

УДК 616-099-092.9:547.972.3]:577.12

В. В. Петринич
Л. І. ВласикБуковинський державний медичний
університет, м. Чернівці**ЕФЕКТИ ЗАСТОСУВАННЯ КВЕРЦЕТИНУ
ЗА УМОВ ПІДГОСТРОГО ВПЛИВУ
СВИНЦЮ АЦЕТАТУ В ЩУРІВ ІЗ РІЗНИМ
ТИПОМ АЦЕТИЛЮВАННЯ**

Ключові слова: кверцетин, ацетилювання, свинцю ацетат, окиснювальна модифікація білків, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантний захист.

Резюме. Вивчено вплив кверцетину на показники пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантного захисту (АОЗ) й окиснювальної модифікації білків (ОМБ) у крові та печінці в статевозрілих щурів за умов підгострого впливу ацетату свинцю з урахуванням типу ацетилювання. Встановлено, що застосування кверцетину при введенні свинцю ацетату в дозі 15,5 мг/кг (1/16 ДЛ₅₀) в крові статевозрілих щурів як з „повільним” так і з „швидким” типами ацетилювання порівняно з щурами, яким вводили лише свинцю ацетат, зумовлює протективні ефекти, що проявляється вірогідним зниженням показників ОМБ, ПОЛ, активності каталази, підвищенням активності глутатіонпероксидази (ГП), рівня HS-груп, гемоглобіну, а у „швидких” – і загального білку. У печінці щурів введення кверцетину зумовило вірогідне зниження ОМБ лише у „повільних” тварин, а у „швидких” – зниження малонового альдегіду (МА), зростання активності ГП та рівня HS-груп.

Вступ

Ефекти впливу ксенобіотиків залежать від їх дози, тривалості дії, статі, віку, особливостей харчування, а також від індивідуальної чутливості організму [14]. Існує припущення, що маркером схильності до дії несприятливих факторів навколишнього середовища, зокрема солей важких металів, є тип ацетилювання [10].

Однак роль індивідуальної генетичної схильності як причини чутливості організму до впливу токсичних сполук, у т.ч. важких металів, на сьогодні вивчена не достатньо. Питання розробки профілактичних заходів щодо попередження несприятливої дії солей важких металів також залишається відкритим.

Кверцетин – флавоноїд, що володіє широким спектром фармакологічних ефектів [4]. Для нього характерна найбільш виражена, у порівнянні з іншими флавоноїдами, здатність утворювати комплекси з важкими металами та сприяти їх виведенню з організму [12]. Виходячи з цього, застосування кверцетину як детоксиканта організму від важких металів може бути перспективним, враховуючи наявність у нього як специфічних властивостей (здатність до утворення комплексів з важкими металами), так і неспецифічних (антиоксидантні, мембраностабілізуючі властивості). Тому дослідження ефектів кверцетину за умов токсичного впливу свинцю ацетату залежно від швидкості ацетилювання є актуальним.

Мета дослідження

Вивчити та оцінити в динаміці захисний вплив кверцетину за умов підгострого впливу свинцю ацетату з урахуванням типу ацетилювання.

Матеріал і методи

Експериментальні дослідження проведені на білих конвенційних аутбредних статевозрілих щурах-самцях, яких утримували на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до води та в стабільних умовах віварію, з дотриманням 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 № 960 від 23.09.2009 р. та № 944 від 14.12.2009 р. Кількість тварин у статистичній групі становила 6.

Визначення ацетилюючої здатності тварин проводили за допомогою амідопіринового тесту [9]. За кількістю виділеного з сечею N-ацетил-4-аміноантипірину дослідних тварин було розподілено на групи „швидких” та „повільних” ацетиляторів. Підгостру інтоксикацію моделювали шляхом внутрішньоочеревинного введення ацетату свинцю тваринам у дозі 15,5 мг/кг (1/16 ДЛ₅₀) впродовж 28 діб. Частині тварин за 1 год до вве-

дення свинцю ацетату внутрішньошлунково вводили розчин кверцетину в дозі 200 мг/кг. Контрольним групам тварин замість свинцю ацетату вводили ізотонічний розчин натрію хлориду (внутрішньоочеревинно). Евтаназію щурів виконували через 24 години після останнього введення речовин шляхом декапітації.

Інтенсивність ОМБ у крові щурів визначали за методом О.Ю.Дубініної та співавт. [8] у модифікації І.Ф. Мещишена [7]. Вміст у крові продуктів ПОЛ – МА плазми та еритроцитів – визначали за методами Ю.А.Владимирова, А.І.Арчакова [1], дієнових кон'югатів (ДК) – за методом І.А.Волчегорського і співавт. [11].

Стан АОЗ в крові оцінювали за показниками глутатіонпероксидази (ГП) [6], каталази [5] та вмістом вільних HS-груп. В гомогенаті печінки за стандартними методиками визначали інтенсивність ОМБ за показниками АКДНФГОХ та АКДНФГНХ, вміст дієнових кон'югатів (ДК), МА, активність ГП, каталази та концентрацію вільних HS-груп [13]. Рівень дельта-амінолевулінової кислоти ("АЛК) у сечі визначали за реакцією з реактивом Ерліха після видалення порфобіліногену й інших речовин, що заважають визначенню, адсорбції їх на активованому вугіллі [2].

Експериментальні дані обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента. Відмінність між вибірками вважалася вірогідною при $p < 0,05$.

Обговорення результатів дослідження

Введення свинцю ацетату в дозі 15,5 мг/кг (1/16 ДЛ₅₀) у тварин з „повільним” та „швидким” типами ацетилювання порівняно з контрольними групами супроводжувалося вірогідним зростанням вмісту Δ-АЛК в сечі, в крові – показників ОМБ, ПОЛ, каталази, зниженням активності ГП, рівня HS-груп, гемоглобіну, загального білку (табл. 1). Поряд з цим, у печінці „повільних” та „швидких” ацетиляторів при свинцевій інтоксикації виявлено зниження показників ОМБ, ПОЛ (окрім показника МА у „швидких” ацетиляторів, який вірогідно зріс) та АОЗ (табл. 2).

Застосування кверцетину у тварин з „повільним” та швидким” типами ацетилювання призводило до вірогідного зменшення виведення Δ-АЛК з сечею. Так, рівень Δ-АЛК у „повільних” тварин, яким вводився кверцетин, становив $9,7 \pm 0,55$ мкмоль/г креатиніну, що на 19,8 % вірогідно нижче показника у „повільних” щурів, які не отримували кверцетин. У тварин з „швидким” типом ацетилювання рівень Δ-АЛК становив $9,2 \pm 0,35$ мкмоль/г креатиніну, що вірогідно нижче на 30,8 % порівняно з „швидкими” щурами, яким вводили лише свинцю ацетат.

Призначення кверцетину щурам супроводжувалося зниженням процесів ОМБ та ПОЛ (табл. 1). Так, у крові „повільних” та швидких” ацетиляторів показник АКДНФГОХ (на 10,7 % та 18,6 % відповідно), рівень МА в еритроцитах (на 23,2 % та 32,6 % відповідно) і плазмі (на 16,3 % та 32,5 % відповідно) були вірогідно меншими порівняно з підгрупами тварин, яким вводили лише ацетат свинцю. Вміст АКДНФГНХ та ДК також були вірогідно нижчими, але лише у тварин з „швидким” типом ацетилювання (на 9,1 та 16,2 % відповідно), причому, рівень ДК вірогідно не відрізнявся від показника контрольної групи.

Активність каталази у „повільних” та „швидких” ацетиляторів на 23,2 % та 15,5 % вірогідно була нижчою порівняно з тваринами, які не отримували кверцетин, і вірогідно не відрізнялася від групи контролю. У той же час активність ГП (на 15,6 % та 17,4 % відповідно), рівень HS-груп (на 21,9 % та 31,7 % відповідно), гемоглобіну (на 8,8 % та 8 % відповідно) були вірогідно вищими при застосуванні кверцетину у тварин з „повільним” та „швидким” типами ацетилювання, причому активність ГП у „повільних” та „швидких” тварин вірогідно не різнилася з показниками контрольних груп.

Таким чином, можна припустити, що кверцетин нівелював негативний вплив свинцю ацетату в дозі 1/16 ДЛ₅₀ щодо активності каталази та ГП у „повільних” та швидких” ацетиляторів, рівня ДК та загального білку у „повільних” тварин.

Показник дельта (Δ) (середнє значення різниці між відповідними показниками у щурів, які отримували лише свинцю ацетат, з щурами, яким додатково вводили кверцетин) „швидких” щурів вірогідно різнилася з Δ у „повільних” щурів для показників АКДНФГОХ, МА у плазмі та активності каталази в крові. Окрім того, лише у „швидких” тварин спостерігалися вірогідні зміни показників АКДНФГНХ, ДК та загального білку в крові під впливом кверцетину. Отже, за показниками ОМБ, ПОЛ більш чутливими до дії кверцетину можна вважати тварин зі „швидким” типом ацетилювання. І лише за активністю каталази в крові більш чутливими є „повільні ацетилятори”.

У печінці щурів, яким перед введенням свинцю ацетату в дозі 1/16 ДЛ₅₀ застосовували кверцетин, виявлено вірогідно нижчі деякі показники ОМБ та ПОЛ (табл. 2).

У тварин з „повільним” типом ацетилювання вірогідно меншими були вміст АКДНФГНХ (на 13,2 %) та АКДНФГОХ (на 20,4 %). У „швидких” ацетиляторів вірогідно нижчим порівняно з тваринами, які не отримували кверцетин, виявився рівень МА (на 13,1 %), але вірогідно вищими

Таблиця 1

Стан ОМБ, ПОЛ та АОЗ в крові щурів з різним типом ацетилювання при введенні свинцю ацетату в дозі 1/16 ДЛ₅₀ і застосуванні кверцетину в дозі 200 мг/кг (M±m)

Показник	Контроль		Свинцю ацетат 15,5 мг/кг		Свинцю ацетат 15,5 мг/кг + кверцетин 200 мг/кг	
	повільні	швидкі	повільні	швидкі	повільні	швидкі
АКДНФГНХ, ммоль/г білка	0,44±0,002	0,44±0,003	0,51±0,01*	0,55±0,01*	0,49±0,007*	0,50±0,01*/**
АКДНФГОХ, о.од.г/л білка	4,09±0,03	4,04±0,02	4,77±0,13*	5,54±0,13*	4,26±0,03*/** Δ0,50±0,14	4,51±0,04*/** Δ1,03±0,14#
Малоновий альдегід (ер), мкмоль/л	9,65±0,09	9,69±0,11	11,54±0,44*	12,34±0,51*	Δ2,68±0,34	8,32±0,09*/** Δ4,02±0,60
Малоновий альдегід (плазма), мкмоль/л	3,38±0,03	3,51±0,06	4,60±0,30*	5,63±0,27*	3,85±0,04*/** Δ0,75±0,31	3,80±0,05*/** Δ1,83±0,22#
Діснові кон'югати, E ₂₃₂ /мл крові	2,64±0,02	2,66±0,02	2,84±0,08*	3,02±0,10*	2,68±0,03	2,53±0,04*/**
Каталаза, мкмоль/мл год	10,74±0,06	10,56±0,05	13,98±0,26*	12,42±0,29*	10,73±0,06** Δ3,25±0,29	10,50±0,09** Δ1,92±0,33#
ГП, нмоль ГВ/хв.* ГГНб	134,6±6,94	141,9±7,31	113,70±5,99*	109,70±5,46*	131,4±4,32** Δ-17,66±7,09	128,8±4,91** Δ-19,13±7,38
НС-групи, мкмоль/мл	0,98±0,004	0,93±0,009	0,73±0,03*	0,63±0,01*	0,89±0,01*/** Δ-0,16±0,03	0,83±0,01*/** Δ-0,21±0,02
Нб, г/л	148,8±0,44	144,9±0,49	128,6±0,33*	128,3±0,35*	139,9±0,87** Δ-11,38±0,93	138,6±0,82** Δ-10,26±0,78
Загальний білок, г/л	69,51±0,38	69,86±0,21	66,27±0,46*	63,77±0,60*	68,22±0,76	67,34±0,69**

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з показником у групі контролю (p<0,05); ** – різниця вірогідна порівняно з показником у тварин, яким вводили лише свинцю ацетат (p<0,05); Δ – дельта показників; # – різниця вірогідна порівняно з показником у „повільних” тварин

Таблиця 2

Стан ОМБ, ПОЛ та АОЗ в печінці шурів з різним типом ацетилювання при введенні свинцю ацетату в дозі 1/16 ДЛ₅₀ і застосуванні кверцетину в дозі 200 мг/кг (M±m)

Показник	Контроль		Свинцю ацетат 15,5 мг/кг		Свинцю ацетат 15,5 мг/кг + кверцетин 200 мг/кг	
	повільні	швидкі	повільні	швидкі	повільні	швидкі
АКДНФГНХ, ммоль/г білка	1,37±0,04	1,50±0,02	0,98±0,03*	0,79±0,03*	0,85±0,01*/**	0,81±0,01*
АКДНФГОХ, о.од.г/л білка	14,21±0,33	15,11±0,19	10,2±0,32*	7,63±0,29*	8,12±0,09*/**	8,08±0,05*
Дієнові кон'югати, ммоль/мг білка	2,72±0,07	2,81±0,03	1,01±0,04*	1,22±0,04*	1,21±0,02*	1,60±0,02*
Малоновый альдегід, ммоль/мг білка	1,39±0,04	1,45±0,02	1,09±0,06*	1,67±0,09*	1,08±0,01*	1,06±0,01*/**
Каталаза, ммоль/хв* мг білка	27,84±0,58	29,27±0,16	19,46±0,38*	17,5±0,51*	20,35±0,22*	15,16±0,28*
ГП, мкмоль ГВ/хв* мг білка	0,67±0,01	0,68±0,01	0,52±0,02*	0,57±0,01*	0,51±0,03*	0,61±0,01*/**
HS-групи, мкмоль/мл	5,57±0,04	4,84±0,05	4,41±0,09*	4,27±0,09*	4,43±0,06*	4,54±0,07*/**

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з показником у групі контролю (p<0,05); ** – різниця вірогідна порівняно з показником у тварин, яким вводили лише свинцю ацетат (p<0,05)

були активність ГП (на 7,0 %) та вміст HS-груп (на 6,3 %).

Отже, проведене нами дослідження свідчить про наявність у кверцетину протекторних властивостей за умов його профілактичного застосування при дії свинцю ацетату. Відомо [3], що антиоксидантна дія флавоноїдів, у т.ч. кверцетину, обумовлена їх здатністю нейтралізувати активні форми кисню та розривати ланцюгові вільнорадикальні реакції. Протекторні ефекти флавоноїдів можуть бути результатом їх дії на ферментативні системи, а також комбінації процесів прямого знешкодження вільних радикалів та взаємодії з ензимами.

Висновки

1. Профілактичне введення кверцетину при моделюванні свинцевої інтоксикації (1/16 ДЛ₅₀) (порівняно з тваринами, які отримували лише свинцю ацетат) у „повільних” та швидких” ацетиляторів призводить до вірогідного зменшення виведення Δ-АЛК з сечею, супроводжується вірогідно нижчими показниками в крові: АКДНФГОХ, МА в еритроцитах та плазмі, каталази; вірогідно вищими активністю ГП, вмістом HS-груп, рівнями гемоглобіну; лише у „швидких” – вірогідно нижчими рівнями АКДНФГНХ, ДК та вірогідно вищим показником загального білка.

2. Вірогідно виразніші зміни АКДНФГОХ та МА у плазмі при додатковому застосуванні кверцетину встановлено у „швидких” ацетиляторів порівняно з „повільними” ацетиляторами. У „повільних” тварин порівняно з „швидкими” вірогідно вагомніше знижувалася активність каталази.

3. У печінці „повільних” ацетиляторів під впливом кверцетину знижувалися показники ОМБ. У тварин зі „швидким” типом ацетилювання вірогідно нижчим був вміст МА, а активність ГП та вміст HS-груп зростали.

Перспективи подальших досліджень

Полягають у подальшому вивченні захисного впливу засобів біопротекції за умов підгострого впливу свинцю ацетату на експериментальних біологічних моделях з різним типом ацетилювання.

Література. 1. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А.Владимиров, А.И.Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с. 2. Клінічна лабораторна діагностика патології печінки та жовчних шляхів / [Пішак В.П., Ротар В.І., Мислицький В.Ф. та ін.]. – Чернівці: Медуніверситет, 2006. – 313 с. 3. Вплив кверцетину на стан антиоксидантної системи і процесів ПОЛ при експериментальній моделі геморагічного інсульту у шурів / С.О.Василенко, Я.Б.Раєцька, Ю.В.Степанов [та ін.] // Фізика живої. – 2008. – Т. 16, № 1. – С.116-119. 4. Клиническое изучение фармакокинетических свойств кверцетина с углеводным комплексом при пероральном введении / В.Ф.Усенко, Ю.В.Подпружников, Н.П.Безуглая [и др.] // Ліки України. – 2011. – № 1. – С. 65-68. 5. Метод определения активнос-

ти каталазы / М.А.Королюк, Л.И.Иванова, И.Г.Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19. 6. Мещишен И.Ф. Метод определения активности глутатионтрансферазы в крови / И.Ф.Мещишен // В кн.: Применение ферментов в медицине. – Симферополь, 1987. – С. 135-136. 7. Мещишен И.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків (сироватки) крові / І.Ф. Мещишен // Бук. мед. вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156-158. 8. 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. 9. Попов Т.А. Метод оценки активности оксидаз печени / Т.А.Попов, О.Б.Леоненко // Гигиена и сан. – 1977. – № 9. – С. 56-59. 10. Соблирова Ж.Х. Быстрый тип ацетилирования – возможный маркер предрасположенности к заболеваниям органов мочевой системы / Ж.Х.Соблирова, Е.А.Харина // Нефрология и диализ. – 1999. – Т. 1, № 1. – С. 14-17. 11. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопротанольных экстрактах крови / И.А.Волчегорский, А.Г.Налимов, Б.Г.Яровинский [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1989. – Т. 35, № 1. – С. 127-131. 12. Стежка В.А. Науково обґрунтовані принципи і підходи до вторинної медико-біологічної профілактики екологічно обумовленої та професійної патології, пов'язаної з впливом на людину сполук свинцю. Частина II. Фармакологічні засоби профілактики розвитку інтоксикації та детоксикації організму від важких металів / В.А. Стежка // Сучасні проблеми токсикології. – 2006. – № 2. – С. 83-89. 13. Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень Центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії / [В.М.Магалаєс, А.О.Міхеєв, Ю.С.Роговий та ін.] – Методичний посібник. – Чернівці: БДМА, 2001. – 42 с. 14. Heavy metal toxicity and the environment / P.B.Tchounwou, C.G.Yedjou, A.K.Patlolla, D.J.Sutton // EXS. – 2012. – Vol. 101. – P. 133-164.

ЭФФЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КВЕРЦЕТИНА В УСЛОВИЯХ ПОДООСТРОГО ВЛИЯНИЯ СВИНЦА АЦЕТАТА У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ

В.В.Петринич, Л.И.Власик

Резюме. Изучено влияние кверцетина на показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ), антиоксидантной защиты (АОЗ) и окислительной модификации белков (ОМБ) в крови и печени половозрелых крыс в условиях подострого влияния свинца ацетата с учетом типа ацетилирования. Установлено, что применение кверцетина при введении свинца ацетата в дозе 15,5 мг/кг (1/16 ДЛ₅₀) в крови половозрелых крыс как с „медленным”, так и с „быстрым” типами ацетилирования сравнительно с крысами, которым вводили только свинца ацетат, оказывает протективные эффекты, что проявляется достоверным снижением показателей ОМБ, ПОЛ, активности каталазы, повышением активности глутатионпероксидазы (ГП), уровня HS-групп, гемоглобина, а у „быстрых” – и общего белка. В печени крыс введение кверцетина обусловило достоверное снижение ОМБ только у „медленных” животных, а у „быстрых” – снижение малонового альдегида, увеличение активности ГП и уровня HS-групп.

Ключевые слова: кверцетин, ацетилирование, свинца ацетат, окислительная модификация белков, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита.

UDC 616-099-092.9:547.972.3]:577.12

THE EFFECT OF QUERCETIN UNDER SUBACUTE EXPOSURE TO LEAD ACETATE IN RATS WITH DIFFERENT TYPES OF ACETYLYATION

V.V.Petrynych, L.I.Vlasyk

The aim of research: To study the effect of quercetin on parameters of lipid peroxidation (LPO), antioxidant protection (AOP) and oxidative modification of proteins (OMP) in the blood and liver of rats under subacute effect of lead acetate considering the type of acetylation.

Methods. Experimental studies were conducted on white conventional outbred mature male rats, which were divided into two groups: with «fast» and «slow» type of acetylation by amidopiryn test. Subacute intoxication was modelled by intraperitoneal injection of lead acetate to experimental animals at the dose of 15,5 mg/kg (1/16 DL₅₀) for 28 days. A part of the animals 1 hour before administration of lead acetate was intragastrically administered by quercetin solution at the dose of 200 mg/kg. Control groups of animals instead of lead acetate were administered by isotonic solution of sodium chloride (intraperitoneally).

Results. The use of quercetin with lead acetate administration at the dose of 15.5 mg / kg (1/16 DL₅₀) levels to mature rats with “slow” and the “fast” type of acetylation compared with rats injected with lead acetate was found to lead to protective effects, manifested by a reliable decrease of OMP indices, lipid peroxidation, catalase activity, increased activity of glutathione peroxidase (GP), the level of HS-groups, hemoglobin, and in the “fast” – total protein level. In the liver of rats the introduction of quercetin resulted in reliable decline of OMP only in the “slow” animals, and in the “fast” – reduction of malonaldehyde, increased GP activity and level of HS-groups.

Conclusions. By the indices of OMP, LPO animals with a “fast” type of acetylation are more sensitive to the action of quercetin. By catalase activity in the blood more sensitive animals are with “slow” type of acetylation.

Key words: quercetin, acetylation, lead acetate, oxidative modification of proteins, lipid peroxidation, antioxidant protection.

**Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)
Theatre Sq., 2
Chernivtsi
UA-58002
Ukraine**

petrynych.volodymyr@bsmu.edu.ua

Clin. and experim. pathol. - 2013. - Vol.12, №2 (44). - P.136-140.

Надійшла до редакції 17.05.2013

Рецензент – проф. В. Ф. Мислицький

© В.В.Петринич, Л.І.Власик, 2013