

ВПЛИВ АФЛАТОКСИНУ В1 ТА ПРЕПАРАТУ «ВІТАКОРМ-БСР-ФОРТЕ» НА АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗ В ЛЕЙКОЦИТАХ ЩУРІВ

Х. М. Головчак, Г. Л. Антоняк, І. А. Лусік

Інститут біології тварин НААН
Львівський національний університет імені Івана Франка

Досліджено вплив афлатоксину В1 (AFB1) та препарату «Вітакорм-БСР-Форте» рослинного походження на сумарну активність NO-синтаз (NOS) в лейкоцитах периферичної крові лабораторних щурів. Установлено, що розвиток експериментального афлатоксикозу, спричиненого щодобовим введенням у шлунок тварин AFB1 (15 мкг/кг) впродовж 14 діб, супроводжується значним зниженням активності NOS порівняно з контролем. Інгібування NO-синтазної активності в досліджуваних клітинах супроводжується зменшенням вмісту нітритів. Введення тваринам препарату «Вітакорм-БСР-Форте» призводить до нормалізації зазначених показників. Результати досліджень свідчать про ефективність фітопрепарату «Вітакорм-БСР-Форте» у зменшенні зумовлених афлатоксином В1 метаболічних порушень в клітинах крові тварин.

Ключові слова: АФЛАТОКСИН В1, ЛЕЙКОЦИТИ, NO-СИНТАЗА, НІТРИТИ

В останні роки значно розширились знання про роль оксиду азоту (NO) та його метаболітів у різних фізіологічних і патологічних процесах [1, 2]. Оксид азоту — це універсальний ендогенний регулятор, який, залежно від концентрації, може проявляти пошкоджувальний або захисний вплив на функціонування клітин [3]. Зокрема, негативна дія оксиду азоту проявляється, коли його концентрація або різко знижується, або зростає внаслідок змін активності NO-синтази — ензиму, який бере участь в утворенні NO [4]. Роль NO-синтази та молекул оксиду азоту в розвитку захворювань не викликає сумніву [5].

Інтенсифікацію процесів утворення активних похідних оксиду азоту спостерігають за умов інтоксикації організму ксенобіотиками, а також під впливом певних екзогенних та ендогенних чинників. Збільшення вмісту нітритів в клітинах супроводжується активацією процесів пероксидного окиснення ліпідів, інгібуванням каталітичної активності ферментів, ушкодженням молекул ДНК та іншими внутрішньоклітинними ефектами [6].

Афлатоксин В1 (AFB1) — продукт вторинного метаболізму грибів-мікроміцетів роду *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*). Це один із найшкідливіших природних токсинів, який поряд із іншими афлатоксинами часто забруднює тваринні корми за умов ураження їх токсиногенними грибами. В разі споживання кормів, забруднених мікроміцетами та синтезованими за їх участю афлатоксинами, у тварин відбувається низка порушень у діяльності життєвоважливих органів і систем [7]. Це зумовлюється істотним впливом афлатоксинів на клітинний метаболізм [8]. Однак вплив афлатоксинів на метаболічні процеси в клітинах крові тварин на сьогодні з'ясований мало. Зокрема, це стосується впливу AFB1 на систему оксиду азоту в лейкоцитах, які є одним з основних джерел NO в організмі [9, 10].

Іншою важливою проблемою є коригування метаболічних порушень в клітинах тварин, які споживають забруднений афлатоксинами корм. Перспективним у цьому аспекті є застосування препарату «Вітакорм-БСР-Форте» рослинного походження, який є біогенним стимулятором, отриманий в результаті анаеробної мікробної ферментації рослинної сировини. Однією з його функцій є зниження токсичної дії кормових токсинів.

Метою роботи було з'ясувати динаміку активності NO-синтази та концентрації нітритів в лейкоцитах білих щурів, яким вводили AFB1, та вплив препарату «Вітакорм-БСР-Форте» на ці показники.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях з середньою масою тіла 250 г. Тварин поділили на 4 групи по 5 особин у кожній. Тварини першої групи використовували як контроль. Щурам другої групи вводили афлатоксин В1 («Sigma», США) у концентрації 15 мкг/кг щодоби впродовж 14 діб внутрішньошлунково через зонд. Тваринам третьої групи вводили таку саму кількість токсину разом з препаратом «Вітакорм-БСР-Форте» (ПП «НВК» Хімтехсервіс, Україна). Препарат вводили за день до експерименту та на сьому добу після початку введення AFB1 по 0,1 мл кожній тварині (спосіб введення — внутрішньочеревні ін'єкції). Щурам четвертої групи вводили лише препарат «Вітакорм-БСР-Форте». Декапітацію здійснювали на 14-ту добу експерименту під легким ефірним наркозом, користуючись правилами поводження з піддослідними тваринами. Визначення вмісту нітритів та сумарної активності NOS проводили у лейкоцитах периферичної крові тварин.

Лейкоцити виділяли з гепаринізованої крові у градієнті густини фікол-тріомбразу ($\rho=1,076 - 1,078$). Після центрифугування клітини двічі відмивали фізіологічним Na,K-фосфатним буфером (PBS, pH 7,4) [11].

Підрахунок лейкоцитів здійснювали в камері Горяєва, використовуючи 3–5 % розчин оцтової кислоти, підфарбований метиленовим синім [12]. Лізис клітин проводили буфером такого складу: 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 % тритон X-100, 5 мМ ЕДТА, 50 мМ NaF, 0,25 мМ Na₃VO₄. До буферу додавали суміш інгібіторів виробництва «Sigma» з метою інгібування протеолітичних ферментів. Лізат лейкоцитів використовували для подальших досліджень. В лізатах клітин визначали загальну активність NO-синтаз згідно з методом, який базується на аналізі вмісту нітритів [12]. Білок визначали за методом Лоурі [13].

Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програми Excel та Origin [14, 15].

Результати й обговорення

Встановлено, що афлатоксин В1 у щодобовій дозі 15 мкг/кг зумовлює істотне зниження сумарної активності NOS (рис. 1) та вмісту нітритів (рис. 2) у лейкоцитах тварин впродовж 14-добового експерименту.

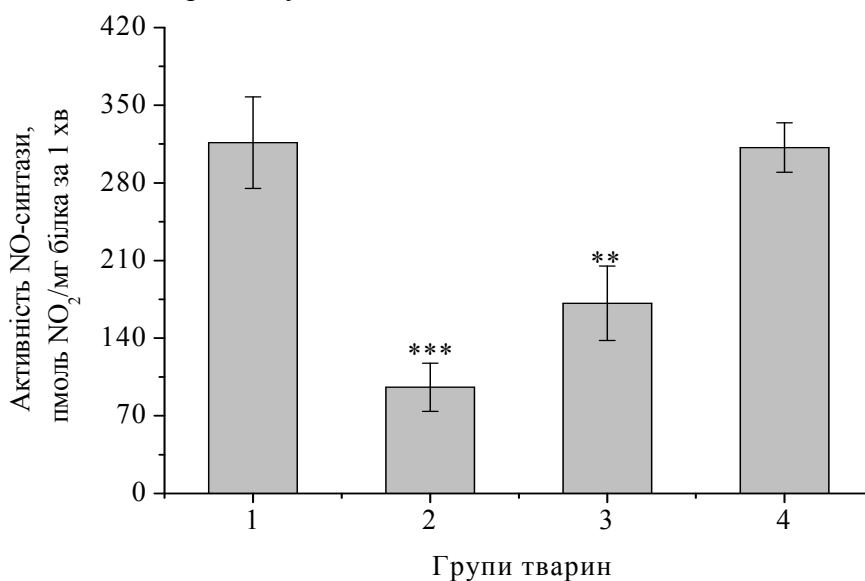


Рис. 1. Активність NOS у лейкоцитах щурів за умов інтоксикації афлатоксином В1:

1 — контроль; 2 — афлатоксин В1, 15 мкг/кг маси тіла;
3 — афлатоксин + препарат «Вітакорм-БСР-Форте»; 4 — препарат «Вітакорм-БСР-Форте»

Примітка: * — $P<0,05$; ** — $P<0,01$; *** — $P<0,001$ порівняно з контролем

Активність NOS у лейкоцитах щурів, котрим вводили лише афлатоксин (рис. 1), була меншою на 70 % ($P < 0,001$), порівняно з контрольною групою. У тварин, яким вводили афлатоксин і препарат «Вітакорм-БСР-Форте», активність ферменту зменшувалася на 46 % ($P < 0,01$). В лейкоцитах щурів четвертої групи активність ферменту була близькою до контрольних значень.

У щурів, яким вводили афлатоксин В1, концентрація нітритів (рис. 2) у лейкоцитах зменшувалася більше ніж у 6 разів, порівняно з результатами в контрольній групі. Концентрація нітритів у клітинах тварин третьої групи була близькою до контролю. Результати у першій (контрольній) та четвертій групах також істотно не відрізнялися.

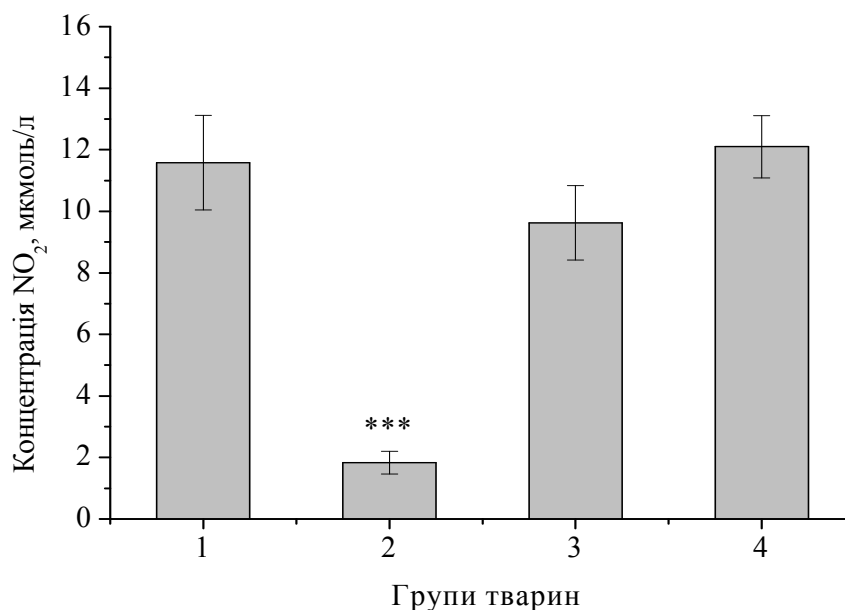


Рис. 2. Концентрація нітритів у лейкоцитах щурів за дії афлатоксину В1:

1 — контроль; 2 — афлатоксин В1, 15 мкг/кг маси тіла;
3 — афлатоксин + препарат «Вітакорм-БСР-Форте»; 4 — препарат «Вітакорм-БСР-Форте»

Результати експерименту свідчать, що АFB1 істотно впливає на систему оксиду азоту, спричиняючи пригнічення загальної активності NOS в лейкоцитах периферичної крові піддослідних щурів. Зниження інтенсивності синтезу оксиду азоту внаслідок інгібування NOS в досліджуваних клітинах супроводжується зменшенням вмісту нітритів. Установлені ефекти можуть бути однією з ланок механізмів токсичного впливу АFB1 на клітини крові та зумовлювати порушення функціональної активності лейкоцитів [16].

Водночас результати досліджень свідчать про ефективність фітопрепарату «Вітакорм-БСР-Форте» зменшенні зумовлених афлатоксином В1 метаболічних порушень в клітинах крові тварин.

Висновки

1. Введення в організм щурів афлатоксину В1 у дозі 15 мкг/кг впродовж 14 діб призводить до істотного зниження загальної активності NO-синтаз і зменшення рівня нітритів в лейкоцитах периферичної крові щурів.

2. Введення фітопрепарату «Вітакорм-БСР-Форте» зумовлює нормалізацію загальної активності NOS та рівня нітритів в лейкоцитах.

Перспективи подальших досліджень. У зв'язку з актуальністю розробки методів зменшення впливу афлатоксину на біохімічні процеси в організмі тварин та попередження афлатоксикозів доцільно проводити подальші дослідження дії афлатоксину В1 та біологічно активних коригувальних препаратів на метаболізм у клітинах тварин.

Ch. M. Golovchak, H. L. Antonyak, I. A. Lysik

EFFECTS OF AFLATOXIN B1 AND PREPARATION «VITAKORM-BSR-FORTE» ON NO-SYNTASE ACTIVITY IN RAT LEUKOCYTES

S u m m a r y

The effects of aflatoxin B1 (AFB1) and herbal preparation «Vitakorm-BSR-Forte» on general activity of NO-synthases (NOS) in leukocytes of peripheral blood of white rats were analysed. It was established that the development of experimental aflatoxicosis, provoked by intraperitoneal administration of AFB1 (15 mkg/kg every day) lasting 14 days, was accompanied by a significant decrease in NOS activity compared to control. Inhibition of NOS activity in blood cells was accompanied by a decrease in nitrite content. The using of preparation «Vitakorm-BSR-Forte» led to normalization of these indices in leukocytes. Our results demonstrate the effectiveness of phytopreparation «Vitakorm-BSR-Forte» in reducing of metabolic abnormalities in animal blood cells caused by aflatoxin B1.

X. M. Головчак, Г. Л. Антоняк, И. А. Лысик

ВЛИЯНИЕ АФЛАТОКСИНА В1 И ПРЕПАРАТА «ВИТАКОРМ-БСР-ФОРТЕ» НА АКТИВНОСТЬ NO-СИНТАЗ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРЫС

А н н о т а ц и я

Исследовано влияние афлатоксина В1 (AFB1) и препарата растительного происхождения «Витакорм-БСР-Форте» на суммарную активность NO-синтаз (NOS) в лейкоцитах периферической крови лабораторных крыс. Установлено, что развитие экспериментального афлатоксикоза, который вызывали ежедневным внутрибрюшинным введением AFB1 (15 мкг/кг) продолжительностью 14 суток, сопровождается значительным снижением активности NOS по сравнению с контролем. Ингибирование NOS в исследуемых клетках сопровождается уменьшением содержания нитритов. Применение препарата «Витакорм-БСР-Форте» приводит к нормализации указанных показателей. Результаты исследований свидетельствуют об эффективности фитопрепарата «Витакорм-БСР-Форте» в уменьшении обусловленных афлатоксином В1 метаболических нарушений в клетках крови животных.

1. *Shan V.* Nitric oxide in gastrointestinal health and disease / V. Shan, G. Lyford, G. Gores // *Gastroenterology*. — 2004. — Vol. 126. — P. 903–913.

2. *Tomita R.* Role of nitric oxide in the colon of patients with slow-transit constipation / R. Tomita, S. Fujisaki, T. Ikeda // *Dis. Colon. Rectum*. — 2002. — Vol. 45. — P. 593–600.

3. *Laurin P.* Increase in nitric oxide urinary products during gluten challenge in children with celiac disease / P. Laurin, K. Falth-Magnusson, T. Sundqvist // *Scand. J. Gastroenterol.* — 2003. — Vol. 38, № 1. — P. 55–60.

4. Лазебник Л. Б. Роль оксида азота (NO) в патогенезе некоторых заболеваний органов пищеварения / Л. Б. Лазебник, В. Н. Дроздов, Е. Н. Барышников // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2005. — № 2. — С. 4–11.
5. Крилова О. О. Роль NO в розвитку хронічного панкреатиту / О. О. Крилова // Буковинський медичний вісник. — 2011. — Т. 15, № 2 (58). — С. 218–221.
6. Ярошенко Т. Я. Роль оксиду азоту в механізмах ураження печінки ксенобіотиками : дис. канд. біол. наук : 03.00.04 / Т. Я. Ярошенко. — Львів, 2007. — 181 с.
7. Антоняк Г. Л. Афлатоксини: Біологічні ефекти та механізми впливу на організм тварин і людини / Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич, О. М. Стефанишин // Біологія тварин. — 2009. — Т. 11. № 1–2. — С. 17–27.
8. Духницький В. Б. Ветеринарна мікотоксикологія: навчальний посібник / В. Б. Духницький, Г. О. Хмельницький, Г. В. Бойко, В. Д. Іщенко. — К., 2010. — 203 с.
9. Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / Д. Н. Маянский, А. Н. Маянский. — Новосибирск : Наука, 1989. — 200 с.
10. Тотолян А. А. Клетки иммунной системы / А. А. Тотолян, И. С. Фрейдлин. — СПб. : Наука, 2000. — 232 с.
11. Лаповець Л. Лабор. імунологія / Л. Лаповець, Б. Луцик. — К., 2004. — 173 с.
12. Сибірня Н. О. та ін. Методи дослідження системи крові : Навчально-методичний посібник / Н. О. Сибірня, В. А. Бурда, Я. П. Чайка. — Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2005. — 100 с.
13. Lowry O. H. Protein determination with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М. : Высш. шк., 1990. — 352 с.
15. Лапач С. И. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. И. Лапач, А. В. Губенко, П. П. Бабич. — К. : Морион, 2000. — 319 с.
16. Антоняк Г. Л. Вплив афлатоксину В1 на процеси пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантну систему еритроцитів і гепатоцитів щурів / Г. Л. Антоняк, Р. О. Федяков, Н. К. Коваль // Вісник ОНУ. — 2011. — Т. 16, № 6. — С. 5–11.

Рецензент: докторант, кандидат сільськогосподарських наук Ткачук В. М.