

УДК 577.3:[616-099:546.711'131:599.23

В.В. Петринич,

Л.І. Власик,

О.А. Петринич

ВПЛИВ ШВИДКОСТІ АЦЕТИЛЮВАННЯ
НА ХАРАКТЕР ТОКСИЧНИХ ЕФЕКТІВ
МАРГАНЦЮ ХЛОРИДУ В ЩУРІВ

Вищий державний навчальний заклад
України "Буковинський державний
медичний університет", м. Чернівці

Ключові слова: марганцю хлорид,
швидкість ацетилювання.

Резюме. Робота присвячена вивченню особливостей індивідуальної схильності до токсичної дії марганцю хлориду ($MnCl_2$) у щурів з різним типом ацетилювання за умов підгострого експерименту. Встановлено, що підгостра інтоксикація $MnCl_2$ у дозах 5 мг/кг та 50 мг/кг у статевозрілих щурів з "повільним" та "швидким" типами ацетилювання супроводжується зниженням показників поведінкових реакцій, зростанням процесів вільнорадикального окиснення та антиоксидантного захисту (АОЗ) у крові та печінці. З'ясовано, що "швидкий" тип ацетилювання є маркером схильності до токсичної дії $MnCl_2$ в умовах підгострого експерименту на статевозрілих щурах.

Вступ

На сучасному етапі розвиток превентивної токсикології значно прискорився завдяки поширеності методів екогенетики [1]. Науковий інтерес обумовлений низкою досліджень, які свідчать, що суттєва різниця у дії ксенобіотиків пов'язана з генетичним поліморфізмом біотрансформуючих ензимів, який робить унікальним кожного індивідуума щодо його стійкості або чутливості до токсикантів [2]. Припускають, що характер шкідливих ефектів за умов дії солей важких металів залежить від типу ацетилювання [3]. Зокрема, за підгострої нітратно-кадмієвої інтоксикації серед статевозрілих щурів більш чутливими виявилися "швидкі" ацетилятори [4]. Токсична дія солей марганцю на організм досліджувалася неодноразово, однак без урахування типу ацетилювання.

Мета дослідження

Визначити роль типу ацетилювання у перебігу підгострої інтоксикації $MnCl_2$ за показниками поведінкових реакцій та біохімічними параметрами.

Матеріали та методи

Для досягнення поставленої мети нами проведені експериментальні дослідження на білих конвенційних аутбредних статевозрілих щурах-самцях. Визначення ацетилюючої здатності тварин проводили за допомогою амідопіринового тесту [5]. За кількістю виділеного з сечею N-ацетил-4-аміноантипірину дослідних тварин було розподілено на групи "швидких" та "повільних" ацетиляторів.

Підгостру інтоксикацію моделювали шляхом внутрішньошлункового введення $MnCl_2$ дос-

лідним тваринам в дозах 5 мг/кг та 50 мг/кг впродовж 28 діб. Евтаназію щурів виконували через 24 год після останнього введення речовин шляхом декапітації.

З метою оцінки пошкоджуючої дії $MnCl_2$ з урахуванням типу ацетилювання до початку експерименту та в динаміці інтоксикації (на 7-му, 14-ту, 21-шу та 28-му добу) вивчали показники поведінкових реакцій щурів (горизонтальна рухова активність (ГРА), вертикальна рухова активність (ВРА), норковий рефлекс (НР), емоційна реактивність (ЕР)). Сума даних показників складала інтегральну поведінкову активність (ІПА). Триваліть спостережень за кожною твариною - 3 хв.

Інтенсивність окиснювальної модифікації білків (ОМБ) у крові щурів визначали за методом О.Ю.Дубініної та співавт. [6] у модифікації І.Ф. Мещишена [7]. Вміст у крові продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) - дієнових кон'югатів (ДК) вивчали за методом І.А.Волчегорського і співавт. [8], маленового альдегіду (МА) плазми та еритроцитів - за Ю.А.Владимировим, А.І.Арчаковим [9]. Стан АОЗ у крові оцінювали за показниками глутатіонпероксидази (ГП), каталази та вмістом вільних SH-груп. Активність ГП досліджували за І.Ф.Мещишеним [10], каталази - за М.А.Корольок та співавт. [11], концентрацію вільних SH-груп - за І.Ф.Мещишеним та співавт. [12]. У гомогенаті печінки за стандартними методиками визначали інтенсивність ОМБ за показниками альдегід- та кетондинітрофенілгідрозонів основного (АКДНФГОХ) та нейтрального (АКДНФГНХ) характеру, вміст дієнових кон'югатів (ДК), МА, активність ГП, каталази та концентрацію вільних SH-груп [13].

Дослідження виконані з дотриманням основних положень Ухвали Першого національного конгресу з біоетики "Загальні етичні принципи експериментів на тваринах" (2001 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях (від 18.03.1986 р.), Директиви ЄС № 609 (від 24.11.1986 р.) і наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. та № 944 від 14.12.2009 р.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили шляхом визначення середніх арифметичних величин (M) та стандартної похибки (m). Оцінку різниці сукупностей вибірки проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Відмінність між вибірками вважалася статистично вірогідною при $p < 0,05$.

Обговорення результатів дослідження

При уведенні $MnCl_2$ у дозі 5 мг/кг зміни показників поведінкових реакцій спостерігали вже на 7-й день експерименту в "повільних" та "швидких" ацетиляторів за зниженням значень ГРА та ППА. Зокрема, у "повільних" та "швидких" ацетиляторів вірогідно знизилася ГРА (на 12,6 % та 10,2 % відповідно), ППА (на 16,6 % та 8,2 % відповідно). НР у тварин із повільним типом ацетилювання знизився на 20,4 %, ВРА - на 23,8 %. Продовження введення ксенобіотика супроводжувалося подальшим зниженням цих величин і досягло свого максимуму до кінця експерименту, причому у тварин зі швидким типом ацетилювання зміни були більш виразні. Так, показник ГРА знизився на 39,2 % у повільних ацетиляторів та на 51,2 % у швидких, ВРА - на 63,8 % та 75 %, ППА - на 35,7 % та 47,5 % відповідно. Показник НР знизився тільки у "швидких" (на 20,1 %). Вірогідних змін ЕР протягом всього експерименту не спостерігалося.

При порівнянні між собою "повільних" та "швидких" ацетиляторів дослідних груп (тих, у яких введення $MnCl_2$ зумовило вірогідні зміни поведінкових реакцій) встановлено, що показники ГРА на 28-му добу, ППА на 14, 21 та 28-му добу у "швидких" тварин вірогідно нижчі, ніж аналогічні дані в "повільних". Показники ВРА на 14-ту добу та ППА на 21-шу добу у тварин з обома типами ацетилювання також вірогідно різнилися на користь нижчих величин у "швидких", однак така закономірність спостерігалася і в групах контролю.

При уведенні шурам $MnCl_2$ у дозі 50 мг/кг після 7-кратного уведення ксенобіотика вірогідно знизилася ГРА: на 16,5 % у "повільних" ацетиляторів та на 19,6 % у "швидких". ВРА у "повільних" ацетиляторів зменшилася на 42,8 %, у

"швидких" - на 29 %. НР знизився на 18,4 % лише у "повільних" ацетиляторів. ППА на 7-й день експерименту у "повільних" та "швидких" ацетиляторів відповідно знизився на 21,1 % та 19,4 %. Вірогідне зниження показників ГРА, ВРА, ППА порівняно з контрольними групами спостерігалось впродовж всього експерименту та досягнуло максимальних змін на 28-му добу. Так, величина ГРА у тварин із "повільним" і "швидким" типом ацетилювання знизилася на 50,4 % та 60,6 %, ВРА - на 69,5 % та 81,2 %, ППА - на 43,9 % та 52,5 % відповідно. Водночас величина ЕР не відрізнялася від показника контрольних груп.

При порівнянні між собою показників поведінкових реакцій у тварин з "повільним" та "швидким" типами ацетилювання (лише тих, які вірогідно змінилися при введенні $MnCl_2$), встановлено, що ГРА на 7-му, 14-ту, 21-шу, 28-му добу та ППА на 14-ту, 28-му добу експерименту були вірогідно нижчими у "швидких" ацетиляторів. ВРА на 14-ту добу, ППА на 7-му та 21-шу добу у тварин з обома типами ацетилювання також вірогідно різнилися на користь нижчих величин у "швидких", однак така закономірність спостерігалася і в групах контролю.

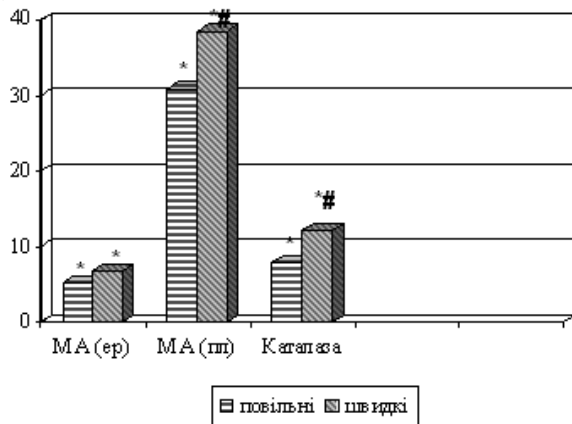
Отримані нами дані узгоджуються з результатами інших авторів, які вказують, що контакт з марганцем може зумовлювати нейроповедінковий дефіцит [14]. Марганець здатний пригнічувати активність холінестерази, що призводить до накопичення в синапсах ацетилхоліну, зниження чутливості холінорецепторів та уповільнення передачі імпульсів у синапсах і міоневральних системах. Більш виразні зміни ГРА та ППА на кінець експерименту виявлено у "швидких" ацетиляторів, тому "швидкий" тип ацетилювання за змінами вказаних поведінкових реакцій можна вважати маркером схильності до токсичної дії $MnCl_2$ (в дозах 5 мг/кг та 50 мг/кг) у статевозрілих щурів в умовах підгострої інтоксикації.

Оцінка прооксидантно-антиоксидантного статусу організму може бути рекомендована як один з методів моніторингу стану здоров'я, при цьому зміна показників ОМБ, ПОЛ та АОЗ може слугувати маркерами ефекту дії шкідливих факторів. Не останнє місце в ініціації вільнорадикального окиснення займають інтоксикації різної природи, у т.ч. і вплив важких металів. У нашому дослідженні при введенні $MnCl_2$ у дозі 5 мг/кг спостерігали порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в крові щурів з "повільним" та "швидким" типами ацетилювання: вірогідно зростали показники МА в еритроцитах та у плазмі, активність каталази. Причому у тварин з

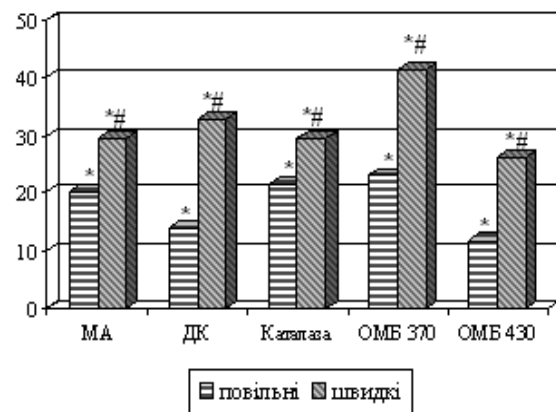
"швидким" типом ацетилювання прооксидантні порушення були більш виразними: спостерігалось зростання рівня АКДНФГОХ у крові (чого не було у "повільних" ацетиляторів), а вміст МА у плазмі та активність каталази вірогідно перевищували аналогічний показник у тварин із "повільним" типом ацетилювання (рис. 1а).

Збільшення дози $MnCl_2$ від 5 мг/кг до 50 мг/кг зумовило зростання порушень ОМБ, ПОЛ та АОЗ у крові щурів. У тварин з "повільним" типом ацетилювання порівняно з контролем спостерігалось вірогідне збільшення показників ОМБ, МА в еритроцитах та в плазмі, каталази, зменшення активності ГП. У крові щурів з "швидким" типом ацетилювання зміни перерахованих показників порівняно з контролем були більш виразними, причому показники ОМБ, вміст МА в еритроцитах та активність каталази вірогідно перевищували аналогічні дані у "повільних" ацетиляторів (рис. 2а).

В умовах впливу екотоксикантів першим органом-мішенню є печінка, де відбувається знешкодження ксенобіотиків, а основним індикатором функціонального стану клітин, який найбільше чутливий до агресії, вважають мітохондрії. При введенні $MnCl_2$ в дозі 5 мг/кг у печінці "повільних" та "швидких" ацетиляторів спостерігали вірогідне зростання показників ОМБ. Поряд з цим у печінці щурів зростали процеси ПОЛ з компенсаторним збільшенням активності ферментативної ланки АОЗ: у "повільних" та "швидких" ацетиляторів вірогідно підвищувалися вміст ДК, МА, активність каталази порівняно з контрольними групами. Вірогідно вагоміші порушення ОМБ, ПОЛ та АОЗ мали місце у тварин з "швидким" типом ацетилювання (рис. 1б). При збільшенні дози токсиканта до 50 мг/кг, у печінці щурів з "повільним" та "швидким" типами ацетилювання виявлено аналогічні зміни (зростання показників ОМБ, ПОЛ та АОЗ порівняно з контрольними групами), при



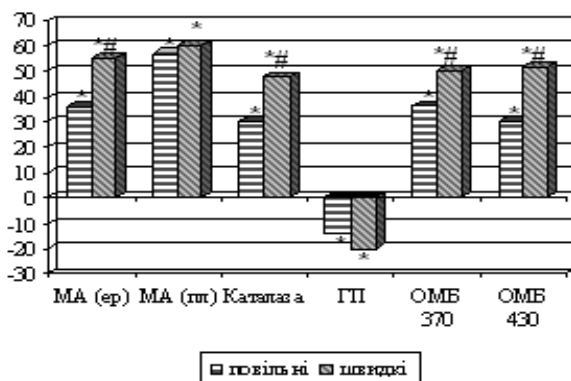
а



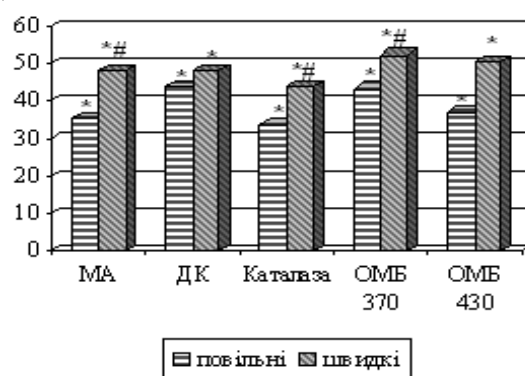
б

Рис. 1. Показники ПОЛ, АОЗ в крові (а) та ПОЛ, АОЗ і ОМБ у печінці (б) щурів з різним типом ацетилювання при введенні $MnCl_2$ у дозі, відповідній 1/100 ЛД50 (% по відношенню до контрольних значень).

Примітки: * - різниця вірогідна порівняно з показником у групі контролю ($p < 0,05$); # - різниця вірогідна порівняно з показником "повільних" ацетиляторів ($p < 0,05$).



а



б

Рис. 2. Показники ПОЛ, АОЗ та ОМБ у крові (а) та печінці (б) щурів з різним типом ацетилювання при введенні $MnCl_2$ у дозі, відповідній 1/10 ЛД50 (% по відношенню до контрольних значень).

Примітки: * - різниця вірогідна порівняно з показником у групі контролю ($p < 0,05$); # - різниця вірогідна порівняно з показником "повільних" ацетиляторів ($p < 0,05$).

цьому у "швидких" ацетиляторів показники АКДНФГНХ, МА та каталази вірогідно перевищували такі у "повільних" (рис. 2б).

Отже, про більшу схильність "швидких" ацетиляторів до токсичної дії $MnCl_2$ у дозах 5 мг/кг та 50 мг/кг можна судити за наступними вірогідними змінами, порівняно з "повільними" ацетиляторами: зниженням ГРА та ПА, зростанням активності каталази, рівня АКДНФГОХ в крові, підвищенням показників АКДНФГНХ, МА та каталази в печінці.

Відомо, що реакція N-ацетилювання потребує у якості кофактора ацетилКоА, який також є компонентом біологічного синтезу нейротрансмітера ацетилхоліну. Ймовірно, що більш активний перебіг реакцій N-ацетилювання із використанням ацетилКоА відбувався у "швидких" ацетиляторів, що зумовило нестачу спільного субстрату ацетилКоА для реакцій синтезу ацетилхоліну. Певний дефіцит останнього міг викликати розслаблення м'язів шлунково-кишкового тракту та деяке уповільнення моторно-евакуаторної функції кишечника. Це, у свою чергу, могло сприяти покращенню всмоктування $MnCl_2$, у т.ч., на етапі печінково-кишкової рециркуляції. Можна припустити, що за рахунок вказаного механізму "швидкі" ацетилятори були більш схильними до виникнення токсичних ефектів $MnCl_2$ в нашому дослідженні.

Висновки

1. Статевозрілі щури з "швидким" типом ацетилювання є більш уразливими до підгострої дії $MnCl_2$ у дозах 5 мг/кг та 50 мг/кг, ніж "повільні" ацетилятори, за вірогідними змінами поведінкових реакцій (ГРА, ПА) та біохімічними критеріями (зростанням активності каталази, рівня АКДНФГОХ в крові, підвищенням показників АКДНФГНХ, МА та каталази в печінці).

2.3 метою попередження виражених інтоксикацій марганцю хлоридом професійний відбір працівників доцільно проводити з урахуванням типу ацетилювання.

3. Маркери ефекту токсичної дії марганцю хлориду (показники ОМБ, ПОЛ, АОЗ) можуть бути використані при діагностиці ступеню інтоксикації та з метою контролю ефективності лікування.

Перспективи подальших досліджень

Полягають у вивченні протекторної дії кверцетину щодо токсичної дії марганцю хлориду залежно від швидкості ацетилювання у щурів.

Література. 1. Гармонов С.Ю. Аналитические методы исследования генетического полиморфизма организма человека / С.Ю. Гармонов, М.И. Евгеньев, И.Е. Зыкова //

Вопросы медицинской, биологической и фармацевтической химии. - 2004. - № 1. - С. 3-20. 2. Гнагтейко О.З. Екогенетичні аспекти патології людини, спричиненої впливом шкідливих факторів зовнішнього середовища / О.З. Гнагтейко, Н.С. Лук'яненко // Безпека життєдіяльності. - 2008. - № 5-6. - С. 32-38. 3. Соблирова Ж.Х. Быстрый тип ацетилювання - возможный маркер предрасположенности к заболеваниям органов мочевой системы / Ж.Х. Соблирова, Е.А. Харина // Нефрология и диализ. - 1999. - Т. 1, № 1. - С. 14-17. 4. Власик Л.І. Гігієнічне значення типу ацетилювання як біомаркера схильності до шкідливого впливу нітрату натрію та хлориду кадмію у тварин різних вікових груп / Л.І. Власик, Т.І. Кметь, О.Г. Кметь // Клініч. та експерим. патол. - Т. 5, № 4. - С. 14-17. 5. Попов Т.А. Метод оценки активности оксидаз печени / Т.А. Попов, О.Б. Леоненко // Гигиена и санитария. - 1977. - № 9. - С. 56-59. 6. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов [и др.] // Вопр. мед. химии. - 1995. - Т. 41, № 1. - С. 24-26. 7. Мещишен І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків (сироватки) крові / І.Ф. Мещишен // Бук. мед. вісник. - 1998. - Т. 2, № 1. - С. 156-158. 8. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гепатанализиропранных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский [и др.] // Вопросы мед. химии. - 1989. - Т. 35, № 1. - С. 127-131. 9. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. - М.: Наука, 1972. - 252 с. 10. Мещишен І.Ф. Механізм действия четвертичных аммониевых соединений (этония, додекония и их производных) на обмен веществ в норме и патологии / И.Ф. Мещишен // Дис. докт. биол. наук. - Черновцы, 1991. - 254 с. 11. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19. 12. Мещишен І.Ф. Метод кількісного визначення HS-груп у крові / І.Ф. Мещишен, Н.П. Григорьева // Бук. мед. вісник. - 2002. - Т. 6, № 2. - С. 190-192. 13. Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень Центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії / [В.М. Магальяс, А.О. Міхєєв, Ю.С. Роговий та ін.] - Методичний посібник. - Чернівці: БДМА, 2001. - 42 с. 14. Betharia S. Neurobehavioral effects of lead and manganese individually and in combination in developmentally exposed rats / S. Betharia, T.J. Maher // Neurotoxicology. - 2012. - Vol. 33, № 5. - P. 1117-1127.

ВЛИЯНИЕ ТИПА АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ХАРАКТЕР ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МАРГАНЦА ХЛОРИДА У КРЫС

В.В. Петринич, Л.І. Власик, О.А. Петринич

Резюме. Работа посвящена изучению особенностей индивидуальной склонности к токсическому действию марганца хлорида ($MnCl_2$) у крыс с разным типом ацетилювания в условиях подострого эксперимента. Установлено, что подострая интоксикация $MnCl_2$ в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг у половозрелых крыс с "медленным" и "быстрым" типами ацетилювания сопровождается снижением показателей поведенческих реакций, ростом процессов свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты (АОЗ) в крови и печени. Выяснено, что "быстрый" тип ацетилювания является маркером предрасположенности к токсическому действию $MnCl_2$ в условиях подострого эксперимента на половозрелых крысах.

Ключевые слова: марганца хлорид, скорость ацетилювания.

INFLUENCE OF ACETYLATION TYPE ON THE CHARACTER OF THE TOXIC EFFECTS OF MANGANOUS CHLORIDE IN RATS

V.V. Petrynych, L.I. Vlasyk, O.A. Petrynych

Abstract. The article deals with the studying peculiarities of individual susceptibility to the toxic action of manganous

chloride ($MnCl_2$) in rats with various type of acetylation under conditions of subacute experiment. Subacute $MnCl_2$ intoxication in the doses of 5 mg/kg and 50 mg/kg in mature rats with "slow" and "rapid" types of acetylation was found to be accompanied by the decreased indices of behavioral reactions, and increased processes of free radical oxidation and antioxidant defense (AOD) in the blood and liver. The "rapid" type of acetylation is a susceptibility marker to $MnCl_2$ toxic action under conditions

of subacute experiment on mature rats.

Key words: manganous chloride, acetylation rate.

Higher State Educational Establishment of Ukraine

"Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol.14, №2 (52). - P.144-148.

Надійшла до редакції 29.05.2015

Рецензент – доц. І.М. Яремій

© В.В. Петринич, Л.І. Власик, О.А. Петринич, 2015

