

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС У ЖИВОТНЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ МАЛЫХ ДОЗ ГЕРБИЦИДА 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

FREE RADICAL OXIDATION AND ANTIOXIDANT STATUS IN ANIMALS UNDER THE ACTION OF SMALL DOSES OF THE HERBICIDE 2,4-DICHLOROPHOXYACETIC ACID

**S. Krasikov
M. Boev
N. Sharapova
D. Karmanova**

Summary. The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-DA) is a widely used compound in agriculture. Given its ability to accumulate in the environment and bioaccumulate in the body, it is relevant to study the characteristics of the body's reactions to the action of subthreshold doses.

Experiments lasting 7 weeks were performed on animals that received drinking water containing 2,4-DA at a concentration of 0.015 mg / L, which is 0.5 maximum permissible concentration (MPC).

It was shown that under the influence of small doses of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid supplied with drinking water, free radical oxidation processes (an increase in the content of diene conjugates and malondialdehyde) were activated and the enzymes of the antioxidant defense system (superoxide dismutase and catalase) were reduced. In addition, there was an increase in the intensity of free-radical oxidation processes in the total fraction of low-density lipoproteins and very low-density lipoproteins isolated from animal serum, and a decrease in antioxidant mechanisms, which manifested itself in the ability to limit the intensity of spontaneous and iron-induced chemiluminescence in the model system of phospholipids.

Keywords: herbicide 2,4-DA, small doses, rats, oxidative stress, chemiluminescence.

Красиков Сергей Иванович

Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Оренбург)
ks_oren@mail.ru

Боев Михаил Викторович

Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Оренбург)
boevm@inbox.ru

Шарапова Наталия Васильевна

К.б.н., доцент, ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Оренбург)
natalya.sharapova2010@yandex.ru

Карманова Дарья Сергеевна

Старший преподаватель, ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Оренбург)
daryakarmanova@mail.ru

Аннотация. Гербицид 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-ДА) относится к широко применяемому соединению в сельском хозяйстве. Учитывая его способность к аккумуляции в среде обитания и биоаккумуляции в организме, представляет актуальность исследования особенностей реакций организма на действие подпороговых доз.

Эксперименты, длительностью 7 недель, проводились на животных, которые получали питьевую воду, содержащую 2,4-ДА в концентрации 0,015 мг/л, что составляет 0,5 предельно допустимую концентрацию (ПДК).

Показано, что под влиянием малых доз 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, поступающей с питьевой водой, происходила активация процессов свободно-радикального окисления (повышение содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида) и снижение мощности ферментов системы антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы и каталазы). Кроме того, отмечалось повышение интенсивности процессов свободно-радикального окисления в суммарной фракции липопротеинов низкой плотности и липопротеинов очень низкой плотности, выделенной из сыворотки животных, и снижение антиоксидантных механизмов, которое проявлялось в способности ограничивать интенсивность спонтанной и железоиндуцированной хемилюминесценции в модельной системе фосфолипидов.

Ключевые слова: гербицид 2,4-ДА, малые дозы, крысы, окислительный стресс, хемилюминесценция.

Введение

С учетом высокой ценности питьевой воды для человека, значительно возрастает роль мер, направленных на снижение загрязнения источников питьевого водоснабжения вредными химическими веществами [16, с. 1685; 1]. Одними из достаточно распространенных загрязнителей воды являются пестициды, в частности хлорорганический гербицид 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-ДА), занимающий первое место по скорости всасывания и проникновения через биологические мембраны, а также кумулятивной способности, и широко применяемый в сельском хозяйстве [8, с. 1532; 9, с. 780]. Ранее показано, что поступление с питьевой водой в организм нетоксичных доз гербицида 2,4-ДА, оказывает неблагоприятное воздействие [12, с. 4480]. В то же время недостаточно изучены механизмы, через которые пестициды реализуют свои неблагоприятные эффекты при поступлении с питьевой водой в малых концентрациях. В связи с особенностями метаболизма 2,4-ДА, происходящего в микросомах печени при участии цитохромома P450, с образованием активных форм кислорода, можно предположить, что и малые дозы также будут подвергаться метаболизму с образованием активных форм кислорода [13, с. 25], что в свою очередь будет приводить к развитию окислительного стресса. Учитывая роль окислительного стресса в развитии широкого спектра заболеваний [15, с. 530], можно предположить, что существует зависимость между содержанием малых доз 2,4-ДА в питьевой воде и их проокислительной активностью. Однако данный вопрос требует изучения, и, в первую очередь, экспериментального подтверждения, что и послужило целью настоящей работы.

Материалы и методы

Работа выполнена на 42 крысах самцах линии Вистар. Животные содержались в виварии с соблюдением циклов день/ночь — 12:12 и на сбалансированной диете (гранулированный корм для лабораторных животных «ПроКорм», Компания БиоПро) для питья животным давали бутилированную воду из местного артезианского источника. В течение всего эксперимента животным был обеспечен неограниченный доступ к воде и пище. Все животные были разделены на две группы. Животные первой группы служили контролем. У животных второй группы питьевая вода содержала 2,4-ДА в концентрации 0,015 мг/л, что соответствует 0,5 ПДК. Продолжительность эксперимента составила 7 недель, после чего животных с соблюдением этических норм и правил работы с лабораторными животными выводили из эксперимента, подвергая эвтаназии путем декапитации. Кровь и внутренние органы забирались и использовались для биохимических исследований. В сыворотке

крови, полученной после центрифугирования при 3000 об/мин, определяли содержание диеновых конъюгатов (ДК) по методу Z. Placer [18, с. 670], малонового диальдегида по реакции с тиобарбитуровой кислотой [17, с. 355] на спектрофотометре «Genesys 5» (USA). Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах крови осуществлялось спектрофотометрически, методика основана на ингибировании реакции автоокисления адреналина [5, с. 270]. Определение активности каталазы проводили кинетическим спектрофотометрическим методом прямой регистрации разложения субстрата фермента — перекиси водорода [19, с. 890]. Внутренние органы — печень, сердце, селезенка измельчали с помощью гомогенизатора (Heidolph SilentCrusher M) в 0,15 М трис-НСl буфера (рН=7,4) в соотношении 1/10 и не разрушающим ткани и ядра клеток осаждением при 500 г. В полученных супернатантах определяли содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов по тем же, что и в сыворотке крови методам.

Измерение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) суммарной фракции липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) сыворотки крови проводили по методике Ю.М. Лопухина, Ю.А. Владимировой и др. (1983). Наиболее информативными показателями, описывающими интенсивность спонтанной и железоиндуцированной хемилюминесценции в исследуемом материале, являются спонтанная светимость, величина быстрой вспышки, светосумма медленной вспышки. Спонтанная светимость (СПС) характеризует интенсивность свободно-радикального окисления (СРО) в нативной сыворотке, в неактивированной сыворотке или отдельной липидной фракции. Быстрая вспышка (h), возникающая в ответ на введение в систему активатора Fe^{2+} , максимальное значение h пропорционально содержанию в исследуемом материале гидроперекисей, в том числе и гидроперекисей липидов. Светосумма медленной вспышки (S), третий из оцениваемых показателей, носит прямую зависимость от числа боковых цепей окисления, т.е. ей соответствует максимальная интенсивность (скорость) СРО, возникающая в системе после введения Fe^{2+} [6, с. 80; 2, с. 61].

Исследование антиоксидантной активности сыворотки крови изучали в соответствии с методиками, предложенными Г.И. Клебановым, Ю.А. Владимировым и др. (1988), и Р.Р. Фархутдиновым (2005). В качестве модельной системы использовали суспензию липопротеинов желтка куриных яиц [7, с. 20]. ХЛ измеряли прибором хемилюминомером (ХЛМ — 003).

Полученные результаты проводимых исследований обрабатывали методами параметрической статистики

Таблица 1. Влияние малых доз гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на содержание продуктов ПОЛ у животных, ($M \pm m$)

Группа, число крыс	Сыворотка крови		Печень		Сердце	
	ДК, Ед.опт.пл./л	МДА, ммоль/л	ДК, Ед.опт.пл./кг белка	МДА, нмоль/г белка	ДК, Ед.опт.пл./кг белка	МДА, нмоль/г белка
1 — Контроль n = 22	0,65± 0,04	43,3± 4,9	0,46± 0,04	0,32± 0,03	0,16± 0,02	0,31± 0,02
2–2,4-ДА n = 20	0,78± 0,05	60,2± 5,3	0,79± 0,14	0,56± 0,09	0,19± 0,04	0,42± 0,04
P_{1-2}	0,048	0,024	0,029	0,016	0,506	0,018

Таблица 2. Влияние малых доз гербицида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на интенсивность спонтанной и железоиндуцированной хемилюминесценции суммарной фракции апо-В сыворотки крови животных, ($M \pm m$)

Группа (n)	Спонтанная светимость, у.е. (СПС)	Величина быстрой вспышки, у.е. (h)	Светосумма, у.е. (S)
1-Контроль (22)	0,19±0,05	2,4±0,64	6,9±1,2
2–2,4-ДА (20)	0,77±0,22	6,1±1,4	12,4±2,6
P_{1-2}	0,014	0,021	0,062

с использованием критерия Стьюдента, принимая критический уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

Из материалов таблицы 1 следует, что длительное потребление животными воды, содержащей 2,4-ДА, приводило к увеличению содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в сыворотке крови на 20% и 39%, соответственно, по сравнению с контролем.

Содержание продуктов перекисного окисления липидов — ДК и МДА в печени животных было на 72% и 75%, соответственно, выше, чем у контрольных крыс.

Далее следует, из данных представленных в таблице 1, что в условиях поступления гербицида содержание ДК и МДА в сердечной мышце практически не изменилось, по сравнению с контролем.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что длительное поступление с питьевой водой малых доз 2,4-ДА приводило к увеличению концентраций продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови и в гомогенатах печени экспериментальных животных.

Поскольку одним из последствий активации ПОЛ в печени является изменение метаболизма липопротеинов крови, нами были определены основные показатели спонтанной и железоиндуцированной хемилюминесценции в атерогенной суммарной фракции апо-В, отражающие нарушения в их обмене [10, с. 25].

Как видно из таблицы 2, интенсивность хемилюминесценции суммарной фракции апо — В ЛП, выделенной из сыворотки крови животных, потреблявших с питьевой водой малые дозы гербицида 2,4-ДА, была достоверно выше, чем в группе животных, потреблявших бутилированную воду.

Так, спонтанная светимость в неиндуцированной Fe^{2+} суммарной фракции ЛПОНП И ЛПНП, выделенной из сыворотки крови животных, была в 4 раза выше в группе животных, получавших с питьевой водой малые дозы 2,4-ДА, относительно контроля.

После активации Fe^{2+} величина и длительность быстрой вспышки в этой же группе крыс в 2,5 раза превышала в группе, потреблявших бутилированную воду.

Интенсивность и длительность светосуммы медленной вспышки сыворотки крови крыс, потреблявших

Таблица 3. Влияние малых доз гербицида 2,4-ДА на активность антиоксидантных ферментов у животных, (M±m)

Группа, число крыс	Лизат эритроцитов		Печень		Сердце	
	Каталаза, мкмоль/мин/мг Нб	СОД, мкмоль/мин/мг Нб	Каталаза, мкМ/г белка	СОД, мкМ/г белка	Каталаза, мкМ/г белка	СОД, мкМ/г белка
1- Контроль n = 22	0,41± 0,04	241,5± 28,1	1,83± 0,13	150,1± 10,0	3,1± 0,29	16,2± 1,9
2-2,4-ДА n = 20	0,22± 0,03	157,7± 23,2	1,06± 0,09	123,0± 8,1	2,3± 0,17	22,1± 2,2
P _{I-2}	0,005	0,027	0,001	0,042	0,022	0,049

Таблица 4. Влияние малых доз гербицида 2,4-ДА на интенсивность спонтанной и железоиндуцированной хемилюминесценции фракции липопротеинов высокой плотности сыворотки крови животных, (M±m)

Группа (n)	Спонтанная светимость, у.е. (СПС)	Величина быстрой вспышки, у.е. (h)	Светосумма, у.е. (S)	% Подавления
1-Контроль (22)	0,3±0,06	0,70±0,07	137±7,4	29,20±0,72
2-2,4-ДА (20)	0,32±0,04	0,83±0,04	350±13,4	15,34±1,10
P _{I-2}	0,783	0,115	0,001	0,001

с питьевой водой нетоксичные дозы гербицида 2,4-ДА, была почти в 2 раза выше, чем этого же показателя суммарной фракции апо — В ЛП сыворотки крови животных, получавших бутилированную воду.

Таким образом, результаты спонтанной и железоиндуцированной хемилюминесценции суммарной фракции апо-В показали более высокую интенсивность процессов СПО в суммарной фракции апо-В, выделенной из сыворотки животных, получавших с питьевой водой малые дозы 2,4-ДА.

Одним из важных звеньев в формировании окислительного стресса является снижение мощности антиоксидантных ферментов защиты организма (каталазы и супероксиддисмутазы) [11, с. 4790].

В связи с этим, нами было оценено влияние малых доз гербицида 2,4-ДА на активность антиоксидантных ферментов. В таблице 3 представлены данные, отражающие состояние антиоксидантной системы защиты у контрольных и опытных животных.

Из материалов таблицы следует, что длительное потребление животными воды, содержащей 2,4-ДА, приводило к снижению активности каталазы и суперок-

сиддисмутазы в эритроцитах животных на 46% и 35%, соответственно.

Состояние активности антиоксидантных ферментов в печени характеризовалось понижением активности каталазы и СОД на 42% и 18%, соответственно у животных, получавших 2,4-ДА, по сравнению с контролем.

Изменение активности антиокислительных ферментов в гомогенатах сердца носили разнонаправленный характер и заключались в снижении активности каталазы в 1,3 раза и увеличении активности супероксиддисмутазы на 36%, от контрольного уровня.

Снижение антиоксидантных механизмов проявляется также в способности ограничивать интенсивность спонтанной и железоиндуцированной хемилюминесценции в модельной системе фосфолипидов.

Данные, представленные в таблице 4, отражают способность липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) снижать интенсивность ПОЛ у животных в условиях поступления с питьевой водой 2,4-ДА.

Так как в основе субстрата используется модельная система фосфолипидов, сходных с липидами крови, ме-

тодика не предполагает видимых различий между спонтанной светимостью для контрольной и опытной групп.

У животных, получавших с питьевой водой малые дозы 2,4-ДА, величина быстрой вспышки была на 19% больше, чем в контроле.

Величина светосуммы медленной вспышки фракции ЛПВП, выделенной из сыворотки крови животных, получавших с питьевой водой 2,4-ДА в концентрации ниже ПДК, была в 2,6 раза выше, чем величина исследуемого параметра в контроле.

Антиатерогенную направленность ЛП спектра характеризует способность ЛПВП снижать интенсивность СРО при добавлении их к стандартной системе, содержащей фосфолипиды, и оценивается через процент подавления СРО в стандартной хемилюминесцентной системе (СХС).

Видно, что у животных в условиях поступления с питьевой водой малых доз 2,4-ДА, процент подавления СРО в стандартной хемилюминесцентной системе был на 48% ниже, по сравнению с контролем.

Таким образом, в группе животных, получавших с питьевой водой малые дозы 2,4-ДА, отмечено снижение способности ЛПВП подавлять СРО в стандартной хемилюминесцентной системе, относительно интактных животных.

Обсуждение

Наиболее существенным фактом, установленным в результате проведенного исследования, является то, что под влиянием невысоких концентраций 2,4-ДА, поступающего с питьевой водой, происходит активация процессов свободно-радикального окисления и снижение мощности ферментов системы антиоксидантной защиты, проявляющееся накоплением продуктов перекисного окисления липидов и увеличением пероксидации различных фракций липопротеинов, которые могут приводить к ряду последствий, неблагоприятных для организма в целом [14, с. 851]. Таким образом, есть основание думать, что поступление с питьевой водой малых доз данного гербицида, может приводить к широкому спектру заболеваний, в развитии которых важная роль принадлежит окислительному стрессу. На наш взгляд повсеместная распространенность гербицида 2,4-ДА определяет актуальность весьма трудоемкой задачи его идентификации и проведении мероприятий по защите источников питьевого водоснабжения от загрязнения данным поллютантом [4, с. 8; 3, с. 567].

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2017 году». [Электронный ресурс] — URL: http://www.mnr.gov.ru/docs/gosudarstvennye_doklady/. — (дата обращения 17.09.2019).
2. Лопухин, Ю. М. Регистрация хемилюминесценции составных частей сыворотки крови в присутствии двухвалентного железа // Бюлл. Эксп. Биол. — 1983. — Т. 95, № 2. — С. 61–63.
3. Ракитский, В. Н. Оценка и управлением риском при различных технологиях применения пестицидов / В. Н. Ракитский, Н. Е. Федорова, И. В. Березняк, А. В. Ильницкая // Актуальные вопросы анализа риска при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения и защиты прав потребителей: материалы IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. — Пермь, 2019. — С. 565–570.
4. Рахманин, Ю. А. Актуализация методологических проблем регламентирования химического загрязнения и изучения его влияния на качество жизни и здоровье населения. Сб.: Методологические проблемы изучения, оценки и регламентирования химического загрязнения окружающей среды и его влияние на здоровье населения. Материалы Пленума Научного совета РФ по экологии человека и гигиене окружающей среды, под редакцией академика РАН Ю. А. Рахманина. — 2015. — С. 3–11.
5. Сирота, Т. В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т. В. Сирота // Вопр. мед. химии. — 1999. — Т. 45, № 3. — С. 263–272.
6. Фархутдинов, Р. Р., Лиховских В. А. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине. — Уфа: БГМУ, 1995. — 90с.
7. Фархутдинов, Р. Р. Исследование хемилюминесценции биологического материала и оценка антиокислительной активности на приборе ХЛМ-003: методические рекомендации / Р. Р. Фархутдинов. — Уфа, 2005. — 24 с.
8. A rare case of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) poisoning / Singla Sanjay [et al.] // International Journal of Contemporary Pediatrics— 2017. — Vol. 4, № 4. — P. 1532–1533.
9. Burns, C. J. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology / C. J. Burns, G. M. Swaen // Critical Reviews in Toxicology.— 2012. — Vol. 42, № 9. — P. 768–786.
10. Dai, Y. Scavenger receptors and non-coding RNAs: relevance in atherogenesis / Y. Dai [et al.] // Cardiovascular Research. — 2016. — Vol. 109, № 1. — P. 24–33.

11. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid promotes S-nitrosylation and oxidation of actin affecting cytoskeleton and peroxisomal dynamics / M. Rodríguez-Serrano [et al.] // *Toxicology Letters*. — 2014. — Vol.65. — P. 4783–4793.
12. Gangemi, S. Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans (Review)/ S. Gangemi [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. — 2016. — Vol.14, № 5. — P. 4475–4488.
13. Heindel, J. J. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders / J. J. Heindel [et al.] // *Reproductive Toxicology*. — 2017. — Vol. 68. — P. 3–33.
14. Hung, Y. C. Cholesterol loading augments oxidative stress in macrophages/ Y. C. Hung [et al.] // *Elsevier*. — 2006. — Vol. 580, № 3. — P. 849–861.
15. Kim, H. J. Exposure to pesticides and the associated human health effects/ H. J. Kim [et al.] // *Science of The Total Environment*– 2017. — Vol. 575, № 1. — P.525–535.
16. Li, X. F. Drinking water disinfection byproducts (DBPs) and human health effects: multidisciplinary challenges and opportunities / X. F. Li, W. A. Mitch // *Environmental Science & Technology*. — 2018. — Vol. 52. — P. 1681–1689.
17. Ohkawa, H. O. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. O. Ohkawa [et al.] // *Anal.Biochem*. — 1979. — Vol. 95, № 2. — P. 351–358.
18. Placer, Z. Lipperoxidation systeme im biologischen material // *Nahrung*. 1968. Bd. 12. S. 679.
19. Zuck, H. In *Methods of enzymatic analysis* / H. Zuck // Ed by Bergmeger H. — Oxford: Pergamon Press, 1963. — P. 885–894.

© Красиков Сергей Иванович (ks_oren@mail.ru), Боев Михаил Викторович (боевм@inbox.ru),

Шарапова Наталия Васильевна (natalya.sharapova2010@yandex.ru), Карманова Дарья Сергеевна (daryakarmanova@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Оренбург