

УДК 612.014.1+612.014.46):615.212.7  
DOI: 10.24061/1727-0847.21.3.2022.33

**Є. В. Пальтов, З. З. Масна\*, Н. О. Горбова\*\***

*Кафедри нормальної анатомії (зав. – проф. Л. Р. Матешук-Вацеба), \*оперативної хірургії з топографічною анатомією (зав. – проф. З. З. Масна) Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; \*\*Львівська медична академія імені Андрея Крупинського*

## ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В НОРМІ ТА ДИНАМІКА ЇХ ЗМІН НА РІЗНИХ ТЕРМІНАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПІОЇДНОГО ВПЛИВУ

**Резюме.** У сучасному світі існує значна кількість екзогенних чинників, що сприяють виникненню порушень, пов'язаних зі зміною біохімічних показників. Одним з таких чинників є довготривале вживання опіоїдних анальгетиків з лікувальною метою, а також вживання препаратів опіоїдного ряду без медичних на то показань людьми, що належать до категорії наркозалежних. Усе частіше лікарі різного профілю зіштовхуються з проблемою лікування різних нозологій у людей з опіоїдною залежністю. Це різко утруднює процеси корекції основної патології за рахунок наслідків, що виникають при хронічному вживанні препаратів опіоїдного ряду. *Мета дослідження* – з'ясувати динаміку зміни показників оксидативного стресу крові щурів у нормі та впродовж субхронічного та хронічного експериментального опіоїдного впливу. *Матеріал і методи.* Матеріалом дослідження слугували статевозрілі, безпородні щури-самці в кількості 38 тварин, масою 160,0-270,0 г, віком 4,5-7,5 місяців. Тваринам проводили ін'єкції препарату налбуфін внутрішньом'язово, щоденно 1 раз на добу в одному проміжку часу (10-11 година ранку) упродовж 70 діб. Початкова доза налбуфіну впродовж перших 2-х тижнів становила 0,212 мг/кг, наступних 2 (II-IV тижня) – 0,225 мг/кг, наступна (IV-VI тижня) – 0,252 мг/кг, наступна (VI-VIII тижня) – 0,260 мг/кг, а впродовж (VIII-X тижня) – 0,283 мг/кг. У такий спосіб створювали умови хронічного опіоїдного впливу. *Результати дослідження та їх обговорення.* У результаті проведеного нами експериментального дослідження впливу опіоїдного анальгетика на показники оксидативного стресу крові щурів наприкінці 2-го тижня спостерігали недостовірне збільшення малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів з достовірним зниженням показника церулоплазміну. Наприкінці 6-го тижня введення опіоїдного анальгетика простежували стійку тенденцію до продовження збільшення малонового діальдегіду й дієнових кон'югатів та подальше зниження показника церулоплазміну. Усі показники мали статистично доведену різницю за порівнянням із контрольною групою. Після 10 тижнів експериментального опіоїдного впливу у тварин експериментальної групи всі показники продовжували попередньо виявлену динаміку та досягли максимального значення різниці порівняно із контрольною групою. *Висновки.* Проведені дослідження дають змогу з'ясувати особливості зміни показників оксидативного стресу крові щурів у субхронічний та хронічний періоди експериментального опіоїдного впливу.

**Ключові слова:** опіоїд, оксидативний стрес, субхронічний та хронічний періоди, щур.

Велика кількість зовнішніх токсичних чинників сприяє виникненню порушення біохімічного статусу організму. Відомо, що вільно радикальне окиснення відіграє важливу роль у підтримці транспорту електронів у дихальному ланцюзі, індукції утворення пор у мітохондріальній мембрані, які регулюють спряження дихання з окисним фосфорилуванням і лежить в основі окисних процесів у мітохондріях. Окисні процеси за участю активованих кисневих метаболітів – це невід'ємна частина існування вищих форм живих організмів. [1-3]. Встановлено, що при екстремальних впливах

в організмі активуються окисно-відновлювальні процеси, які спричиняють утворення ліпо- і гідропероксидів, подальше розкладання яких сприяє утворенню ендogenous кисню, необхідного для життєдіяльності. [2, 3]. Супероксид є одним із основних прооксидантів у клітині, тому супероксиддисмутаза відіграє ключову роль у антиоксидантному захисті організму. Функція каталази полягає у руйнуванні токсичного пероксиду водню, який утворюється у процесі різних окисних реакцій в організмі [4]. Досі залишається відкритим ряд питань, що стосуються зіставлення патоморфоло-

гічних проявів ангіоретинопатії зі зміною показників оксидативного стресу в нормі та на різних термінах експериментального опіоїдного впливу.

Саме тому метою нашого дослідження стало вивчення змін вільнорадикального окислення та антиоксидантного захисту та їх вплив на шари сітківки та ланки її гемомікроциркуляторного русла ока щура при експериментальному опіоїдному впливі.

Враховуючи вищезазначене, вважаємо, що наше дослідження є актуальним як з точки зору експериментальної морфології, так і з точки зору практичної офтальмології.

**Мета дослідження:** з'ясувати динаміку зміни показників оксидативного стресу крові щурів у нормі та в продовж субхронічного та хронічного експериментального опіоїдного впливу.

**Матеріал і методи.** Матеріалом дослідження слугували статевозрілі, безпородні щури-самці в кількості 38 тварин, масою 160,0-270,0 г, віком 4,5-7,5 місяців. Тваринам проводили ін'єкції препарату налбуфін внутрішньом'язово, щоденно 1 раз на добу в одному проміжку часу (10-11 година ранку) впродовж 70 діб. Початкова доза налбуфіну впродовж перших 2-х тижнів становила 0,212 мг/кг, наступних 2 (II-IV тижня) – 0,225 мг/кг, наступна (IV-VI тижня) – 0,252 мг/кг, наступна (VI-VIII тижня) – 0,260 мг/кг, а в продовж (VIII-X тижня) – 0,283 мг/кг. Таким способом створювали умови хронічного опіоїдного впливу [5]. Тварини розподілені на 4 групи. 1-а група тварин отримувала налбуфін впродовж 14 діб з наступним забором матеріалу дослідження (кінець 2-го тижня експериментального опіоїдного впливу); 2-а група тварин отримувала налбуфін впродовж 42 діб з наступним забором матеріалу дослідження (кінець 6-го тижня експериментального опіоїдного впливу); 3-я група тварин отримувала налбуфін впродовж 70 діб з наступним забором матеріалу дослідження (кінець 10 тижня експериментального опіоїдного впливу); 4-а група контрольна, яка впродовж 70 діб отримувала ін'єкції фізіологічного розчину внутрішньо м'язово в одному проміжку часу (10-11 година ранку) тварини виводились з експерименту паралельно визначеним термінам виведення тварин з експериментальним опіоїдним впливом.

Усі тварини знаходились в умовах віварію і робота, що стосувалася питань утримання, догляду, маркування та всі інші маніпуляції проводилися із дотриманням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [Стразбург, 1985], «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики

[Київ, 2001]. Комісією з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького встановлено, що проведені наукові дослідження відповідають етичним вимогам згідно з наказом МОЗ України № 231 від 01.11.2000 року (протокол № 10 від 26.12.2011 року). Забір крові та проведення дослідження біохімічних показників крові (малоновий діальдегід, дієнові кон'югати, церулоплазмін) проводили за загальноприйнятими методиками [6-8].

Усі отримані результати статистичних досліджень біохімічних показників оксидативного стресу крові щурів проходили перевірку на нормальність розподілу за допомогою критерію Шапіро-Уїлка та із використанням графічних методів (аналіз бокс-плотів та Q-Q діаграм у випадку значенню р критерію Шапіро-Уїлка <0,05). Оскільки всі дані пройшли перевірку на нормальність розподілу, то для представлення результатів використано формат  $M \pm SD$ , де  $M$  – середнє значення,  $SD$  – стандартне відхилення. Для графічного представлення – лінійні діаграми із планками похибки, де точки лінії – значення середнього у групі, планка похибки – розмах стандартного відхилення. Для виявлення значущості різниці між двома групами використано t-критерій для непов'язаних груп. Для виявлення значущості різниці між трьома та більше групами використано однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA, при подальшому використанні апостеріорного тесту Тьюкі у випадку достовірності дисперсійного аналізу. Для перевірки правомірності застосування однофакторного дисперсійного аналізу дані проходили перевірку на рівність дисперсій у групах за допомогою критерію Левене. Рівень значущості для t-критерію та дисперсійного аналізу встановлений на рівні  $p < 0,05$ , для критерію Левене – на рівні  $p < 0,01$ .

Усі статистичні обчислення проведено із використанням програмного забезпечення RStudio v.1.4.1106 на базі R v.4.1.0 [9-11]. Для оформлення графіків та таблиць використано електронні таблиці Excel з пакету MS Office 2010.

**Результати дослідження та їх обговорення.** На основі проведеного біохімічного дослідження крові показників оксидативного стресу крові інтактної та контрольної групи щурів встановлено показники: рівень малонового діальдегіду, дієнові кон'югати та рівень церулоплазміну в нормі.

При дослідженні рівня біохімічних показників крові щурів інтактних тварин та тварин контрольних груп по жодному із трьох показників за результатами дисперсійного аналізу не виявлено статистично доведеної різниці. Середні значення малонового діальдегіду коливалися в межах 5,07%, середні показ-

ники контрольних груп дієнових кон'югатів коливалися в межах 5,21%, а коливання середніх значень церулоплазміну не перевищувало 4,47%.

На основі біохімічних досліджень показників оксидативного стресу крові щурів на різних термінах експериментального опіоїдного впливу вста-

новлено динаміку зміни показників рівня (малонового діальдегіду, дієнових кон'югатів та рівень церулоплазміну) у субхронічний та хронічний періоди експериментального опіоїдного впливу. Дані показників обраховано статистично та висвітлено в таблицях 1-3, та рисунках 1-3.

Таблиця 1

Описова статистика біохімічних показників після 2 тижнів введення налбуфіну

Показник	Групи		Значення p
	Дослід	Контроль	
Малоновий діальдегід	5,30±0,47	4,91±0,40	0,106
Дієнові кон'югати	42,97±1,54	41,94±1,18	0,160
Церулоплазмін	285,30±5,25	301,01±8,13	0,003

Примітка. P – точне значення за двостороннім t-критерієм при порівнянні між дослідною та відповідною контрольною групами

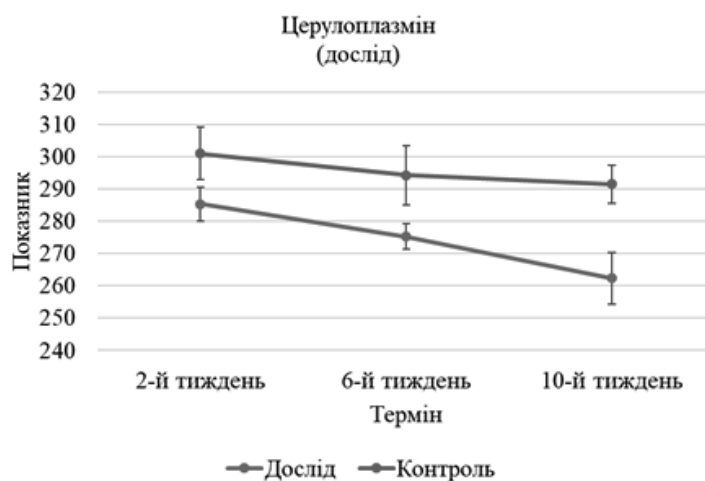


Рис. 1. Лінійна діаграма зміни показника церулоплазміну крові щурів дослідної та контрольної груп протягом експерименту

Наприкінці 2-го тижня введення налбуфіну у тварин експериментальної групи спостерігалась незначна динаміка всіх досліджуваних біохімічних показників. Значення малонового альдегіду та дієнових кон'югатів були дещо більшими щодо показників контрольної групи і становили 5,30±0,47 у малонового альдегіду та 42,97±1,54 у дієнових кон'югатів. Як видно із таблиці (табл. 2, рис. 1), в обох випадках різниця не була доведена статистично. А от показник церулоплазміну знизився до 285,30±5,25 (контрольна група 301,01±8,13) і таке зниження було статистично значущим (p<0,05).

Після 6-го тижнів експериментального опіоїдного впливу всі досліджувані біохімічні показники продовжили динаміку ту, що ми спостерігали після 2-х тижнів експерименту. Показник малонового діальдегіду досяг середнього значення у 5,57±0,26, а різниця середніх значень між контрольною та піддослідною групами становила 12,19% і була достовірною. Збільшення спостерігалось також і середнього значення дієнових

кон'югатів – до значення 43,69±1,68 (контрольна група 40,23±2,90, різниця статистично достовірна, p<0,05). Продовжував знижуватися і церулоплазмін – його показник становив 275,30±3,95 (контрольна група 294,28±9,13, різниця статистично доведена, p<0,05) (табл. 2, рис. 2).

Наприкінці 10-го тижня експериментального введення налбуфіну у тварин експериментальної групи спостерігалась динаміка, яка засвідчила про те, що середнє значення малонового діальдегіду піддослідних тварин становило 6,63±0,28, що було на 35,77% більше від значення контрольної групи (p<0,05). Дієнові кон'югати зросли до 44,94±2,17 (контрольна група 41,60±3,02) їхня динаміка була найменшою, серед усіх біохімічних показників різниця із контрольною групою становила 8,02%, однак і вона була достовірною (p<0,05). Середнє значення церулоплазміну плазми крові піддослідних тварин було менше від контрольного показника майже на 10% і становило 262,40±8,04 (p<0,05) (табл. 3, рис. 3).

Таблиця 2

## Описова статистика біохімічних показників після 6-го тижнів введення налбуфіну

Показник	Групи		Значення р
	Дослід	Контроль	
Малоновий діальдегід	5,57±0,26	4,96±0,35	0,006
Дієнові кон'югати	43,69±1,68	40,23±2,90	0,032
Церулоплазмін	275,30±3,95	294,28±9,13	0,003

Примітка. Р – точне значення за двостороннім t-критерієм при порівнянні між дослідною та відповідною контрольною групами

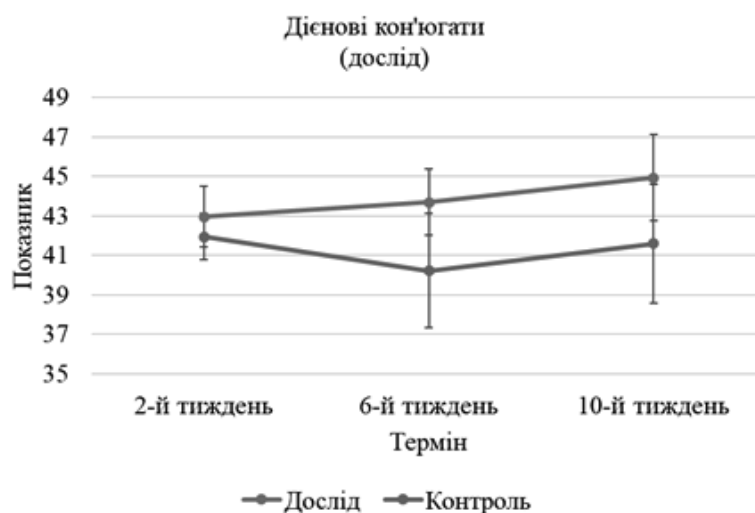


Рис. 2. Лінійна діаграма зміни показника дієнових кон'югатів крові щурів дослідної та контрольної груп протягом експерименту

Таблиця 3

## Описова статистика біохімічних показників після 10 тижнів введення налбуфіну

Показник	Групи		Значення р
	Дослід	Контроль	
Малоновий діальдегід	6,63±0,28	4,88±0,19	0,000
Дієнові кон'югати	44,94±2,17	41,60±3,02	0,045
Церулоплазмін	262,40±8,04	291,51±5,85	0,000

Примітка. Р – точне значення за двостороннім t-критерієм при порівнянні між дослідною та відповідною контрольною групами

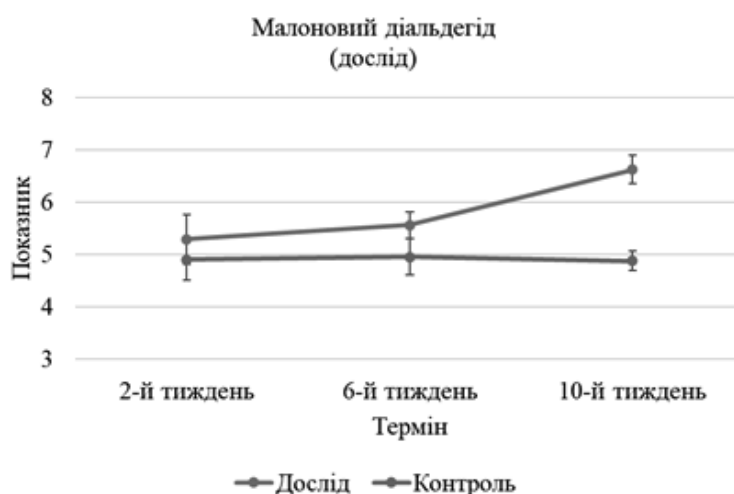


Рис. 3. Лінійна діаграма зміни показника малонового діальдегіду крові щурів дослідної та контрольної груп протягом експерименту

**Висновки.** 1. В результаті проведеного нами експериментального дослідження впливу опіоїдного анальгетика на показники оксидативного стресу крові щурів нами наприкінці 2-го тижня спостерігалось недостовірне збільшення малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів з достовірним зниженням показника церулоплазміну. 2. Наприкінці 6-го тижня введення опіоїдного анальгетика спостерігали стійку тенденцію до продовження збільшення малонового діальдегіду й дієнових кон'югатів та подальше зниження показника церулоплазміну. Усі показники мали статистичну доведену різницю при порівнянні з контрольною групою. 3. Після 10 тижнів експериментального опіоїдного впливу тваринам експериментальної

групи всі показники продовжили попередньо виявлену динаміку та досягли максимального значення різниці порівняно з контрольною групою.

**Перспективи подальших досліджень.**

Результати дослідження у майбутньому допоможуть сформувати патобіохімічну і як наслідок патоморфологічну базу, яка може бути використана з метою проведення порівняльної характеристики щодо процесів динаміки наростання патобіохімічних змін та на їх тлі патоморфологічних змін у шарах сітківки під час субхронічного та хронічного експериментального впливу малих доз опіоїдів. Це в подальшому ляже в основу для проведення корекції цих змін препаратом пентоксифілін на ранніх та пізніх термінах опіоїдного впливу.

**Список використаної літератури**

1. Приходько ОО. Вплив солей важких металів на біохімічні показники крові щурів різних вікових груп. Вісник СумДУ. Серія Медицина. 2010;2: 42-7.
2. Богуцький ВС. Стан процесів перекисного окиснення ліпідів, системи антиоксидантного захисту та ефективність застосування нового комплексного антианемічного препарату для поросят-сисунів. Науково-технічний бюлетень Ін-ту бюл. тварин. 2006:32-7.
3. Беленічев ІФ, Левицький ЄЛ, Губський ЮІ, Коваленко СІ, Марченко ОМ. Антиоксидантна система захисту організму (огляд). Современныe проблемы токсикологии. 2002;3:24-31.
4. Гнідь РМ. Результати дослідження активності ферментів антиоксидантного захисту ротової рідини у хворих на пародонтит, які проживають на території, забрудненій сіркою. Вісник проблем біології і медицини. 2016;2(127):224-7.
5. Пальтов ЄВ, Фік ВВ, Вільхова ІВ, Онисько РМ, Фітькало ОС, Кривко ЮЯ, винахідники; Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, патентовласник. Спосіб моделювання хронічного опіоїдного впливу. Патент України № 76565. 2013 січ. 10.
6. Тимирбулатов РА, Селезнев ЕИ. Метод повышения интенсивности свободных радикалов окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. Лабораторное дело. 1981;4:209-211.
7. Гаврилов ВВ, Мишкорудная МИ. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца. Киев: Здоровье; 1989:170-1.
8. Колб ВГ, Камышников ВС. Определение активности церулоплазмينا в крови: Справочник по клинической химии. Минск. 1982:290-1.
9. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>.
10. Van der Loo MP. Learning RStudio for R statistical computing [Internet]. Packt Publishing Ltd; 2012. 126 p. Available from: <https://www.packtpub.com/product/learning-r-studio-for-r-statistical-computing/9781782160601>.
11. R Studio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R [Internet]. Boston, MA: RStudio, PBC; 2021. Available from: <http://www.rstudio.com/>.

**References**

1. Prykhod'ko O. O. Vplyv soley vazhkykh metaliv na biokhimichni pokaznyky krovi shchuriv riznykh vikovykh hrup. Visnyk SumDU. Seriya Medytsyna. 2010;2:42-7. [in Ukrainian].
2. Bohuts'kyu VS. Stan protsesiv perekysnoho okysnennya lipidiv, systemy antyoksydantnoho zakhystu ta efektyvnist' zastosuvannya novoho kompleksnoho antyanemichnoho preparatu dlya porosyat-sysuniv. Naukovo-tekhnichnyi byuletyn In-tu byul. tvaryn. 2006:32-7. [in Ukrainian].
3. Belenychev IF, Levyts'kyu YeL, Hubs'kyu YuI, Kovalenko CI, Marchenko OM. Antyoksydantna systema zakhystu shkidlyvykh rehovyn (ohlyad). Sovremennye problemy toksykologii. 2002;3:24-31. [in Ukrainian].

4. Gnid' RM. Rezul'tati doslidzhennya aktivnosti fermentiv antioksidantnogo zakhistu rotovoï ridini u khvorikh na parodontit, yakî prozhivayut' na teritorii, zabrudneniy sirkoyu. *Visnik problem biologii i meditsini*. 2016;2(127):224-7. [Ukrainian].
5. Pal'tov ÈV, Fik VB, Vil'khova ÌV, Onis'ko RM, Fit'kalo OS, Krivko YUYA, vinakhidniki; L'vivs'kiy natsional'niy medichniy universitet imeni Danila Galits'kogo, patentovlasnik. Sposib modelyuvannya khronichnogo opioïdnogo vplivu. Patent Ukraïni № 76565. 2013 sích. 10. [Ukrainian].
6. Timirbulatov RA, Seleznev EI. Metod povysheniya intensivnosti svobodnykh radikalov okisleniya lipidsoderzhashchikh komponentov krovi i ego diagnosticheskoe znachenie. *Laboratornoe delo*. 1981;4:209-11. [in Russian].
7. Gavrilov VB, Mishkorudnaya MI. Spektrofotometricheskoe opredelenie sodержaniya gidroperekisey lipidov v plazme krovi. *Laboratornaya diagnostika ishemicheskoy bolezni serdtsa*. Kiev: Zdorov'e; 1989:170-1. [in Russian].
8. Kolb VG, Kamyshnikov VS. Opredelenie aktivnosti tseruloplazmina v krovi: *Spravochnik po klinicheskoy khimii*. Minsk. 1982:290-1. [in Russian].
9. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>.
10. Van der Loo MP. Learning RStudio for R statistical computing [Internet]. Packt Publishing Ltd; 2012. 126 p. Available from: <https://www.packtpub.com/product/learning-r-studio-for-r-statistical-computing/9781782160601>.
11. R Studio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R [Internet]. Boston, MA: RStudio, PBC; 2021. Available from: <http://www.rstudio.com/>.

#### NORMAL INDICATORS OF OXIDATIVE STRESS AND THE DYNAMICS OF THEIR CHANGES AT DIFFERENT TERMS OF EXPERIMENTAL OPIOID INFLUENCE

**Abstract.** In the modern world, there are a large number of exogenous factors that contribute to the emergence of disorders associated with changes in biochemical data. One of these factors is the long-term usage of the opioid analgesics for therapeutic purposes, as well, as the use of opioid drugs without medical indications by people belonging to the category of drug addicts. More often, doctors of various specialties are faced with the problem of treating various nosology in people with opioid addiction. The process of correction of the main pathology makes it difficult due to the consequences arising from the chronic use of opioid drugs. The aim of the study is to find out the dynamics of changes in the oxidative stress indicators of the blood of rats under normal conditions and during subchronic and chronic experimental opioid exposure. Material and methods. The research material was sexually mature, purebred male rats in the amount of 38 animals, weighing 160.0-270.0 g, aged 4.5-7.5 months. The animals were injected with nalbuphine intramuscularly, once a day at one time (10-11 am) per 70 days. The initial dose of nalbuphine during the first 2 weeks was 0.212 mg/kg, the next 2 weeks (II-IV weeks) – 0.225 mg/kg, the next (IV-VI weeks) – 0.252 mg/kg, the next (VI-VIII weeks) – 0.260 mg/kg, and during (VIII-X weeks) – 0.283 mg/kg. Thus, conditions for chronic opioid exposure were created. Research results and their discussion. As a result of our experimental study, the effect of an opioid analgesic on the indicators of oxidative stress in the blood of rats, at the end of the 2nd week, we observed an unreliable increase in malondialdehyde and diene conjugates with a significant decrease in the ceruloplasmin indicator. At the end of the 6th week administration of opioid analgesics, we observed a steady and continued growth of malondialdehyde and diene conjugates and a further decrease in ceruloplasmin. All indicators had a statistically proven difference compared with the control group. The animals of the experimental group, after 10 weeks of experimental opioid exposure have shown that all indicators continued the previously identified dynamics and reached their maximum value of the difference compared to the control group. Conclusions. The conducted studies make it possible to clarify the peculiarities of changes in the oxidative stress indicators of the blood of rats in the subchronic and chronic periods of experimental opioid exposure.

**Key words:** opioid, oxidative stress, subchronic, chronic periods, rat.

*Відомості про авторів:*

**Пальтов Євгеній Володимирович** – кандидат медичних наук, доцент кафедри нормальної анатомії, кафедри топографічної анатомії та оперативної хірургії, завідувач міжкафедральною лабораторією електронної мікроскопії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, м. Львів;

**Масна Зоряна Зеновіївна** – доктор медичних наук, професор, завідувачка кафедри оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, м. Львів;

**Горбова Наталія Олегівна** – викладач Львівської медичної академії імені Андрея Крупинського, м. Львів.

*Information about the authors:*

**Paltov Yevhenii V.** – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Normal Anatomy, Department of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Head of the Interdepartmental Laboratory of Electron Microscopy, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv;

**Masna Zoryana Z.** – MD, professor, head of the operative surgery and topographic anatomy department, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv;

**Horbova Nataliia O.** – teacher, Lviv Medical Academy named after Andrey Krupinsky, Lviv.

Надійшла 10.06.2022 р.

Рецензент – проф. О. М. Слободян (Чернівці)