксидантной защиты организма, что вероятно нарушает процесс перехода H_2O_2 в H_2O [2; 12]. Накопление H_2O_2 , влечет за собой высокое производство OH радикалов, что в свою очередь подтверждается увеличением значения ROS в течение всего периода интоксикации [9]. Блюм и Фридович (1985) обнаружили, что активность ферментов глутатионового семейства может быть инактивирована в условиях окислительного стресса супероксид-анионом и токсичными лигандами, такими как малоновый диальдегид, которые могут частично подавляют активность ферментов, вследствие чего происходит чрезмерное образование и накопление свободных радикалов, в частности реактивных форм кислорода [16].

ЛИТЕРАТУРА

1. Королев ВА, Королев ИВ, Харланов НА, и др. Изменение показателей липидного состава клеточных мембран в условиях пестицидной интоксикации и способы их профилактики. Научный результат. Медицина и фармация. 2017;3 (4):11–16. DOI: 10.18413/2313–8955–2017–3–4–11–16
2. Королев ВА, Ляшев ЮД, Грибач ИВ, и др. Изменение прооксидантно-антиоксидантного баланса при хронической интоксикации банколом и эффективность профилактических мероприятий с применением мексидола. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2014;2:19–22.
3. Макарова М.Н., Шекунова Е.В., Рыбакова А.В., Макаров В.Г. Объем выборки лабораторных животных для экспериментальных исследований // Фармация. 2018. Т 67. № 2. С. 3–8.
4. Редокс-зависимая регуляция апоптоза: адаптивная роль активных форм кислорода при окислительном стрессе / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Н.Ю. Часовских [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. — 2008. — Т. 94, № 6. — С. 710–718.

5. Сазонтова, Т.Г. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов — равнозначных участников метаболизма / Т.Г. Сазонтова, Ю.В. Архипенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2007. — № 3. — С. 2–18.
6. Терехина Н.А., Петрович Ю.А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная система. Пермь: ГОУ ВПО «ПГМА МЗ». 2005;2:30.
7. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // М.: Медицина. 2005. 832 с.
8. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 2003;79:829–843. DOI: 10.1016/s0015-0282 (02) 04948-8
9. Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radical Biol. Med.* 1989, 6, pp. 593–597.
10. Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev. Environ. Health.* 2001;16:1–40. DOI: 10.1515/reveh.2001.16.1.1
11. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985;240:500–508. DOI: 10.1016/0003-9861 (85) 90056-6.
12. Cereser C, Boget S, Parvaz P, et al. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology.* 2001;163:153–162. DOI: 10.1016/s0300-483x (01) 00401-2
13. International Agency for Research on Cancer, 1991. IARC working group, Thiram. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 53. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 403–422/
14. Oxidative Stress and Antioxidant Defense / E. Birben, U.M. Sahiner, C. Sackesen [et al.] // *World Allergy Organization Journal.* — 2012. — Vol. 5, Iss. 1. — P. 9–19.
15. Oxidative stress, genotoxicity, biochemical and histopathological modifications induced by epoxiconazole in liver and kidney of Wistar rats / H. Hamdi, Y.B. Othmène, O. Ammar [et al.] // *Environmental science and pollution research international.* — 2019. — Vol. 26, Iss. 17. — P. 17535–17547.
16. Oxidative stress markers in preeclamptic placentas: a systematic review with meta-analysis / R.C. Ferreira, M. B.T. Fragoso, N.B. Bueno [et al.] // *Placenta.* — 2020. — Vol. 99. — P. 89–100.
17. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interact.* 2006;160:1–40. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009

© Королев Владимир Анатольевич (medecol1@yandex.ru), Седых Анастасия Валерьевна (turquoise95@mail.ru),
Потенко Владимир Владимирович (gsmu@gsmu.by), Фелькер Елена Викторовна (felkerv@kursksmu.net),
Ячменева Лилия Александровна (yachmenevala@kursksmu.net), Королев Егор Владимирович (korolevva@kursksmu.net).
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



г. Курск