

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.9:616

© Коллектив авторов

### СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА И КРИСТАЛЛОБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ НЕСИММЕТРИЧНЫМ ДИМЕТИЛГИДРАЗИНОМ

*И.Р. Кулмагамбетов, Л.Е. Муравлева, В.В. Койков\*, Ю.Э. Абдрахманова*

Карагандинская государственная медицинская академия, Республика Казахстан,  
100008, г. Караганда, ул. Гоголя, 40; тел.: (3212) 513479 (доб. 117);  
эл. почта: koykov@inbox.ru, muravlev@inbox.ru

Исследованы параметры окислительного метаболизма и кристаллообразующих свойств крови крыс при интоксикации несимметричным диметилгидразином (НДМГ). Установлено, что через 7 дней после введения НДМГ в дозе 5 мг/кг в эритроцитах крови отмечается рост уровня вторичных и конечных продуктов ПОЛ. Введение НДМГ в дозе 70 мг/кг приводит к существенному накоплению первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в эритроцитах крыс, накоплению продуктов окислительной модификации белков в плазме крови.

Результаты изучения кристаллообразующих свойств плазмы показали, что с увеличением дозы вводимого токсиканта нарастает потеря зональности и симметрии расположения основных элементов фазы (конкреций, отдельностей, трещин), изменяется их форма и происходит их полное исчезновение, появляются аномальные поля (единичные или множественные языковые структуры, "морщины", листовые структуры, структуры типа "жгуты" и др.). При этом яркая картина нарушения структурообразующих свойств плазмы отмечается уже при малых дозах НДМГ.

Полученные результаты свидетельствуют о тесной взаимосвязи нарушения физических и химических свойств плазмы крови экспериментальных животных при токсическом действии НДМГ на организм экспериментальных животных.

**Ключевые слова:** несимметричный диметилгидразин, окислительный метаболизм, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белка, тизеография.

**ВВЕДЕНИЕ.** Ухудшение состояния здоровья населения регионов техногенного загрязнения требует поиска информативных лабораторных критериев оценки степени тяжести интоксикационного синдрома в организме человека [1].

К группе высоко токсичных продуктов промышленного происхождения относится гидразин и его производные. Одним из наиболее токсичных производных гидразина является несимметричный диметилгидразин (НДМГ). Метаболизм гидразина в организме животных и человека до конца не изучен, поэтому в рекомендациях ВОЗ касающихся гигиенических критериев состояния окружающей среды, данная проблема определена как приоритетная [2].

\* - адресат для переписки

Несмотря на достаточно большой объем исследований, проведенных с гидразином и его производными, все еще остается целый ряд неясных моментов. Прежде всего, недостаточно изучено состояние окислительного метаболизма биомакромолекул организма, подвергнутого действию гидразина. Представляет высокий интерес изучение связи между степенью окислительной деструкции биомолекул и характером физико-химических свойств биологических жидкостей организма.

Достаточно перспективным способом оценки биофизических параметров биологических жидкостей является метод клиновидной дегидратации (тезиография, самоорганизация жидкостей на твердой подложке) сыворотки крови, основанный на структурировании, т.е. кристаллообразующих свойствах, биологических жидкостей [3].

Целью наших исследований явилось изучение параметров окислительного метаболизма и кристаллообразующих свойств крови крыс при интоксикации НДМГ.

**МЕТОДИКА.** Исследование проведено на 20 беспородных белых крысах обоего пола (10 самцов и 10 самок), которым внутрижелудочно вводили НДМГ. При этом одна группа животных ( $n=10$ , в т.ч. 5 самцов и 5 самок) подвергалась однократному воздействию НДМГ в дозе 5 мг/кг (доза близкая к минимальной действующей). Вторая группа ( $n=10$ , в т.ч. 5 самцов и 5 самок) получала НДМГ в дозе 70 мг/кг (доза, близкая к максимальной переносимой). В качестве контроля использовали интактных животных ( $n=20$ , в т.ч. 10 самцов и 10 самок). Животных умерщвляли через 7 суток после введения вещества под легким эфирным наркозом методом неполной декапитации, путем иссечения кожного лоскута в области шеи, раздвижения мышц шеи и рассечения сонных артерий. Содержание животных и введение НДМГ осуществлялось в лаборатории НИЦ КГМА.

Состояние окислительного метаболизма эритроцитов характеризовали по уровню его первичных, вторичных и конечных продуктов: диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов (КД), суммарных первичных (СПП) и вторичных (СВП) продуктов, оснований Шиффа (ШО). Уровень ДК и КД определяли по методу В.Н. Ушкаловой и Г.Д. Кадочниковой, 1987 [4]. Для определения СПП, СВП и ШО использовали методический прием К.А. Львовской и соавт., 1991 [5]. В плазме определяли уровень продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) по методу Levine в модификации Е.Е. Дубининой и соавт. [6]. При этом регистрировали оптическую плотность карбонильных производных динитрофенилгидразонов при различных длинах волн: 356 нм – алифатические кетондинитрофенилгидразоны (КДНФГ) нейтрального характера; 370 нм – алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны (АДНФГ) нейтрального характера; 430 нм – алифатические КДНФГ основного характера; 530 нм – алифатические АДНФГ основного характера. Количественно ОМБ выражали в единицах оптической плотности на 1 мл плазмы.

Тезиографическим методом определяли кристаллообразующие свойства плазмы крови. Тезиограммы плазмы крови делали по модифицированному нами методу клиновидной дегидратации сыворотки крови, предложенному В.Н. Шабалиным и С.Н. Шатохиной [3]. Исследование структурообразующих элементов дегидратированной капли проводили с помощью отсканированных фаций – высохшей капли биологической жидкости на поверхности чашки Петри. В качестве параметров описания использовали следующий набор критериев: наличие и четкость зон твердой фазы; характер линий растрескивания; наличие и характер аморфных областей; наличие, расположение, размеры и количество конкреций; наличие, расположение и характер патологических структур.

Полученные данные были обработаны методом вариационной статистики. Достоверность различий оценивали непараметрическим методом по Х-критерию Ван-дер-Вальдена.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Уровень продуктов липопероксидации в эритроцитах подопытных животных представлен в таблице 1.

Таблица 1. Уровень продуктов ПОЛ в эритроцитах крыс.

Показатель	Контроль (вода)	После введения НДМГ в дозе 5 мг/ кг	После введения НДМГ в дозе 70 мг/ кг
ДК, усл.ед.	49,58±9,19	38,23±4,24 * (p<0,05)	163,22±7,56 * (p<0,01) # (p<0,01)
КД, усл.ед.	27,01±5,87	54,37±6,45 * (p<0,01)	225,61±9,56 * (p<0,01) # (p<0,01)
СПП, усл.ед.	0,543±0,045	0,387±0,075 * (p<0,05)	0,679±0,087 * (p<0,05) # (p<0,01)
СВП, усл.ед.	0,114±0,017	0,184±0,024 * (p<0,01)	0,327±0,032 * (p<0,01) # (p<0,01)
ШО, усл.ед.	0,0478±0,0093	0,0922±0,0112 * (p<0,01)	0,1573±0,0124 * (p<0,01) # (p<0,01)

Примечание: здесь и в таблице 2: \* - достоверность показателей по отношению к контролю;  
# - достоверность различий показателей между животными опытных групп.

Полученные результаты указывают на неоднозначный характер изменения уровня продуктов ПОЛ в эритроцитах крыс, подвергнутых воздействию НДМГ в дозе 5 мг/кг. Содержание ДК и СПП в эритроцитах достоверно снижается – на 22,9% и 28,7% (p<0,05) соответственно. В то же время уровень КД, СВП и ШО четко и достоверно возрастает на 101,3%, 61,4% и 92,8% соответственно (p<0,01). По-видимому, данные результаты свидетельствуют о стадийности процесса ПОЛ: липиды быстро реагируют на действие окисляющих агентов, образующихся в ходе метаболизма НДМГ, что приводит к накоплению первичных, а затем вторичных и конечных продуктов ПОЛ. Антирадикальные механизмы, включаемые в ответ на окислительную агрессию, ограничивают уровень свободных радикалов, что приводит к снижению уровня, прежде всего, первичных продуктов окислительной деструкции липидов.

Увеличение дозы токсиканта приводит к резкому накоплению и первичных, и вторичных, и конечных продуктов ПОЛ в организме крыс. Введение НДМГ экспериментальным животным в дозе 70 мг/кг вызывает увеличение уровня ДК на 229,2% (p<0,01), КД на 735,3% (p<0,01), СПП на 25% (p<0,05), СВП на 186,7% (p<0,01), ШО на 229,1% (p<0,01). По-видимому, система антиокислительной защиты организма в условиях массивной атаки свободными радикалами уже не справляется.

Характер окислительного повреждения белков отражает уровень продуктов ОМБ в плазме крыс (см. табл. 2).

Таблица 2. Уровень продуктов ОМБ в плазме крови крыс

Показатель	Контроль (вода)	После введения НДМГ в дозе 5 мг/ кг	После введения НДМГ в дозе 70 мг/ кг
КДФГ <sub>о</sub>	1,39±0,05	1,18±0,11 * (p<0,05)	2,27±0,22 * (p<0,01) # (p<0,01)
АДФГ <sub>о</sub>	1,44±0,05	1,27±0,11 * (p<0,05)	2,46±0,23 * (p<0,01) # (p<0,01)
КДФГ <sub>с</sub>	0,77±0,03	0,81±0,09	1,50±0,16 * (p<0,01) # (p<0,01)
АДФГ <sub>с</sub>	0,121±0,022	0,161±0,055 * (p<0,05)	0,332±0,064 * (p<0,01) # (p<0,01)

## ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ДИМЕТИЛГИДРАЗИНОМ

Как следует из полученных результатов, через 7 дней после введения НДМГ в дозе 5 мг/кг уровень продуктов ОМБ практически не изменяется – небольшое увеличение характерно лишь для АДНФГ основного характера на 33,3% ( $p<0,05$ ). Вместе с тем, увеличение дозы вводимого токсиканта приводит к существенному росту уровня окислительной деструкции белков – содержание КДНФГ нейтрального характера возрастает на 63,3% ( $p<0,01$ ), АДНФГ нейтрального характера – на 70,8% ( $p<0,01$ ), КДНФГ основного характера – на 94,8% ( $p<0,01$ ), АДНФГ основного характера – на 175,3% ( $p<0,01$ ).

ОМБ – один из ранних индикаторов поражения тканей при свободнорадикальной патологии. По-видимому, малые дозы токсиканта не вызывают существенных повреждений белков. В то же время высокие дозы НДМГ приводят к существенному накоплению продуктов ОМБ, что согласуется с параллельным увеличением уровня продуктов ПОЛ. На наш взгляд, именно окислительный стресс, проявляющийся в генерации широкого спектра свободных радикалов как АФК [7], так и продуктов ПОЛ, определяют рост окислительной деструкции белков.

Изменение структуры основных биомакромолекул в крови крыс при интоксикации НДМГ должно, по-видимому, влиять на физико-химические свойства биологических жидкостей организма экспериментальных животных. В связи с этим мы провели исследование структурообразующих свойств плазмы крови крыс.

Оценка кристаллообразующих свойств плазмы контрольных животных показала, что тезиограммы (см. рис. 1) имеют достаточно однотипный характер и в целом характеризуются высокой степенью симметричности и радиальности, а так же, наличием всех 3-х зон фаций – краевой, промежуточной и центральной.

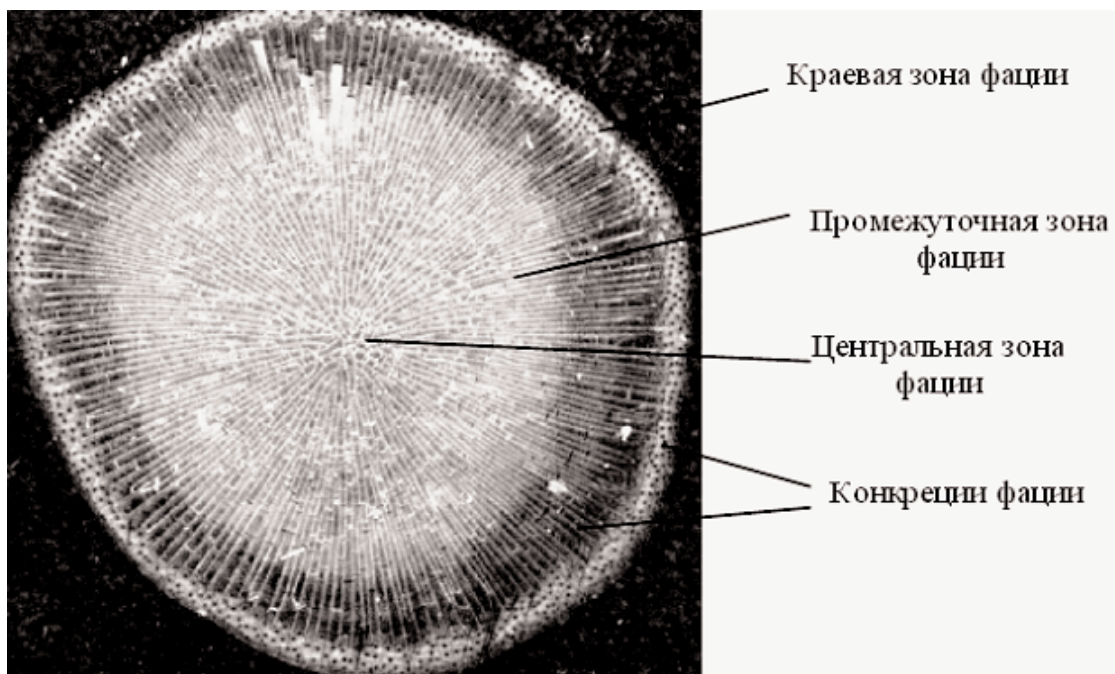


Рисунок 1.

Тезиограмма плазмы крови крыс контрольной группы.



Краевая зона характеризуется четкой очерченностью и равнорадialным растрескиванием (в 95% случаев), распространяющимся на промежуточные и центральные зоны в том числе, благодаря чему, тезиограммы контроля в большинстве случаев имеют строго упорядоченную симметричность фаций. Единичны случаи хаотичного растрескивания центральной зоны (5%), но симметричность в целом сохраняется. Отдельности мелкие и порядок их ветвления высок – более 10 отдельностей в одном радиусном ряду. Аморфные области в тезиограммах контроля нами встречены не были. Общее количество конкреций высокое, все имеют округлую форму и локализуются в краевой и центральной зонах, чаще распространены по всей поверхности фаций (60%), но преобладают в краевой зоне.

Тезиографическая картина плазмы крови крыс, подвергнутых интоксикации НДМГ в дозе 5 мг/кг, показывает четкие отличия от контроля (см. рис. 2). Тезиограммы крови группы животных с гидразиновой интоксикацией не обладают достаточно высокой однотипностью в строении фации, которая присуща контролю. Характер растрескивания фаций неоднороден – встречается как равнорадialный (30%), так и разнорадialный (70%) характер растрескивания фаций, причем, последний преобладает. Центральная зона выражена отчетливо, содержит аморфно организованные участки (90%).

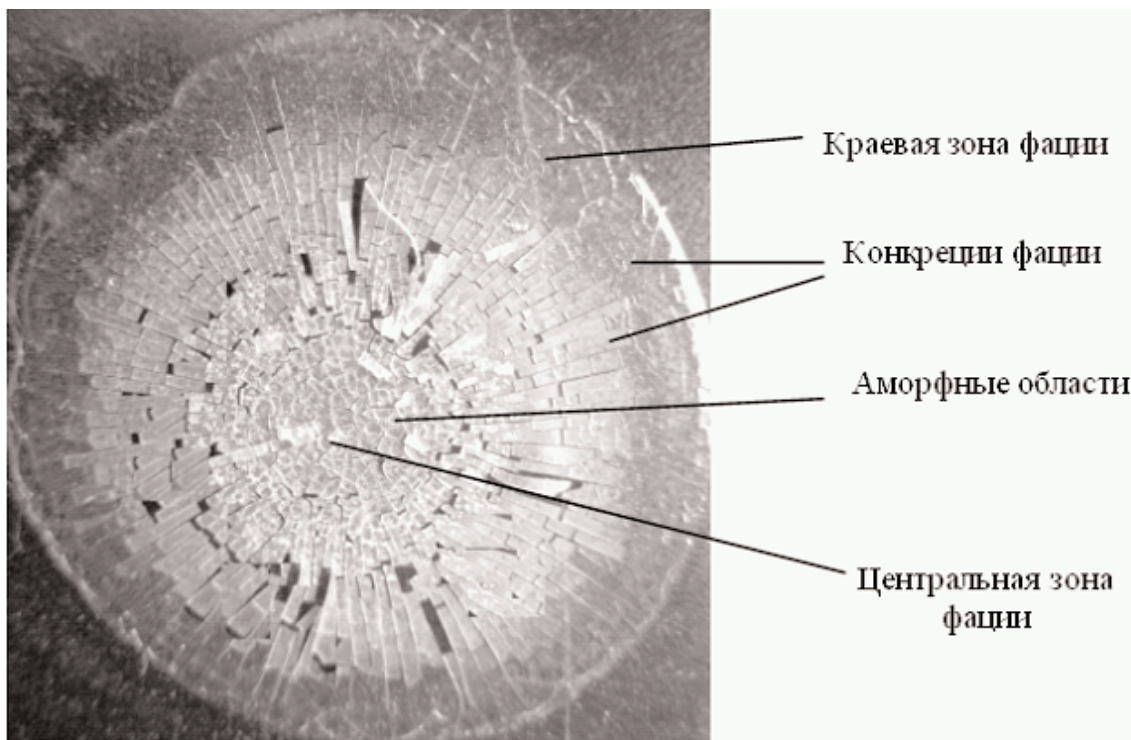


Рисунок 2.

Тезиограмма плазмы крови при интоксикации НДМГ в дозе 5 мг/кг.

## ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ДИМЕТИЛГИДРАЗИНОМ

Неоднотипный характер растрескивания фаций (равнорадиальный, разнорадиальный) ярко отражается и на неоднотипности форм и размеров отдельностей, а так же на порядке ветвления. Так, например, размеры отдельностей отличаются сильной вариабельностью. Как правило, низкая густота растрескивания и порядок ветвления (4-6) характерны для более крупных отдельностей. Высокий порядок ветвления (более 10) и густота растрескивания характерны для более мелких по размерам отдельностей. В отличие от контроля, начинают появляться аморфные области (в виде небольших участков) и в краевой зоне (40%). В целом, густота растрескивания очень высокая, а вот количество конкреций, по сравнению с контролем – низкое, и локализуются они преимущественно в краевой зоне.

В группе животных, подвергнутых острой интоксикации (однократному воздействию НДМГ в максимальной переносимой дозе), характер изменения тезиографической картины более существенный (см. рис. 3): более четко выражены признаки нарушения зональности и растрескивания фации. При этом характер растрескивания практически totally приобретает аморфный характер (90%). Отмечаются характерные типы патологических структур – системные и подсистемные аномалии. К основным системным нарушениям фаций плазмы крови относятся: потеря симметрии в расположении основных ее элементов (конкреций, отдельностей, трещин) (60%); изменение их формы (30%) или полное отсутствие (10%). К нарушениям подсистемного структуропостроения относятся аномальные поля единичных или множественных языковых структур (30%), "морщин" (60%), листовых структур (30%), структур типа "жгуты" (20%) и др.

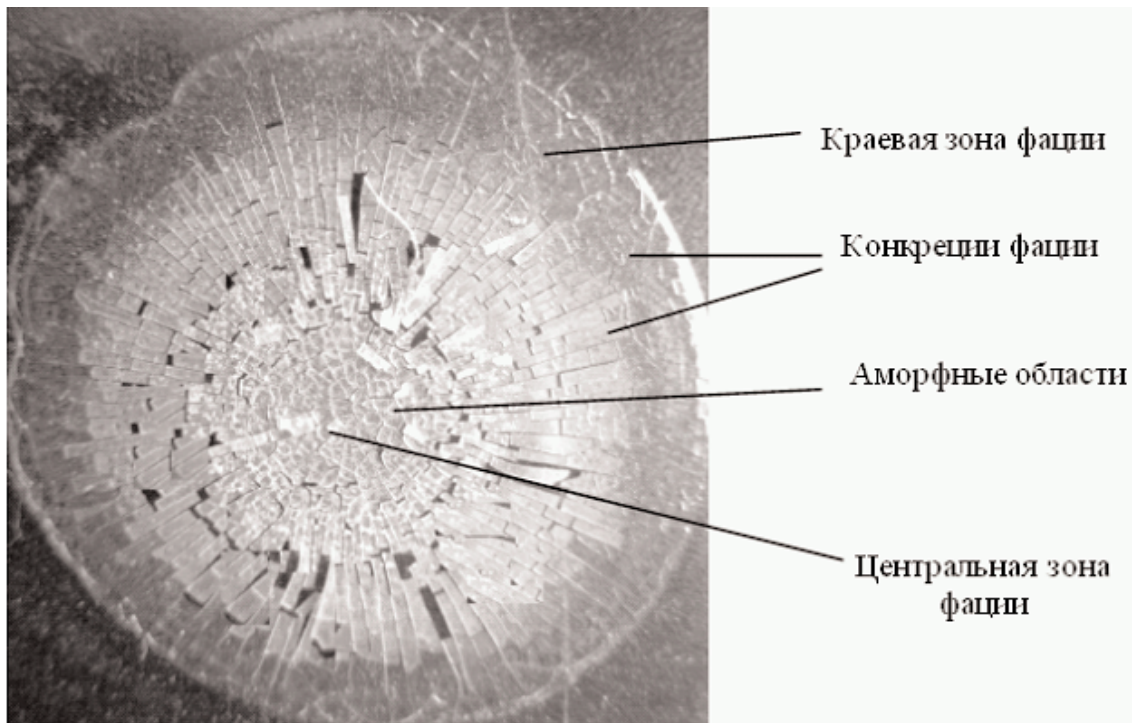


Рисунок 3.

Тезиограмма плазмы крови при интоксикации НДМГ в дозе 70 мг/кг.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Полученные нами результаты указывают на чёткие признаки окислительного повреждения липидов и белков в крови животных, подвергнутых действию НДМГ. При этом если эффект минимально действующей дозы токсиканта проявляется ростом лишь отдельных продуктов окислительной деградации липидов и белков, то максимально переносимая доза НДМГ вызывает значительное накопление продуктов ПОЛ в эритроцитах и продуктов ОМБ в плазме. Нами установлено, что характер нарушения структурообразующих свойств плазмы напрямую зависит от дозы вводимого токсиканта и коррелирует с уровнем окислительного стресса в организме животных. Кроме того, при оценке тизмограмм плазмы крови отмечается преобладание ряда патологических структур – нарушение симметрии, “морщины”, что по классификации, предложенной В.Н. Шабалиным и С.Н. Шатохиной [3], свидетельствует о преобладании деструктивных изменений со стороны белков плазмы.

Мы предполагаем, что нарушение структурообразующей функции плазмы крови крыс при гидразиновой интоксикации определяется изменением её качественного и количественного состава. Биомакромолекулы – белки, углеводы, липиды – обладают высокой осмоонкотической активностью и тем самым предопределяют специфическую структуру биологических жидкостей. При окислительном стрессе в первую очередь повреждаются наиболее подверженные окислительной деструкции молекулы – липиды и белки, что приводит как к изменению конформации самих биомолекул, так и к нарушению коллоидно-осмотических свойств плазмы в целом. По-видимому, данный механизм лежит в основе нарушения структурообразующих свойств плазмы крови при токсическом действии НДМГ на организм экспериментальных животных.

Таким образом, результаты нашего исследования указывают на возможность использования комплексного метода оценки окислительной деструкции липидов и белков крови, а также метода тизмографии для интегральной оценки токсического действия НДМГ на живой организм.

Настоящее исследование было проведено в соответствии с правилами GLP, в рамках НИР “Молекулярно-клеточные, системные изменения в растущем организме при действии производных гидразина и алиментарного дисбаланса. Разработка способов немедикоментозной коррекции”, № госрегистрации 0106PK00412, по гранту МОН РК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Куценко С.А. (2004) Основы токсикологии: научно-методическое издание, Издательство Фолиант, СПб.
2. Всемирная организация здравоохранения (1991) Гидразин. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Совместное издание Программы ООН, Женева.
3. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. (2002) Клиническая диагностика, №3, 25-29.
4. Ушкалова В.Н., Кадочникова Г.Д. (1987) Бюлл. экспер. биол. мед., №5, 571-573.
5. Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е. и др. (1991) Вопр. мед. химии, 37(4), 92-93.
6. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Леонова Н.В. и др. (2000) Вопр. мед. химии, 46, 398-409.
7. Авакян А.Х. (1990) Фармакол. и токсикол., 53(1), 70-73.

Поступила: 30. 08. 2006.

**OXIDATIVE METABOLISM AND CRYSTAL-FORMING PROPERTIES OF BLOOD OF THE EXPERIMENTAL ANIMALS SUBJECTED TO NONSYMMETRICAL DIMETHYLHYDRAZINE**

*I.R. Kulmagambetov, L.Ye. Muravleva, V.V. Koikov, Yu.E. Abdrahmanova*

Karaganda State Medical Academy, Gogolya ul., 36, Karaganda, 100008 Republic of Kazakhstan;  
tel.: (3212) 513479 (internal 117); e-mail: koykov@inbox.ru, muravlev@inbox.ru

We have studied parameters of oxidative metabolism and crystal-forming properties of the rat blood under conditions of intoxication by nonsymmetrical dimethylhydrazine (NDMH). We have found the increase of secondary and end-products of lipid peroxidation in blood erythrocytes 7 days after NDMH injection at a dose of 5 mg/kg. Administration of a higher dose of NDMH (70 mg/kg) results in essential accumulation of initial, secondary and end-products of lipid peroxidation in rat erythrocytes, accumulation of products of protein oxidative modification in blood plasma.

Studies of plasma crystal-forming properties have shown, that the increase of a dose of the injected toxicant causes the loss of ash value and symmetry in arrangement of basic elements of facies (concretions, separateness, cracks), changes of their shape or their full disappearance. There are abnormal fields (individual or plural tongue structures, "wrinkles", sheet structures, garrot-like structures etc.). Thus the bright picture of the plasma structure-forming properties is noted already at low NDMH doses.

The results obtained suggest close interrelation between the impairments of physical and chemical properties of blood plasma in experimental animals under conditions of toxic action of NDMH.

**Key words:** nonsymmetrical dimethylhydrazine, oxidative metabolism, lipid peroxidation, oxidative modification of protein, theziography.