

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco71342>

# Влияние субхронической интоксикации тирамом на активность антиоксидантных ферментов и состояние процессов липопероксидации

И.В. Королев, А.В. Седых, В.А. Королев, Е.В. Фелькер, О.А. Медведева, В.А. Ряднова, Е.В. Королев

Курский государственный медицинский университет, Курск, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

**Цель.** Изучение влияния окислительного стресса на систему антиоксидантной защиты и состояние перекисного окисления липидов организма.

**Материал и методы.** Моделирование окислительного стресса осуществляли на 240 крысах путём ежедневного введения тирама в дозе 1/50 LD50 (8 мг/кг массы тела) в рацион крыс на протяжении 4 недель. Проанализированы каталитическая активность супероксиддисмутазы, каталазы и концентрация малонового диальдегида, диеновых конъюгатов.

**Результаты.** Моделирование субхронической интоксикации привело к значимому снижению активности каталазы и супероксиддисмутазы ( $p < 0,05$ ) и повышению концентрации малонового диальдегида, диеновых конъюгатов в плазме крови, эритроцитарной массе и гомогенате печени. После проведения экспериментальной субхронической интоксикации были использованы следующие антиоксиданты: витамин Е в дозе 8,58 мг/кг и экстракт расторопши в дозе 13,74 мг/кг. Их применение в течение 30 суток значительно восстановило показатели активности супероксиддисмутазы и каталазы, а также снизило концентрацию малонового диальдегида и диеновых конъюгатов во всех исследуемых средах организма.

**Заключение.** Интоксикация фунгицидом тирамом приводит к формированию окислительного стресса. Использование витамина Е и экстракта расторопши способствует восстановлению прооксидантно-антиоксидантного баланса организма.

**Ключевые слова:** тирам; перекисное окисление липидов; антиоксидантная система; витамин Е; расторопша.

## Как цитировать:

Королев И.В., Седых А.В., Королев В.А., Фелькер Е.В., Медведева О.А., Ряднова В.А., Королев Е.В. Влияние субхронической интоксикации тирамом на активность антиоксидантных ферментов и состояние процессов липопероксидации // Экология человека. 2022. Т. 29, №2. С. 109–118.

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco71342>

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco71342>

# Effect of subchronic intoxication with thiram on the activity of antioxidant enzymes and the state of lipoperoxidation processes

Ivan V. Korolev, Anastasia V. Sedykh, Vladimir A. Korolev, Elena V. Felker, Olga A. Medvedeva, Vera A. Ryadnova, Egor V. Korolev

Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

## ABSTRACT

**AIM:** This study aimed to investigate the effect of oxidative stress on the antioxidant defense system and state of lipid peroxidation of the body.

**MATERIAL AND METHODS:** Modeling of oxidative stress was carried out on 240 rats by daily administration of thiram at a dose of 1/50 LD50 (8 mg/kg body weight) in the diet of rats for 4 weeks. The catalytic activity of superoxide dismutase and catalase and the concentration of malondialdehyde and diene conjugates were analyzed.

**RESULTS:** The modeling of subchronic intoxication significantly decreased the activity of catalase and superoxide dismutase ( $p < 0.05$ ) and increased the concentration of malondialdehyde, diene conjugates in blood plasma, erythrocyte mass, and liver homogenate. After experimental subchronic intoxication, antioxidants such as vitamin E at a dose of 8.58 mg/kg and milk thistle extract at a dose of 13.74 mg/kg were used. Using such antioxidants within 30 days had significantly restored the activity of superoxide dismutase and catalase, and it also reduced the concentration of malondialdehyde and diene conjugates in all investigated body media.

**CONCLUSION:** Fungicide intoxication with thiram affects redox homeostasis. In addition, the usage of vitamin E and milk thistle extract can restore the prooxidant–antioxidant balance of the body.

**Keywords:** thiram; lipid peroxidation; antioxidant system; vitamin E; milk thistle.

## To cite this article:

Korolev IV, Sedykh AV, Korolev VA, Felker EV, Medvedeva OA, Ryadnova VA, Korolev EV. Effect of subchronic intoxication with thiram on the activity of antioxidant enzymes and the state of lipoperoxidation processes. *Ekologiya cheloveka (Human Ecology)*. 2022;29(2):109–118.

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco71342>

Received: 06.07.2021

Accepted: 19.01.2022

Published: 26.05.2022

## ВВЕДЕНИЕ

Тирам (тетраметилтиурамдисульфид, ТМТД) представляет собой фунгицид контактного действия. Используется для борьбы с грибковыми заболеваниями сельскохозяйственных культур [1]. Тирам относится к среднетоксичным стойким пестицидам III класса опасности ( $LD_{50}$  400 мг/кг для крыс), обладает цитотоксичным действием [2]. Тирам приводит к образованию свободных радикалов в организме, что влечёт за собой формирование окислительного стресса [3–5].

Ферментативный уровень антиоксидантной защиты организма включает в себя такие ферменты, как каталазу (КАТ) и супероксиддисмутазу (СОД) [6, 7].

Каталаза представляет собой хромопроteid класса оксидоредуктаз, находящийся преимущественно в пероксисомах и цитоплазме клетки [8, 9]. Участвует в реакции разложения перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) — токсичного продукта утилизации молекулярного кислорода [6]. Каталаза предотвращает накопление перекиси водорода в клетках организма за счёт разложения  $H_2O_2$  до воды и кислорода [10].

Каталаза работает в комплексе с СОД, которая содержится во всех тканях организма. СОД является металлопротеидом [11], участвует в инактивации свободных радикалов в месте их образования [12, 13].

В результате окислительного стресса также происходит активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Под действием свободных радикалов происходит окислительная дегградация липидов, которая проявляется в увеличении содержания таких показателей, как малоновый диальдегид (МДА) и диеновые конъюгаты (ДК) [6].

Диеновые конъюгаты — это соединения, образующиеся в результате перегруппировки двойных связей в полиненасыщенных жирных кислотах (ПНЖК) во время свободнорадикального окисления липидов. Из образовавшихся ДК при дальнейшем воздействии на них гидроксильных радикалов образуются гидроперекиси липидов [8]. В местах присоединения перекисных радикалов жирные кислоты разрываются на фрагменты, обладающие высокой реакционной способностью [14]. Если разрыв происходит с двух сторон, образуется МДА, который представляет собой очень активное соединение [15].

Для купирования окислительного стресса клеток активно применяются антиоксидантные препараты, среди которых выраженные антиокислительные свойства отмечены у витамина Е и экстракта расторопши [16].

Витамин Е (токоферола ацетат) — это жирорастворимый витамин, который содержит в своей структуре  $\alpha$ -токоферол. Он входит в состав всех биологических мембран и обеспечивает химическую стойкость фосфолипидов к свободнорадикальному окислению, а также вовлечён в процессы тканевого дыхания, метаболизм белков, жиров и углеводов [17].

Расторопша представляет собой растительный антиоксидант. Действует как поглотитель, связывая некоторые разновидности реактивных форм кислорода, что препятствует перекисному окислению липидов мембран и таким образом модулирует их проницаемость [18].

**Цель.** Изучение влияния окислительного стресса на систему антиоксидантной защиты и состояние перекисного окисления липидов организма.

**Задачи:**

1. Оценить интенсивность процессов липопероксидации при интоксикации тиразом в сыворотке крови, печени и эритроцитах.

2. Выявить взаимосвязь между интоксикацией тиразом и активностью антиоксидантной системы (СОД, КАТ).

3. Разработать методы коррекции антиоксидантного статуса при интоксикации тиразом с использованием растительных антиоксидантов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для определения активности антиоксидантных ферментов использовали следующие коммерческие наборы: Catalase Assay Kit, 707002, 96 тестов (Cayman Chemical, USA); Superoxide Dismutases Assay Kit, 706002, 96 тестов (Cayman Chemical, USA); CEA597Ge ELISA Kit for Malondialdehyde (MDA) (Cloud-Clone Corp., USA) и CEA634Ge ELISA Kit for Diene Conjugates (Cloud-Clone Corp., USA). Остальные общие лабораторные материалы были получены от компании Helicon (Москва). Для проведения интоксикации использовали тираз (CAS Number: 137-26-8) чистотой 97% (Sigma-Aldrich, USA).

Эксперименты были проведены на 240 крысах-самцах линии Вистар возрастом 2 месяца с массой тела от 200 до 220 граммов, которые содержались на стандартном пищевом рационе в условиях вивария в осенне-зимний период. Для решения поставленных задач крысы были разделены на 8 групп по 30 животных в каждой группе [19]. В первую группу входили здоровые, интактные крысы, которые являлись биологическим контролем. В остальных группах моделировалась субхроническая интоксикация. Животные получали пестицид тираз вместе с гранулированным кормом 1 раз в день утром в дозе  $1/50 LD_{50}$  на протяжении 4 недель. При этом гранулы корма измельчали, после чего добавляли взвешенную дозу пестицида, перемешивали, добавляли 2 мл дистиллированной воды и сформированные гранулы высушивали на воздухе в течение 12 часов. Данный способ поступления в организм имеет ряд преимуществ в отличие от внутрижелудочного введения, так как служит моделью естественного поступления пестицида с пищей в организм, поэтому исключается физиологический стресс, который может повлиять на результаты эксперимента. Забор крови и печени производился на 7, 14, 21, 28-е сутки соответственно.

Животные группы 6 получали пестицид тирам вместе с пищей 1 раз в день в дозе  $1/50 LD_{50}$  (1,6 мг в перерасчёте на одно животное) на протяжении 28 дней, после чего животные были переведены на 30 суток на стандартный пищевой рацион. Данная группа была создана для оценки компенсаторных возможностей организма после интоксикации без фармакологической коррекции. В группе 7 моделировалась субхроническая интоксикация на протяжении 28 суток с последующим применением витамина Е в течение 30 суток. В перерасчёте на 1 кг веса человека необходимо 1,43 мг/кг препарата. Коэффициент пересчёта дозы с отдельного животного на человека составляет 39,0. Для крысы массой 200 грамм коэффициент пересчёта составляет 6,5 [20]. Следовательно, расчётная терапевтическая доза витамина Е для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составляет:  $(1,43 \times 39) / 6,5 = 8,58$  мг/кг. В группе 8 проводилась субхроническая интоксикация в течение 28 суток с последующим использованием экстракта расторопши, на протяжении 30 суток. В перерасчёте на 1 кг веса человека необходимо 2,29 мг/кг препарата [20]. Расчётная терапевтическая доза экстракта расторопши для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составляет:  $(2,29 \times 39) / 6,5 = 13,74$  мг/кг. В группах 7 и 8 антиоксиданты вводили вместе с гранулированным кормом, при этом алгоритм формирования гранул аналогичен формированию гранул с пестицидом.

Расчёт дозы препарата тирам выполнялся исходя из токсикологических данных:  $LD_{50}$  для крыс составляет 400 мг/кг. В связи с тем, что в эксперименте использовались дозы  $1/50 LD_{50}$ , после расчёта доза для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составила:  $400 \text{ мг/кг} / 50 = 8 \text{ мг/кг}$  [20].

Для исследования отбирали плазму крови, эритроцитарную массу и гомогенат печени экспериментального животного. Забой осуществляли декапитацией животных под эфирным наркозом. Забор крови производили с помощью пункции сердца. Кровь собирали в центрифужные пробирки с гепарином (25 ед/мл), а затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость, содержащую плазму, отбирали для дальнейшего анализа. Осадок эритроцитов ресуспендировали в 10,0 мл охлаждённого 0,9% раствора NaCl, затем клетки осаждали путём центрифугирования при 2000 об/мин в течение 5 минут. 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 взвешивали, затем измельчали и гомогенизировали с помощью пестикового гомогенизатора, добавляя при этом 0,1 М калий-фосфатный буфер с pH 7,4, предварительно охлаждённый до 0 °С, в соотношении «ткань-буфер»

1:6. Из полученных гомогенатов проводили отбор проб для дальнейших исследований. Пробы хранили при температуре минус 80 °С (низкотемпературный морозильник SUFsg 5001, Liebherr) в лабораторной зоне без дальнейшей транспортировки.

Исследование одобрено региональным этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол №7 от 30 ноября 2018 г.), выполнено с соблюдением этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием экспериментальных животных. (г. Страсбург, Франция, 1986).

### Каталаза (КАТ)

Активность каталазы определяли биохимическим методом в микропланшетном формате с помощью полуавтоматического биохимического анализатора Clima RAC (Испания). Диапазон измерения от 2 до 35 нмоль/мин/мл. Чувствительность составляла 2 нмоль/мин/мл. Длина волны измерения — 540 нм. Анализ основан на реакции фермента с метанолом в присутствии  $H_2O_2$ . Образующийся в реакции формальдегид детектируется колориметрически при взаимодействии с хромогеном 4-амино-3-гидразин-5-меркапто-1,2,4-триазол (Пурпальд), при котором происходит изменение бесцветной окраски на фиолетовую.

### Супероксиддисмутаза (superoxidedismutase — SOD)

Активность фермента определяли биохимическим методом с использованием тетразолиевой соли для выявления супероксидных радикалов, образованных ксантиноксидазой и гипоксантином, в микропланшетном формате с помощью полуавтоматического биохимического анализатора Clima RAC (Испания). Данный метод позволяет измерить активность всех трёх типов SOD (Cu/Zn, Mn и FeSOD). Длина волны измерения — 440–460 нм.

### Малоновый диальдегид (МДА)

Для определения концентрации МДА использовался метод конкурентного ингибирования с применением иммуноферментного анализа при длине волны 450 нм. Моноклональные антитела, специфичные к МДА, были предварительно нанесены на микропланшет. Реакция конкурентного ингибирования запускается между меченым биотином МДА и немеченым МДА с предварительно нанесёнными антителами, специфичными к МДА. После инкубации несвязанный конъюгат смывали. Затем авидин, конъюгированный пероксидазой хрена (HRP), добавляли в каждую лунку микроплшета и инкубировали с помощью микропланшетного ридера Variscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA). Количество связавшегося конъюгата HRP обратно пропорционально концентрации МДА в образце. Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации МДА в образце.

## Диеновые конъюгаты (ДК)

Содержание ДК определяли спектрофотометрическим методом. К исследуемым образцам объемом 0,5 мл, разведённым 5 мМ ТРИС-НСl буфером с pH 7,6 в соотношении 1:19, добавляли экстрагирующую смесь гептана с изопропиловым спиртом (1:1 по объёму) в количестве 4,5 мл. Далее активным встряхиванием в течение 5 минут пробы тщательно перемешивали, после чего отстаивали до образования чёткой границы между фазами. Затем отбирали гептановую (верхнюю) фазу в количестве 0,5 мл и добавляли к ней 96% этиловый спирт в количестве 2,5 мл. В кювете с длиной оптического пути 10 мм определяли оптическую плотность раствора против этилового спирта с гептаном (соотношение 5:1) при длине волны 233 нм с помощью полуавтоматического биохимического анализатора Clima RAC (Испания). С учётом разведения с использованием молярного коэффициента светопоглощения на указанной длине волны ( $\epsilon=2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ ) производили расчёт концентрации диеновых конъюгатов.

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 13.0» (StatSoft, USA). Результаты исследования представлены как среднее значение со стандартной ошибкой ( $M \pm m$ ). Для определения нормальности распределения признака использовали критерий Колмогорова–Смирнова [21]. Для определения статистически значимых различий между группами использовался t-критерия Стьюдента. Различия между группами считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение активности КАТ, СОД, а также количественного содержания МДА и ДК в плазме крови показало

значимые различия между контролем и значениями, полученными при моделировании субхронической интоксикации тирамом (табл. 1).

Значительное снижение активности КАТ и СОД наблюдалось после приёма лабораторными животными тирама в течение 28 суток (группа 5) в 1,8 и 1,4 раза, соответственно, в сравнении со значениями группы 1. В группе 6 наблюдалось незначительное увеличение активности исследуемых показателей в 1,2 и 1,1 раз, соответственно, в сравнении с 5-й группой. Применение антиоксидантов, т.е. витамина Е и экстракта расторопши, привело к восстановлению активности КАТ. Так, активность показателя увеличилась в 1,7 и 1,6 раз в сравнении со значениями 5-й группы. Применение выбранных антиоксидантов в группах 7 и 8 привело к восстановлению активности СОД в 1,6 и 1,4 раза, соответственно, в сравнении со значениями группы 5. При исследовании МДА и ДК отмечалась обратная тенденция. На протяжении всего периода моделирования субхронической интоксикации содержание МДА и ДК росло. На 28-й день субхронической интоксикации полученные значения увеличились в 2,5 и 2,7 раза, соответственно, по отношению к контролю. Переход к стандартному рациону незначительно изменил показатели МДА и ДК в сторону восстановления: по отношению к группе 5. Значения, полученные при переходе к стандартному рациону, снизились в 1,1 раза в обеих исследуемых группах. В сравнении со значениями группы 5 содержание ДК снизилось в 2,6 раза в группах 7 и 8, а содержания МДА — в 2,4 и 1,6 раз, соответственно.

Исследование гомогената печени экспериментальных животных показало снижение активности КАТ, СОД и увеличение содержания ДК, МДА на протяжении всего периода моделирования субхронической интоксикации тирамом (табл. 2).

**Таблица 1.** Влияние тирама на показатели активности КАТ, СОД и содержание МДА и ДК в плазме крови крыс,  $M \pm m$

**Table 1.** Influence of thiram on the activity of CAT and SOD and content of MDA and DC in the blood plasma of rats,  $M \pm m$

Показатель Indicator	Каталаза, мкат/л Catalase, mcat/l	СОД, у.е. SOD, с. у.	ДК, мкмоль/л DK, $\mu\text{mol/l}$	МДА, моль/л MDA, $\mu\text{mol/l}$
Группа 1. Контроль	11,99±1,24	17,12±1,72	0,27±0,03	1,12±0,16
Группа 2. Интоксикация 7-е сутки	10,36±1,11	16,98±1,71	0,38±0,04*	1,68±0,19*
Группа 3. Интоксикация 14-е сутки	8,04±0,87*	14,82±1,52	0,44±0,05**	1,84±0,22*
Группа 4. Интоксикация 21-е сутки	7,16±0,85***	13,93±1,47	0,63±0,08***	2,15±0,22***
Группа 5. Интоксикация 28-е сутки	6,82±0,80***	12,11±1,24*	0,72±0,10***	2,80±0,28***
Группа 6. Интоксикация+стандартный рацион	7,96±0,89	13,30±1,34	0,64±0,08	2,55±0,25
Группа 7. Интоксикация+витамин Е	12,21±1,18 <sup>xx</sup>	18,99±2,06 <sup>xx</sup>	0,24±0,03 <sup>xxx</sup>	1,15±0,11 <sup>xxx</sup>
Группа 8. Интоксикация+экстракт расторопши	11,13±1,14 <sup>xx</sup>	17,28±1,97 <sup>x</sup>	0,28±0,03 <sup>xxx</sup>	1,70±0,21 <sup>xx</sup>

Здесь и в табл. 2, 3: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с группой «контроль (стандартный рацион)»;  
<sup>x</sup>  $p < 0,05$  по сравнению с группой «тирама 28 сут»,  
<sup>xx</sup>  $p < 0,01$  по сравнению с группой «тирама 28 сут»,  
<sup>xxx</sup>  $p < 0,001$  по сравнению с группой «тирама 28 сут».

Here and in the Tables 2, 3: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared to the group «control (standard diet)»,  
<sup>x</sup>  $p < 0.05$  compared to the group «tiram 28 days»,  
<sup>xx</sup>  $p < 0.01$  compared to the group «tiram 28 days»,  
<sup>xxx</sup>  $p < 0.001$  compared to the group «tiram 28 days».

Максимальное снижение активности КАТ и СОД наблюдалось в группе 5 по отношению к контролю — в 2,3 и 2,4 раза, соответственно. При переходе на стандартный рацион наблюдалось незначительное увеличение активности исследуемых показателей, а именно, в 1,3 и 1,4 раза, соответственно, в сравнении с группой 5. Применение витамина Е привело к восстановлению активности КАТ в 2,3 раза в сравнении с группой 5. В группе 8 отмечалось значительное восстановление КАТ и СОД: в 2,2 и 2,1 раз, соответственно, в сравнении с группой 5. Противоположные результаты отмечались при исследовании МДА и ДК. На протяжении всего периода моделирования субхронической интоксикации содержание МДА и ДК росло, и в группе 5 полученные значения увеличились в 1,9 и 4,9 раза соответственно по отношению к контролю. Переход к стандартному рациону незначительно изменил показатели МДА и ДК в сторону восстановления: по отношению к группе 5 значения, полученные в группе 6, снизились в 1,2 и 1,1 раза соответственно. Применение витамина Е и экстракта расторопши привело к значительному восстановлению изучаемых показателей липопероксидации. В сравнении с группой 5 содержание ДК в группах

7 и 8 снизилось в 3,6 и 3,1 раза соответственно. Содержание МДА в группах 7 и 8 снизилось в 1,6 и 1,5 раза соответственно в сравнении со значениями исследуемых показателей в группе 5.

Определение активности КАТ, СОД, а также количественного содержания МДА и ДК в эритроцитарной массе крови лабораторных животных, показало значимые изменения определяемых показателей, полученных при моделировании субхронической интоксикации тирамом, в сравнении с контрольной группой (табл. 3).

На 28-й день субхронической интоксикации тирамом отмечалось значительное снижение активности КАТ и СОД в 2,3 и 1,6 раза соответственно в сравнении со значениями группы 1. В группе 6 наблюдалось незначительное увеличение активности исследуемых показателей в 1,2 и 1,1 раза, в сравнении с группой 5. Применение растительного антиоксиданта, витамина Е, привело к восстановлению активности КАТ в 2,3 раза в сравнении с группой 5. В группе 7 было отмечено восстановление активности СОД в 1,5 раз в сравнении со значением показателя в группе 5. Восстановление активности КАТ и СОД наблюдалось и в группе 8 — в 1,7 и 1,4 раза соответственно

**Таблица 2.** Влияние тирама на показатели активности КАТ, СОД и содержание МДА и ДК в гомогенате печени крыс,  $M \pm m$

**Table 2.** Influence of thiram on the activity of CAT and SOD and content of MDA and DC in rat liver homogenate,  $M \pm m$

Показатель Indicator	Каталаза, мкмоль/г Catalase, $\mu\text{mol/g}$	СОД, у.е. SOD, с. у.	ДК, ед. оптич. плотности/мг,	МДА, нмоль/мл MDA, $\text{nmol/ml}$
Группа 1. Контроль	7,28±0,84	12,13±1,26	0,19±0,02	0,98±0,13
Группа 2. Интоксикация 7-е сутки	5,39±0,57	9,19±0,96	0,42±0,05***	1,56±0,21*
Группа 3. Интоксикация 14-е сутки	4,13±0,59**	7,77±0,94**	0,68±0,10***	1,73±0,18***
Группа 4. Интоксикация 21-е сутки	3,86±0,51***	6,25±0,70***	0,85±0,09***	1,84±0,19***
Группа 5. Интоксикация 28-е сутки	3,16±0,40***	5,01±0,59***	0,94±0,14***	1,92±0,20***
Группа 6. Интоксикация+стандартный рацион	4,32±0,46	7,14±0,86	0,82±0,09	1,63±0,18
Группа 7. Интоксикация+витамин Е	7,39±0,81 <sup>xxx</sup>	11,98±1,28 <sup>xxx</sup>	0,26±0,03 <sup>xxx</sup>	1,15±0,16 <sup>xx</sup>
Группа 8. Интоксикация+экстракт расторопши	6,94±0,82 <sup>xxx</sup>	10,72±1,10 <sup>xxx</sup>	0,30±0,04 <sup>xxx</sup>	1,21±0,13 <sup>xx</sup>

**Таблица 3.** Влияние тирама на показатели активности КАТ, СОД и содержание МДА и ДК в эритроцитарной массе крови крыс,  $M \pm m$

**Table 3.** Influence of thiram on the activity of CAT and SOD and content of MDA and DC in the erythrocyte mass of rat blood,  $M \pm m$

Показатель	Каталаза, ммоль/мин×г Нв	СОД, ммоль/мин×г Нв	ДК, усл. ед./мг белка	МДА, нмоль/г Нв
Группа 1. Контроль	7,10±0,86	6,34±0,68	0,06±0,00	0,24±0,03
Группа 2. Интоксикация 7-е сутки	6,86±0,77	5,11±0,62	0,09±0,01*	0,31±0,04
Группа 3. Интоксикация 14-е сутки	6,23±0,69	4,89±0,61***	0,12±0,01***	0,42±0,05**
Группа 4. Интоксикация 21-е сутки	4,25±0,48**	4,59±0,57***	0,13±0,01***	0,97±0,10***
Группа 5. Интоксикация 28-е сутки	3,11±0,35***	3,92±0,40***	0,24±0,03***	1,86±0,18***
Группа 6. Интоксикация+стандартный рацион	3,62±0,39	4,16±0,52	0,19±0,02	1,26±0,13 <sup>x</sup>
Группа 7. Интоксикация+витамин Е	7,30±0,74 <sup>xxx</sup>	6,21±0,68 <sup>xx</sup>	0,06±0,00 <sup>xxx</sup>	0,29±0,04 <sup>xxx</sup>
Группа 8. Интоксикация+экстракт расторопши	5,39±0,68 <sup>xx</sup>	5,69±0,61 <sup>x</sup>	0,11±0,01 <sup>xxx</sup>	0,32±0,04 <sup>xxx</sup>

в сравнении со значениями группы 5. При исследовании МДА и ДК отмечалась обратная тенденция. На протяжении всего периода моделирования субхронической интоксикации содержание МДА и ДК росло. В группе 5 полученные значения увеличились в 7,7 и 4 раза соответственно по отношению к контролю. Переход к стандартному рациону незначительно изменил показатели МДА и ДК в сторону восстановления. Так, по отношению к группе 5 значения, полученные в группе 6, снизились в 1,5 и 1,3 раза соответственно. Применение витамина Е восстановило содержание ДК в эритроцитарной массе крови в 4 раза в сравнении с группой 5. В группе 7 при анализе содержания МДА было отмечено снижение показателя в 6,4 раза в сравнении с группой 5.

В группе 8 применение экстракта расторопши показало значительный восстановительный эффект. В группе 8 было отмечено снижение содержания ДК в 2,1 раза, а МДА — в 5,8 раза в сравнении со значениями показателей в группе 5.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Поступление в организм тирама оказывает токсическое воздействие в том числе за счёт образования активных форм кислорода [22, 23]. Подавление образования свободных радикалов происходит за счёт выработки антиоксидантных ферментов, к которым относят супероксиддисмутазу и каталазу. Результаты исследования показывают, что моделирование субхронической интоксикации фунгицидным препаратом тирамом на протяжении 28 суток приводит к значительному снижению активности КАТ и СОД, а также к увеличению количественного содержания МДА и ДК ( $p < 0,05$ ) в трёх анализируемых биоматериалах: плазме крови, гомогенате печени и эритроцитарной массе крыс. Использование антиоксидантных препаратов витамина Е и расторопши в течение 28 суток после применения пестицидного препарата тирама, значительно восстанавливало показатели активности и концентрацию исследуемых показателей. Однако контрольные значения в группах коррекции были достигнуты не во всех исследуемых образцах.

Накопление тирама и длительная стимуляция свободнорадикального окисления привели к снижению активности исследованных антиоксидантных ферментов в ткани печени, плазме крови и эритроцитарной массе (СОД, КАТ) по сравнению с контролем. В условиях избыточного образования свободных радикалов (субхроническая интоксикация) происходит подавление активности ферментов во всех анализируемых образцах в результате их активного потребления. Одновременно вследствие изменения кровотока в капиллярах нарушается поступление новых антиоксидантов [24]. Нами показано, что в печени, которая является органом-мишенью ксенобиотиков, под влиянием тирама наблюдается наиболее выраженное угнетение активности СОД, что, по-видимому, обусловлено её ингибированием при накоплении продуктов

ПОЛ, а также возможными структурными изменениями молекулы фермента, в частности, её гликированием [25]. Супероксиддисмутазу ускоряет диспропорционирование супероксидных радикалов в  $O_2$  и  $H_2O_2$  с последующим их превращением в  $H_2O$  в пероксиосомах. Этот процесс происходит при помощи каталазы [26]. Снижение активности СОД происходит также при применении других пестицидов, например, хлорпирифоса в дозе  $1/10 LD_{50}$ . Уровень защиты клетки от окислительного стресса сильно варьирует в зависимости от активности и баланса данных исследуемых антиоксидантных ферментов [27].

Основным звеном действия тирама является изменение клеточного окислительного статуса. Также истощение антиоксидантной системы пестицидом приводит к усиленному производству супероксидных радикалов, что может привести к процессам окисления белков и перекисному окислению липидов, так как ОН радикал является очень реактивной молекулой, которая может связывать и окислять липиды и белки [28]. Полученные данные показывают, что у животных с субхронической интоксикацией тирамом отмечается увеличение концентрации промежуточных и конечных продуктов ПОЛ во всех исследованных биологических средах организма.

Отмечено, что переход к стандартному рациону животных после субхронической интоксикации позволяет незначительно улучшить значения всех исследуемых показателей. Это является следствием включения компенсаторных механизмов организма, направленных на борьбу с негативными последствиями окислительного стресса.

Применение витамина Е и экстракта расторопши оказывает выраженное антиоксидантное действие на изучаемые показатели: происходит уменьшение концентрации продуктов ПОЛ и увеличение активности каталазы и СОД как в плазме крови, так и в гомогенате печени и в эритроцитарной массе. Полученные результаты позволяют рекомендовать витамин Е и экстракт расторопши в качестве средств коррекции окислительного стресса [8, 22]. В нашем исследовании значительное восстановление исследуемых показателей было отмечено при применении витамина Е, что подтверждает его высокие антиоксидантные свойства [29].

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ/ ADDITIONAL INFO

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: В.А. Королев, О.А. Медведева — концепция, дизайн, организация исследования; Е.В. Фелькер — концепция и дизайн исследования; А.В. Седых и В.А. Ряднова — сбор данных; И.В. Королев, Е.В. Королев — статистическая обработка данных; В.А. Ряднова и И.В. Королев — анализ литературы; А.В. Седых — подготовка первоначального варианта рукописи.

**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Author contribution.** All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication). The greatest contribution is distributed as follows: Korolev V.A.,

Medvedeva O.A. — concept, design, organization of research; Felker E.V. — concept and design of research; Sedykh A.V., Ryadnova V.A. — data collection; Korolev I.V., Korolev E.V. — statistical data processing; Ryadnova V.A., Korolev I.V. — literature analysis; Sedykh A.V. — preparation of the initial version of the manuscript.

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Competing interests.** The authors declares that there are no obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

## ЛИТЕРАТУРА

- Kong A., Zhang C., Cao Y., et al. The fungicide thiram perturbs gut microbiota community and causes lipid metabolism disorder in chickens // *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020. N 206. P. 1-12.
- International Agency for Research on Cancer. IARC working group, Thiram. In: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1991. N 53. P. 403–422.
- Chandra J., Samali A., Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress // *Free Radical Biol. Med.* 2000. N 29. P. 323–333.
- Doyotte A., Cossou C., Jacquin M.C., et al. // *Aquat. Toxicol.*, 1997. N 39. P. 93–110.
- Elskens M.T., Penninckx M.J. Thiram and dimethyldithiocarbamic acid interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a possible metabolic pathway under the control of the glutathione redox cycle // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. N 63. P. 2857–2862.
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово. 2006. 556 с.
- Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // *Успехи современного естествознания*. 2006. № 7. С. 29–36.
- Шаповал Г.С., Громовая В.Ф. Механизмы антиоксидантной защиты организма при действии активных форм кислорода // *Укр. біохім. журн.* 2003. Т. 75. № 2. С. 5–13.
- Albasher G., Almeer R., Al-Otibi F.O., et al. Ameliorative effect of beta vulgaris root extract on chlorpyrifos-induced oxidative stress, inflammation and liver injury in rats // *Biomolecules*. 2019. Vol. 9, N 7. P. 261.
- Долгарева С.А., Сиделева Е.Н., Бушмина О.Н. Фармакологическая коррекция нарушений, вызванных развитием оксидантного стресса в условиях экспериментального острого деструктивного панкреатита на фоне хронической алкогольной интоксикации // *Innova*. 2017. Т. 4, № 9. С. 27–29.
- Winterbourn C.C. Superoxide as an intracellular radical sink // *Free Radical Biology and Medicine*. 1993. N 14. P. 85–90.
- Landis G.N., Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation // *Mech. Ageing Dev.* 2005. N 126. P. 365–379.
- Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxide and oxygen derived free radical // *Mech. Ageing Dev.* 1990. N 51. P. 283–297.
- Лазаренко В.А., Ляшев Ю.Д., Шевченко Н.И. Влияние синтетического аналога индолицидина на процессы перекисного окисления липидов при термических ожогах // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014. Т. 157. № 4. С. 443–445.
- Hamdi H., Othmène Y.B., Ammar O., et al. Oxidative stress, genotoxicity, biochemical and histopathological modifications induced by epoxiconazole in liver and kidney of Wistar rats // *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019. N 17. P. 17535–17547.
- Ibuki F.K., Bergamaschi C.T., da Silva Pedrosa M., Nogueira F.N. Effect of vitamin C and E on oxidative stress and antioxidant system in the salivary glands of STZ-induced diabetic rats // *Archives of Oral Biology*. 2020. N 116. P. 1-8. Art.104765.
- Baba N., Raina R., Verma P., et al. Ameliorative effect of vitamin C and E on hematological alterations induced by chlorpyrifos alone and in conjunction with fluoride in Wistar rats // *J Exp Integr Med.* 2013. N 3. P. 213–218.
- Тутельян А.В. Сравнительная оценка антиоксидантных свойств иммунорегуляторных препаратов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2003. Т. 136. № 8. С. 179–183.
- 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.
- Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина. 2005. 832 с.
- Руброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера. 2002. 312 с.
- 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. N 6. P. 593–597.
- Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers // *Toxicol. Lett.* 1999. N 107. P. 33–47.
- Amstad P., Moret R., Cerutti P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu, Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress // *J. Biol. Chem.* 1994. N 269. P. 1606–1609.
- Biswas S.K., Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutation // *Mol. Aspects Med.* 2009. N 30. P. 60–76.
- Королев В.А., Ляшев Ю.Д., Грибач И.В., Кирищева Н.Е. 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. С. 19–22.

27. Kozer E., Evans S., Barr J., et al. Glutathione, glutathione-dependent enzymes and antioxidant status in erythrocytes from children treated with high-dose paracetamol // *Br J Clin Pharmacol*. 2003. N 3. P. 234–240.
28. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer // *Chemico-Biological Interactions*. 2006. N 160. P. 1–40.
29. Данилова А.Э., Сорокин А.В., Долгарева С.А. Функционально-метаболическая активность эритроцитов в условиях экспериментального острого деструктивного панкреатита на фоне хронической алкогольной интоксикации // *Innova*. 2018. № 4 (13). С. 39–42.

## REFERENCES

1. Kong A, Zhang C, Cao Y, et al. The fungicide thiram perturbs gut microbiota community and causes lipid metabolism disorder in chickens. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;206:1–12.
2. International Agency for Research on Cancer. IARC working group, Thiram. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1991;53:403–422.
3. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biol. Med*. 2000;29:323–333.
4. Doyotte A, Cossou C, Jacquin MC, et al. *Aquat. Toxicol.*, 1997; 39:93–110.
5. Elskens MT, Penninckx MJ. Thiram and dimethyldithiocarbamic acid interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a possible metabolic pathway under the control of the glutathione redox cycle. *Appl. Environ. Microbiol*. 1997;63:2857–2862.
6. Menshchikova EB, Lankin VZ, Zenkov NK. *Oxidative stress. Prooxidants and Antioxidants*. Moscow: Slovo. 2006;556 p. [In Russ].
7. Chesnokova NP, Ponukalina EV, Bizenkova MN. Molecular cell mechanisms of free radicals inactivation in biological systems. *Uspekhi sovremennoego estestvoznaniya*. 2006;7:29–36. [In Russ].
8. Shapoval GS, Gromovaya VF. Mechanisms of the body's antioxidant defense under the action of reactive oxygen species. *Ukr. Biochem. J*. 2003;75(2):5–13.
9. Albasher G, Almeer R, Al-Otibi FO, et al. Ameliorative effect of beta vulgaris root extract on chlorpyrifos-induced oxidative stress, inflammation and liver injury in rats. *Biomolecules*. 2019;9(7):261.
10. Dolgareva SA, Sideleva EN, Bushmina ON. Pharmacological correction of disorders caused by the development of oxidative stress in conditions of experimental acute destructive pancreatitis against the background of chronic alcohol intoxication. *Innova*. 2017;4(9):27–29. [In Russ].
11. Winterbourn CC. Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993;14:85–90.
12. Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev*. 2005;126:365–379.
13. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxide and oxygen derived free radical. *Mech. Ageing Dev*. 1990;51:283–297.
14. Lazarenko VA, Lyashev YuD, Shevchenko NI. Influence of the synthetic analogue of indolicidine on the processes of lipid peroxidation during thermal burns. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 2014;4:443–445. [In Russ].
15. Hamdi H, Othmène YB, Ammar O, et al. Oxidative stress, genotoxicity, biochemical and histopathological modifications induced by epoxiconazole in liver and kidney of Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;17:17535–1754.
16. Ibuki FK, Bergamaschi CT, da Silva Pedrosa M, Nogueira FN. Effect of vitamin C and E on oxidative stress and antioxidant system in the salivary glands of STZ-induced diabetic rats. *Archives of Oral Biology*. 2020;116:1–8. Art.104765.
17. Baba N, Raina R, Verma P, Sultana M, Malla R. Ameliorative effect of vitamin C and E on hematological alterations induced by chlorpyrifos alone and in conjunction with fluoride in Wistar rats. *J Exp Integr Med*. 2013;3:213–218.
18. Tutelyan AV. Comparative assessment of antioxidant properties of immunoregulatory drugs. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2003;136(8):179–183. [In Russ].
19. Makarova MN, Shekunova EV, Rybakova AV, Makarov VG. Sample size of laboratory animals for experimental studies. *Farmaciya*. 2018; 2:3–8. [In Russ].
20. Habriev RU. *Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological agents*. M.: Medicina. 2005, 832 p. [In Russ].
21. Rebrova OYu. *Statistical analysis of statistical data. Application of the application package STATISTICA*. M.: MediaSfera. 2002;312 p. [In Russ].
22. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radical Biol. Med*. 1989;6:593–597.
23. Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett*. 1999;107:33–47.
24. Amstad P, Moret R, Cerutti P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu, Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. *J. Biol. Chem*. 1994;269:1606–1609.
25. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol. Aspects Med*. 2009;30:60–76.
26. Korolev VA, Lyashev YuD, Gribach IV, Kirishcheva NE. Changes in the prooxidant-antioxidant balance in chronic intoxication with bankcol and the effectiveness of preventive measures with the use of Mexidol. *Kurskii nauchno-prakticheskii vestnik "Chelovek i ego zdorove"*. 2014;2:19–22. [In Russ].
27. Kozer E, Evans S, Barr J, et al. Glutathione, glutathione-dependent enzymes and antioxidant status in erythrocytes from children treated with high-dose paracetamol. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;3:234–240.
28. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;160:1–40.
29. Danilova AE, Sorokin AV, Dolgareva SA. Functional and metabolic activity of erythrocytes in conditions of experimental acute destructive pancreatitis against the background of chronic alcohol intoxication. *Innova*. 2018;4(13):39–42. [In Russ].

## ОБ АВТОРАХ

**Королев Иван Владимирович**, студент медицинского университета; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6335-4311>; eLibrary SPIN: 2312-4617; e-mail: korolevva@kursksmu.net

**Седых Анастасия Валерьевна**, научный сотрудник, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6117-0666>; eLibrary SPIN: 3374-3900; e-mail: turquoise95@mail.ru

**\*Королев Владимир Анатольевич**, доктор биологических наук, профессор; адрес: Россия, 305029, г. Курск, ул. Карла Маркса, д. 3; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4376-4284>; eLibrary SPIN: 1180-1442, e-mail: medecol1@yandex.ru

**Фелькер Елена Викторовна**, кандидат медицинских наук, доцент; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7948-7290>; eLibrary SPIN: 7168-7321; e-mail: felkerev@kursksmu.net

**Медведева Ольга Анатольевна**, доктор биологических наук, доцент; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2889-155X>; eLibrary SPIN: 4394-4097; e-mail: medvedevaoa@kursksmu.net

**Ряднова Вера Анатольевна**, научный сотрудник; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3872-198>; eLibrary SPIN: 5629-4557; e-mail: veraan@ya.ru

**Королев Егор Владимирович**, студент медицинского университета; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3324-8689>; eLibrary SPIN: 1056-3721; e-mail: korolevva@kursksmu.net

## AUTHORS INFO

**Ivan V. Korolev**, MD, medical university student; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6335-4311>; eLibrary SPIN: 2312-4617; e-mail: korolevva@kursksmu.net

**Anastasia V. Sedykh** researcher; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6117-0666>; eLibrary SPIN: 3374-3900; e-mail: turquoise95@mail.ru

**\*Vladimir A. Korolev**, Dr. Sci. (Biol.), Professor; address: 3 Karl Marks street, 305029 Kursk, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4376-4284>; eLibrary SPIN: 1180-1442, e-mail: medecol1@yandex.ru

**Elena V. Felker**, MD, PhD; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7948-7290>; eLibrary SPIN: 7168-7321; e-mail: felkerev@kursksmu.net

**Olga A. Medvedeva**, Dr. Sci. (Biol.), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2889-155X>; eLibrary SPIN: 4394-4097; e-mail: medvedevaoa@kursksmu.net

**Vera A. Ryadnova** reseacher; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3872-198>; eLibrary SPIN: 5629-4557; e-mail: veraan@ya.ru

**Egor V. Korolev**, MD, medical university student; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3324-8689>; eLibrary SPIN: 1056-3721; e-mail: korolevva@kursksmu.net

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author