УДК 574:632.154-07

О. П. Коротун

АНАЛІЗ ЕФЕКТУ ТА ЧУТЛИВОСТІ БІОМАРКЕРІВ ДО ШКІДЛИВОГО ВПЛИВУ ПЕСТИЦИДІВ ІМІДАКЛОПРИДУ ТА ДИМЕТОАТУ

ДП НДІ медико-екологічних проблем, м. Чернівці

В Україні щороку інсектицидами обробляється 62-67% території. При цьому однією з найбільш поширених груп пестицидів залишаються фосфорорганічні, а за останні роки постійно збільшується питома вага площ, оброблених інсектицидами з групи тіо- та неонікотиноїдів [1]. Типовими представниками цих груп є диметоат та імідаклоприд.

Актуальним завданням сучасних гігієнічних та токсикологічних досліджень є визначення поглинутої дози ксенобіотика та її індикаторів, тобто біологічних маркерів [2]. Якщо маркери впливу та ефекту знайшли своє застосування як критерії шкідливої дії в методології оцінки ризику, то роботи, присвячені вивченню біомаркерів схильності, залишаються поодинокими, а у практиці гігієнічного нормування не застосовуються взагалі. В той же час, визначення схильності до полютантів тих чи інших груп людей, так званих "груп ризику", пошук маркерів схильності є одним з основних завдань, висунутих Європейським комітетом з довкілля та здоров'я [2]. За даними літератури [3] відомий ряд прикладів, коли біомаркером схильності до тієї чи іншої патології виступає генетично детермінована активність детоксикаційних ферментних систем, зокрема N-ацетилтрансферази: "повільний" тип свідчить про більшу схильність до раку сечовидільних шляхів у працівників, які контактують з барвниками, незлоякісного азбестозу і мезотеліоми легень, шкідливого впливу 1,1-диметилгідразину; в той час як "швидкий" тип метаболізму є маркером схильності до розвитку раку прямої кишки у осіб, які зазнають впливу ароматичних амінів, пневмоконіозу у зварювальників, підгострої нітратно-кадмієвої інтоксикації у статевозрілих щурів тощо. Однак, відсутні дані про зв'язок типу ацетилювання зі схильністю до шкідливої дії пестицидів, зокрема імідаклоприду та диметоату.

Метою нашої роботи було проведення порівняльної гігієнічної оцінки біомаркерів ефекту та схильності до шкідливої дії пестицидів імідаклоприду та диметоату.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на білих аутбредних статевозрілих (віком 6 міс) щурах-самцях, яких утримували в умовах віварію (температура повітря — 18-20°С, відносна вологість 30-60%). Тварини отримували стандартний гранульований корм для лабораторних щурів (виробництва АТЗТ "Фенікс", Україна) та водогінну воду без обмежень. Вміст пестицидів у кормах та воді не перевищував їх ГДК. Усі роботи з тваринами проводились згідно ОСТ 42 1-88 "Тварини лабораторні. Технологічний процес", з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях від 18.03.1986 р., Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р.

Кількість тварин у статистичній групі становила 6-8.

Тип ацетилювання визначали за допомогою амідопіринового тесту [4]. На основі відсотка виведеного з сечею N-ацетил-4-аміноантипірину щурів поділили на тварин з "швидким" та "повільним" типом ацетилювання.

Серед "швидких" і "повільних" ацетиляторів було виділено підгрупи контрольних та дослідних тварин.

Гостру інтоксикацію моделювали шляхом однократного внутрішньошлункового введення ксенобіотиків у дозах, близьких до DL_{50} (1000 мг/кг імідаклоприду та 200 мг/кг диметоату). Спостерігали за часом загибелі тварин та кількістю загиблих тварин у групі. DL_{50} розраховували за методом Ван-дер-Вардена [5].

Підгостру інтоксикацію імідаклопридом проводили шляхом 28-денного введення пестициду за допомогою зонду в шлунок тварин у вигляді крохмального розчину в дозі, що відповідає 10 NOAEL [6].

Інтоксикацію диметоатом моделювали шляхом внутрішньошлункового введення водного розчину з розрахунку 5 мг/кг, що відповідає 10 NOAEL для диметоату [7], протягом 28 днів.

На 7, 14, 21 і 28 день експерименту вивчали функціональний стан центральної нервової системи (ЦНС) за показниками поведінкових реакцій: горизонтальна рухова активність (ГРА), вертикальна рухова активність (ВРА), норковий рефлекс (НР), емоційна реактивність (ЕР) та інтегральна поведінкова активність (ІПА) методом відкритого поля [8], а також оцінювали динаміку зміни маси тіла тварин.

Стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в крові та печінці тварин оцінювали на основі визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) спектрофотометричним методом, в основі якого лежить утворення забарвленого комплексу при реакції з тіобарбітуровою кислотою; вмісту окисно модифікованих білків (ОМБ) у плазмі крові, який визначали спектрофотометрично за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином; активності каталази спектрофотометрично; глутатіонредуктази (ГР) за зменшенням кількості НАДФ; глутатіонпероксидази (ГП) по кількості окисненого глутатіону, що утворився із відновленого при знешкодженні пероксиду водню в глутатіонпероксидазній реакції; глутатіон-S-трансферази (Г-S-Т) по накопиченню кон'югату відновленого глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом, який утворився у ході реакції під дією ферменту, а також концентрації церулоплазміну (ЦП) — модифікованим методом Ревіна. Методи визначення описані в [9].

Статистична обробка результатів проведена в пакеті програм

"Microsoft Excel" та "STATISTICA 6,0" з використанням параметричних і непараметричних методів оцінки одержаних даних [10]. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали при нормальному розподілі за t-критерієм Ст'юдента. Статистично вірогідними вважали зміни при p<0,05. Числові значення наведені у вигляді середніх величин та їх стандартних похибок.

Таблиця 1

Середній час (год) загибелі тварин з різним типом ацетилювання при гострій інтоксикації диметоатом та імідаклопридом

Групи тварин	Диметоат	Імідаклоприд
"Швидкі" ацетилятори	34,0±4,0	46,0±5,0
"Повільні" ацетилятори	40,0±5,5	67,0±6,5*

Примітка: * — P<0,05 по відношенню до "швидких" ацетиляторів

Результати та їх обговорення

DL_{50} імідаклоприду та диметоату вірогідно не відрізнялись у "швидких" та "повільних" ацетиляторів.

Однак, за умов гострої інтоксикації імідаклопридом виявили, що середній час загибелі був вірогідно меншим у групі тварин з "швидким" типом ацетилювання (P<0,05), хоча кількість загиблих тварин статистично не відрізнялась серед "швидких" та "повільних" ацетиляторів.

Гостра інтоксикація диметоатом викликала загибель більшої кількості тварин у групі "швидких" ацетиляторів (P<0,05). Середній час загибелі "швидких" та "повільних" ацетиляторів вірогідно не відрізнявся (табл. 1).

Одним з найважливіших інтегральних показників стану здоров'я є маса тіла. За умов впливу диметоату в тварин зі "швидким" типом ацетилювання протягом двох перших тижнів експерименту цей показник не відрізнявся від контролю. Однак, починаючи з 3 тижня його приріст сповільнився, і маса тіла дослідних тварин була вірогідно нижчою, ніж у контрольних (на 6% на 21 день та на 11% на 28).

Іншу картину спостерігали у "повільних" ацетиляторів. У цій групі тварин маса була вірогідно нижчою контрольних показників вже починаючи з першого тижня (на 11%) і до завершення експерименту (на 19%, на 14 та 21 день та на 15% на 28 день експерименту). Маса тіла дослідних тварин протягом першого тижня експерименту зменшилась, на другому тижні приріст маси тіла дослідних тварин був вірогідно нижчим контрольних. Починаючи з 3 тижня приріст маси вірогідно не відрізнявся від приросту маси контрольних тварин (рис. 1).

За умов впливу імідаклоприду у тварин з "швидким" типом ацетилювання вже після першого тижня експерименту спостерігали зменшення маси тіла, яка була вірогідно меншою, ніж у контрольних тварин (на 13%). У подальшому маса тіла тварин почала збільшуватись, що, ймовірно, можна пояснити активацією адаптаційних механізмів організму, однак залишалась вірогідно нижчою, ніж у контрольній групі. Середній потижневий приріст маси, починаючи з другого тижня статистично вірогідно не відрізнявся від контрольних показників.

У "повільних" ацетиляторів протягом перших 2 тижнів експерименту маса тіла дослідних тварин збільшувалася і вірогідно не відрізнялася від показників контролю. Однак, приріст маси на 2 та 3 тижні був вірогідно меншим і, починаючи з 3 тижня, маса тіла дослідних тварин була вірогідно меншою, ніж контрольних (на 12% на 21 та 28 день експерименту) (рис. 2).

Таким чином, за умов інтоксикації вказаними ксенобіотиками спостерігаються неоднакові зміни динаміки маси тіла тварин з різним типом ацетилювання. Інтоксикація диметоатом викликає більш ранні зміни цього показника у "повільних" ацетиляторів, а імідаклоприду — у "швидких".

Зміни поведінкових реакцій у "швидких" ацетиляторів за умов інтоксикації диметоатом характеризувалися зростанням ІПА (рис. 3) на першому тижні експерименту за рахунок зростання ГРА на 63% (хоча відмічалась тенденція до пригнічення НР, рис. 4). Однак, починаючи вже з другого тижня та до завершення експерименту спостерігали наростаюче пригнічення ІПА (на 42%, 56% та 178%, відповідно). Найбільшого пригнічення зазнали показники НР (рис. 4) та, в подальшому, ГРА та ВРА.

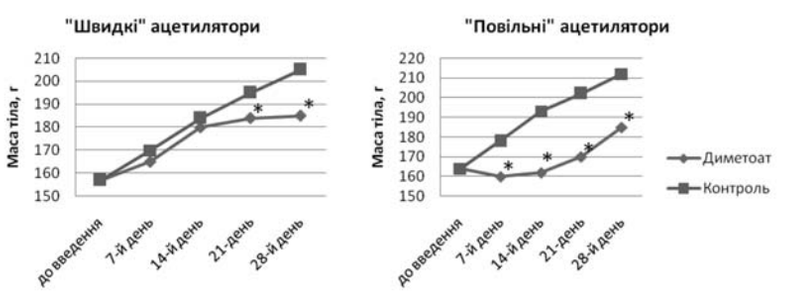

Рис. 1. Динаміка зміни маси тіла статевозрілих щурів з різним типом ацетилювання за умов впливу диметоату.
На цьому та рис. 2-10 * — P<0,05 стосовно контролю.

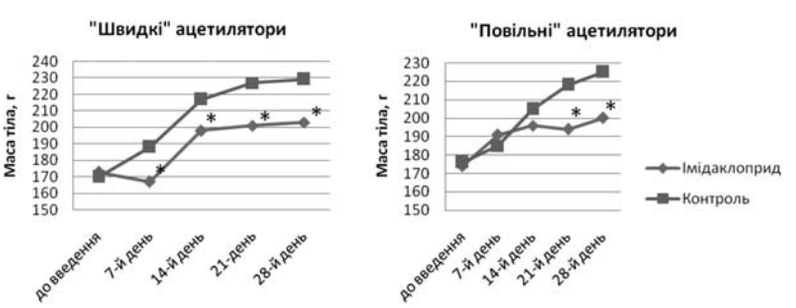

Рис. 2. Динаміка зміни маси тіла статевозрілих щурів з різним типом ацетилювання за умов впливу імідаклоприду.

У тварин з "повільним" типом ацетилювання спостерігалася тенденція до підвищення ІПА (рис. 5) після першого та другого тижня експерименту, в основному, за рахунок ГРА. Однак, на 3 тижні експерименту ІПА була вірогідно нижчою, ніж у контрольній групі тварин на 48% (за рахунок зниження НР, рис. 6, та ВРА), а на 28 день — на 54% (найбільше зниженою виявилася ГРА).

Інтоксикація імідаклопридом також змінювала функціональний стан ЦНС. У "швидких" ацетиляторів виявили вірогідне пригнічення ІПА на 65% вже після першого тижня введення імідаклоприду та залишалася зниженою до кінця експерименту (на 84%, 76% та 50% на 14, 21 та 28 день експерименту, відповідно). До того ж на першому та другому тижні зменшеними виявилися показники ГРА (на 57% та 66%), на третьому ВРА (втричі), ГРА (на 45%) та НР (на 80%), наприкінці експерименту — ВРА (на 76%), в той час як ГРА не відрізнялася від контролю (рис. 7).

Найбільших змін зазнав показник НР, який вже після першого та другого тижня виявився пригніченим втричі порівняно з контролем, після третього — на 80%, а наприкінці експерименту -в п'ять разів стосовно контролю (рис. 8).

У той же час у тварин з "повільним" типом ацетилювання після першого тижня експерименту вірогідно знизився лише НР (спостерігали його різке пригнічення, рис. 10), а ІПА в цілому мала лише тенденцію до зниження (рис. 9). На 14 день введення ІПА виявилась вірогідно нижчою порівняно до контролю, за рахунок зниження ГРА (на 24%), ВРА (на 46%) та НР (на 192%). Однак, у подальшому (на 21 та 28 дні експерименту) показники поведінкових реакцій дослідних тварин узагалі не відрізнялися від контрольних.

Отже, вплив як імідаклоприду, так і диметоату викликає більш виражені зміни функціонального стану ЦНС у тварин з "швидким" типом ацетилювання, що є свідченням їх схильності до інтоксикації цими ксенобіотиками.

Відомо, що баланс прооксидантних та антиоксидантних процесів є необхідною умовою нормального функціонування організму. Зміни цього співвідношення можуть бути як пристосувальною реакцією, так і

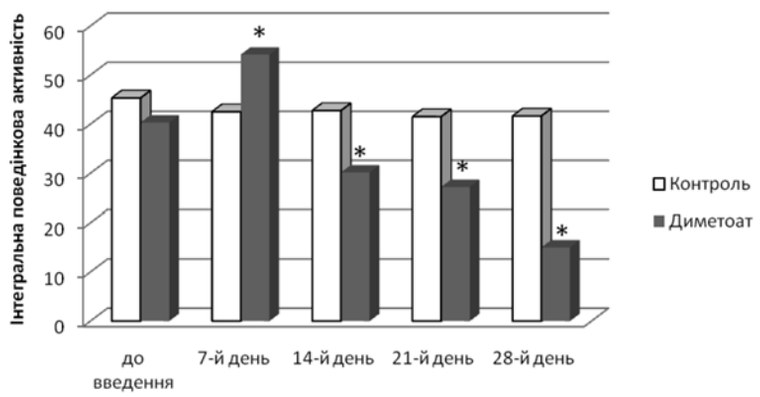

Рис. 3. Вплив диметоату на ІПА статевозрілих щурів з "швидким" типом ацетилування.

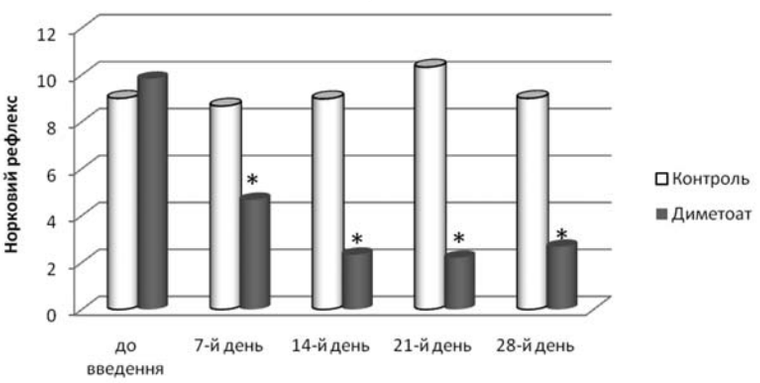

Рис. 4. Вплив диметоату на НР статевозрілих щурів з "швидким" типом ацетилування.

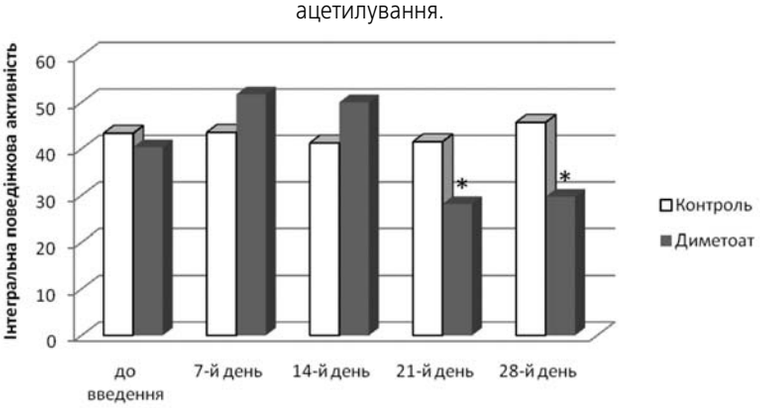

Рис. 5. Вплив диметоату на ІПА статевозрілих щурів з "повільним" типом ацетилування.

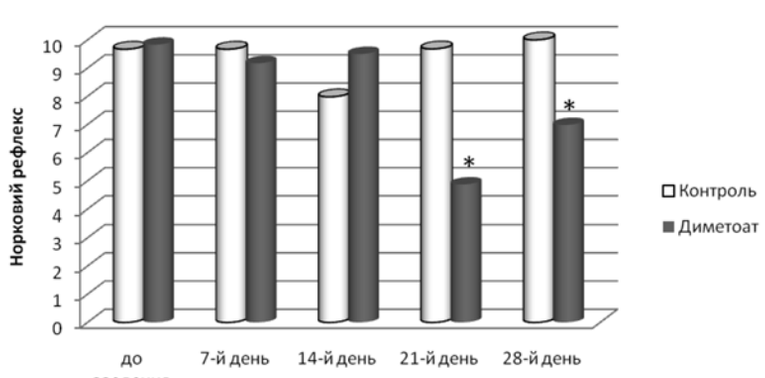

Рис. 6. Вплив диметоату на НР статевозрілих щурів з "повільним" типом ацетилування.

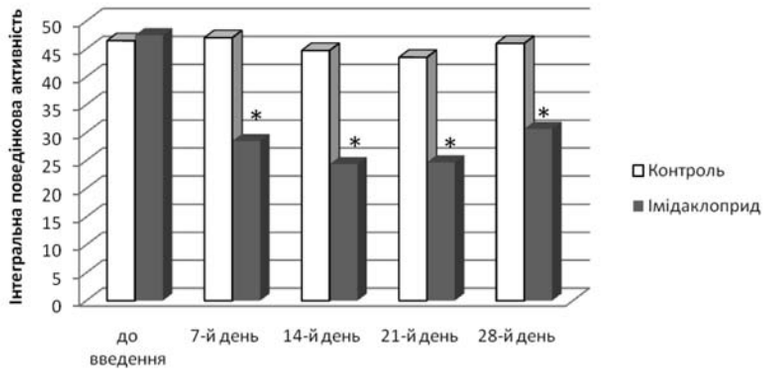

Рис. 7. Вплив імідаклоприду на ІПА статевозрілих щурів зі "швидким" типом ацетилування.

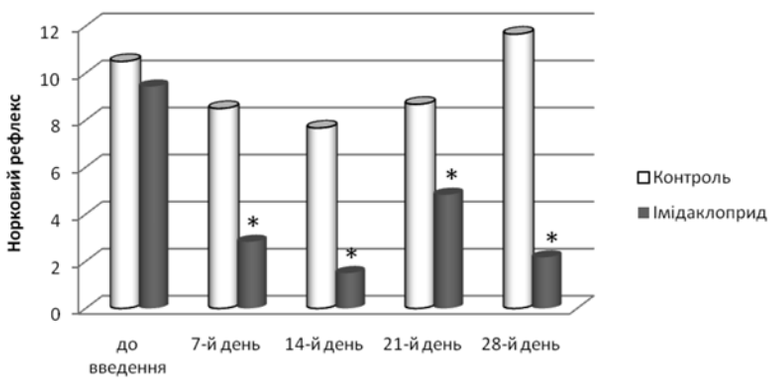

Рис. 8. Вплив імідаклоприду НР статевозрілих щурів зі "швидким" типом ацетилування.

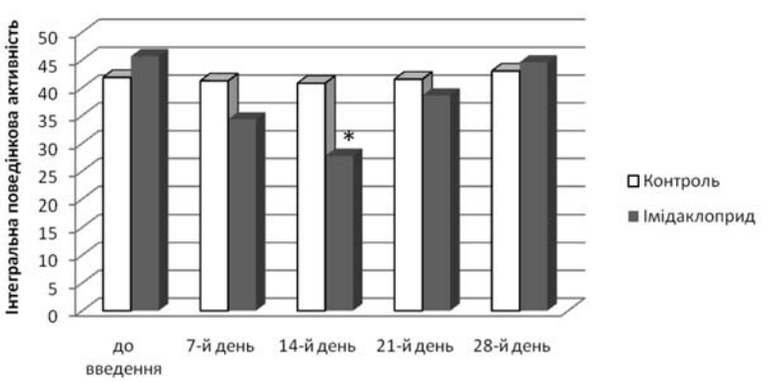

Рис. 9. Вплив імідаклоприду на ІПА статевозрілих щурів з "повільним" типом ацетилування.

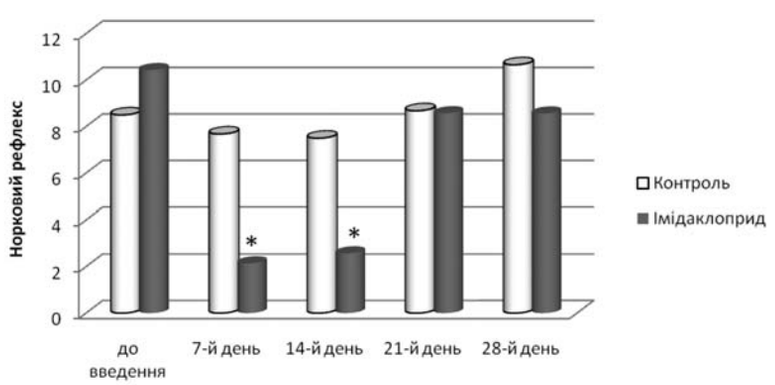

Рис. 10. Вплив імідаклоприду на НР статевозрілих щурів з "повільним" типом ацетилування.

патологією й може виступати біомаркером ефекту впливу ксенобіотиків.

У попередніх дослідженнях нами було показано, що при підгострому впливі імідаклоприду на рівні порогових доз у тварин з "швидким" типом ацетилювання спостерігаються більш виразні зміни показників перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту крові та печінки (зростання рівня МДА, пригнічення активності ГП у крові та печінці, пригнічення активності ГР печінки) [11].

За умов підгострого впливу диметоату у тварин з "швидким" типом ацетилювання спостерігали пригнічення активності каталази крові на 42% та ГР крові на 72%.

Показники перекисного окиснення ліпідів крові "повільних" ацетиляторів за умов підгострого впливу диметоату не зазнали змін, а антиоксидантного захисту характеризувалися зростанням активності ГР на 46%, зниженням активності Г-S-Т на 56% (табл. 2).

У печінці тварин з "швидким" типом ацетилювання спостерігали зростання рівня МДА на 34%, яке супроводжувалося більш вираженим, ніж у "повільних" ацетиляторів, зростанням активності ГР (табл. 3).

Крім того у "швидких" ацетиляторів відбувалося підвищення рівня продуктів ОМБ крові на 22% та печінки на 31% та зростання рівня церулоплазміну на 33%.

Отже, у тварин з різною швидкістю ацетилювання спостерігаються різноспрямовані зміни прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. Для "швидких" ацетиляторів характерним є зростання рівня показників перекисного окиснення ліпідів (МДА) та білків (ОМБ), яке супроводжується пригніченням активності ряду ферментів антиоксидантного захисту (каталаза, ГР крові). Виявляється кореляційний зв'язок між пригніченням ІПА й активності каталази ($r = 0,63$, $P<0,05$) та між пригніченням ІПА та зростанням рівня продуктів ОМБ крові ($r = -0,72$, $P<0,05$) у тварин зі "швидким" типом ацетилювання. Вищенаведене свідчить про наявність у організмі тварин патологічних змін.

У той же час, для "повільних" ацетиляторів більш характерним є зростання активності ферментів антиоксидантного захисту без зміни

Таблиця 2

Показники перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в крові тварин з різним типом ацетилювання за умов підгострого впливу диметоату

Групи тварин	Каталаза, од.		ГП, нмоль/хв·мг білка		ГР, нмоль/хв·мг білка		Г-S-Т, нмоль/хв·мг білка		МДА, мкмоль/л	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Контроль (n=6)	11,90± 0,36	8,76± 0,69	281,37± 3,26	345,49± 11,79	3,30± 0,18	1,83± 0,06	5,70± 0,45	5,43± 0,18	15,70± 0,36	16,03± 0,59
Диметоат (n=6)	8,39± 0,81*	7,76± 0,43	283,95± 3,12	317,39± 21,68	1,92± 0,11*	2,67± 0,18*	5,74± 0,14	3,42 ± 0,18*	15,98± 0,41	15,28± 0,68

Примітки: в цій та табл. 3 * — P<0,05 стосовно контролю ; I — "швидкі" ацетилятори; II — "повільні" ацетилятори.

Таблиця 3

Показники перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в печінці тварин з різним типом ацетилювання за умов підгострого впливу диметоату

Групи тварин	Каталаза, од.		ГП, нмоль/хв·мг білка		ГР, нмоль/хв·мг білка		Г-S-Т, нмоль/хв·мг білка		МДА, мкмоль/л	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Контроль (n=6)	28,90± 0,81	28,27± 0,52	298± 11,12	307± 8,70	4,07± 0,40	5,42± 0,16	25,38± 2,01	21,12± 1,67	21,58± 1,69	22,34± 2,03
Диметоат (n=6)	28,45± 0,16	28,14± 0,14	287± 4,35	317± 6,13	5,69± 0,33*	6,53± 0,35*	23,90± 1,94	24,70± 2,04	29,02± 2,12*	20,07± 1,48

рівнів показників прооксидантної системи, що може бути проявом адаптаційних реакцій організму.

Висновки.

1. "Швидкий" тип ацетилювання є біомаркером схильності до гострого та підгострого ізольованого впливу імідаклоприду та диметоату для статевозрілих тварин.
2. Біомаркерами ефекту гострої інтоксикації імідаклопридом є середній час загибелі тварин, підгострої — більш рання втрата маси тіла, більш виражене і стале пригнічення ІПА та НР у тварин з "швидким" типом ацетилювання.
3. Біомаркерами ефекту підгострої інтоксикації диметоатом є зміни поведінкових реакцій, зокрема пригнічення ІПА та НР, а також зміни показників прооксидантно-антиоксидантної рівноваги (зростання рівня продуктів ОМБ у крові та печінці, рівня МДА та активності ГР печінки, пригнічення активності ГР та каталази та зростання рівня церулоплазміну в крові) у "швидких" ацетиляторів.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шепета К.* Безпечність пестицидів, що застосовуються у рослинництві. //СЕС. — 2005. — № 6. — С. 86-91.
2. *Тимченко О. І., Сердюк А. М., Турос О. І.* Гігієна довкілля: політика, практика, перспективи. — К., 2000. — 128 с.
3. *Кметь Т. І.* Гігієнічне значення комбінованої дії нітрату натрію та хлориду кадмію з урахуванням вікових особливостей та характеру метаболізму. Автореф. дис. ... канд. мед. наук:14.02.01. — Чернівці, 2006. — 26с.
4. Биохимические методы в токсикологическом эксперименте и клинике: Методическое руководство. — К.,1985. — 89 с.
5. Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду (под ред. А. А. Каспарова, И. В. Саноцкого). — М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1986. — 426 с.
6. Imidacloprid, Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides (NCAP)Cox, Caroline, Insecticide Factsheet // J. Pesticide Reform. — 2001. — V. 21, N. 1.- P. 15-21.
7. *Перехрестенко В. А., Авраменко В. Г.* Вплив диметоату на показники центральної нервової системи щурів і активність холінестерази при субхронічному надходженні в організм / Тези доп. VI Міжнар. наук.-практ. конференції "Актуальні проблеми токсикології. Безпека життєдіяльності людини". — К, 2005. — С. 32.
8. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. — М.: Высшая школа, 1991. — 399 с.
9. *Давидова Н. В.* Біохімічні механізми антиоксидантної дії екстракту радіоли рідкого. Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.04. — Чернівці, 2004. — 22 с.
10. *Антомонов М. Ю.* Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. — К., 2006. — 558 с.
11. *Коротун О. П. Власик Л. І.* Гігієнічна оцінка біомаркерів ефекту та схильності за умов комбінованої та ізольованої дії нітрату натрію та імідаклоприду // Гігієна населених місць. — 2007. — Вип. 49. — С. 109-114.

Е. П. Коротун

АНАЛИЗ ЭФФЕКТА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТІ БИОМАРКЕРОВ К ВРЕДНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ПЕСТИЦИДОВ ИМИДАКЛОПРИДА И ДИМЕТОАТА

Показано, что "быстрый" тип ацетилирования является биомаркером предрасположенности к интоксикации данными ксенобиотиками. Изменения массы тела, поведенческих реакций и нарушение прооксидантно-антиоксидантного равновесия могут служить биомаркерами эффекта подострого вредного воздействия диметоата и имидаклоприда.

O. P. Korotun

ANALYSIS OF THE EFFECT AND SUSCEPTIBILITY BIOMARKERS TO INFLUENCE OF THE PESTICIDES DIMETOAT AND IMIDACLOPRID

It has been shown, that "rapid" acetylation type is a biomarker of susceptibility to intoxications with the mentioned compounds. Changes of body weight, behavioral reactions, imbalance of prooxidant and antioxidant system may serve the biomarkers of effect to subacute harmful influence of the dimetoat and imidacloprid.