

ТОКСИКОКІНЕТИКА КУПРУМУ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОШЛУНКОВОГО ВВЕДЕННЯ НАНОКОМПОЗИТУ МЕТАЛІВ (Ag, Cu, Fe, ДВООКИС Mn) ЗА УМОВ ГОСТРОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ**Оробченко О.Л.**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Купрум – це життєво необхідний (есенціальний елемент), що є кофактором більше 30 ензимних систем у живому організмі, які забезпечують численні процеси життєдіяльності та стійкості його до бактеріальних інфекцій та інвазій [1]. Нестача або надлишок Купруму в організмі тварин призводить до виникнення патологічних процесів, унаслідок чого знижується їх продуктивність та якість продукції, підвищується сприйнятливість до інфекційних захворювань, тому на сьогодні актуальним є пошук доступних, високозасвоєваних і біобезпечних форм Купруму, зокрема, особлива увага приділяється наночасткам даного металу [2–4]. Одним з найважливіших етапів токсикологічного дослідження препаратів є визначення токсикокінетики (особливостей розподілу, накопичення речовини в організмі та її елімінації), тому метою нашої роботи стало дослідження токсикокінетики Купруму у щурів після внутрішньошлункового введення наноконкомпозиту металів (Ag, Cu, Fe, двоокис Mn) за умов гострого експерименту.

Матеріали та методи досліджень. Дослід був проведений в умовах віварію ННЦ «ІЕКВМ» на статевозрілих щурах-самцях (n=144) лінії *Ві-стар* масою 200–250 г. За принципом аналогів було сформовано 6 груп тварин по 24 щури в кожній.

Експериментальні дослідження на тваринах були проведені з урахуванням основних принципів біоетики. Утримання, догляд за тваринами та їх годівлю здійснювали згідно з нормами та раціонами, рекомендованими для даного виду лабораторних тварин. За період досліді щури всіх груп мали вільний доступ до води.

Композиційну суміш із наночасток металів було складено на підставі отриманих нами результатів дослідження біобезпеки, а саме: генотоксичності, мутагенності й загальної токсичності – за умов *in vitro*. Тому, дослідний зразок наноконкомпозиту металів (НкМе) містив наночастки Аргентуму (31,5±0,9 нм), Купруму (38,0±4,0 нм), Феруму (100,0±10,0 нм) і двоокису Мангану (27,0±3,0 нм) в аліквотному співвідношенні з кінцевою концентрацією 100 мкг/см³ за кожним металом. Концентрація відповідних металів в іонній формі в розчині суміші солей – AgNO₃, CuSO₄ • 5H₂O, MnSO₄ • 5H₂O і FeSO₄ • 7H₂O, відповідно дорівнювала 100 мкг/см³ за металом.

Тваринам I і II дослідних груп одноразово вводили *per os* біотичну дозу НкМе й суміші солей відповідних металів з розрахунку 0,3 мг/кг маси тіла, а тваринам III, IV і V дослідних груп – дози НкМе, що перевищували рекомендовану біотичну дозу препарату, а саме: 1,0, 2,0 і 4,0 мг/кг маси тіла, тварини контрольної групи одержували фізіологічний розчин натрію хлориду 2,0 см³/щура.

Протягом досліді проводили спостереження за клінічним станом і поведінкою тварин усіх груп. Для визначення токсикокінетики (розподілу, накопичення й елімінації Купруму) на 1, 3, 7 і 14 добу після початку досліді проводили декапітацію 6 тварин із групи (за умов легкого хлороформного наркозу) і відбирали зразки таких органів і тканин: шлунка, тонкого й товстого кишечника із змістом, крові, печінки, селезінки, нирок, головного мозку, серця, легень, сім'яників, м'язів, шерсті зі шкірою. Купрум в біологічному матеріалі визначали методом рентген-флуоресцентного аналізу, згідно з методичними рекомендаціями [5]. Результати досліджень статистично оброблені із використанням пакета програм Microsoft Excel, вірогідність отриманих результатів оцінювали за критерієм Ст'юдента.

Результати досліджень. Клінічні спостереження за щурами протягом 14 діб показали, що загальний стан організму тварин як контрольної, так і дослідних (I – V) груп був задовільним: щури були рухливі, адекватно реагували на зовнішні подразники. Загибелі тварин за весь період спостереження не зафіксовано.

Уміст Купруму в шлунку дослідних щурів на 1-шу добу після введення НкМе та суміші солей металів був вищим (P<0,05; P<0,001) у I, III, IV та II дослідних групах на 220 %, 205 %, 125 % та 30 % відповідно, тоді як у V дослідній групі, щури якої отримували найвищу дозу НкМе (4,0 мг/кг маси тіла), вміст Купруму вірогідно не відрізнявся від контролю.

На 3-тю добу досліді вміст Купруму в шлунку щурів був вищим (P<0,05; P<0,001) у всіх дослідних групах, причому простежувався дозозалежний ефект (окрім V дослідної групи). Так у щурів IV дослідної групи вміст Купруму був вищим на 110 %, III групи – на 86 %, II групи – на 80 % і у щурів I дослідної групи – на 52 %, тоді як у щурів V дослідної групи лише на 33 %.

На 7-му добу експерименту вміст Купруму в шлунку щурів вірогідно перевищував контроль лише у групах, що отримували біотичні дози НкМе (0,3 мг/кг маси тіла) – на 82 % та суміш солей металів – на 69 % (P<0,01; P<0,001), тоді як в останніх дослідних групах показник вмісту Купруму вірогідно не відрізнявся від контролю.

На останньому терміні досліджень (14-добу досліді) вміст Купруму не відрізнявся від контрольного показника в групах, що отримували НкМе та суміш солей металів у біотичній дозі (0,3 мг/кг маси тіла), тоді як у III дослідній групі вміст Купруму вірогідно перевищував контроль на 25 %, а в групах щурів, які отримували максимальні дози НкМе, був нижче за контроль на 29 % та 35 % відповідно у IV та V дослідних групах.

Низький вміст Купруму в шлунку щурів V дослідної групи на перших двох термінах досліджень спостерігався, напевно, унаслідок кратного введення НкМе, тобто нано-Купрум пройшов транзитом через шлунок до наступних відділів.

На 1-шу добу досліджень вміст Купруму в тонкому відділі кишечника щурів, що отримували НкМе у всьому дозовому діапазоні, вірогідно перевищував контроль: у I дослідній групі (НкМе 0,3 мг/кг маси тіла) на 58 %, III дослідній групі (НкМе 1,0 мг/кг маси тіла) – на 92 %, IV дослідній групі (НкМе 2,0 мг/кг маси тіла) – на 42 %, V дослідній групі (НкМе 4,0 мг/кг маси тіла) – на 46 %, тоді як вміст Купруму в товстому кишечнику щурів II дослідної групи (суміш солей металів 0,3 мг/кг маси тіла) був незначно нижчим за контроль.

На 3-тю добу досліджень вміст Купруму в тонкому відділі кишечника щурів I, III і V дослідних груп мав лише тенденцію до зниження, тоді як у щурів IV дослідної групи вміст Купруму вірогідно перевищував контроль на 68 %, а у тварин II дослідної групи (суміш солей металів) був нижче контролю на 82 %.

На 7-му добу експерименту значних вірогідних змін щодо вмісту Купруму в товстому кишечнику не встановлено, лише у щурів III дослідної групи (НкМе 1,0 мг/кг маси тіла) вміст Купруму був вірогідно нижче за контроль на 32 %.

На останньому терміні досліджень (14-та доба) у щурів, що отримували підвищені дози НкМе (III, IV та V дослідні групи), вміст Купруму в товстому кишечнику був вірогідно нижче за контроль на 73 %, 51 % та 61 % відповідно, тоді як у щурів II дослідної групи (суміш солей металів) цей показник не відрізнявся від контролю, а в I дослідній групі (біотична доза НкМе) вірогідно перевищував контроль на 82 %.

На 1-шу добу досліді значних відхилень щодо вмісту Купруму в товстому кишечнику щурів не відмічали в I, III та IV дослідних групах, тоді як у щурів II дослідної групи, що отримували суміш солей металів, вміст Купруму був вірогідно нижчим за контроль на 27 %, а у щурів V дослідної групи вірогідно перевищував контроль на 19 %.

Майже аналогічну картину спостерігали і на 3-тю добу експерименту. Значних відхилень щодо вмісту Купруму в товстому кишечнику щурів не відмічали в III та IV дослідних групах, тоді як у щурів I і II дослідних груп, що отримували НкМе в біотичній дозі

**Розділ 8. Ветеринарна фармакологія та токсикологія. Якість і безпеність продуктів тваринництва.
Ветеринарно-санітарна експертиза. Екологічна та хімічна безпека**

та суміш солей металів, вміст Купруму був вірогідно нижчим за контроль на 18 % і 49 % відповідно, а у щурів V дослідної групи вірогідно перевищував контроль на 10 %.

На 7-му добу досліду відмічено тенденцію до зниження вмісту Купруму в товстому кишечнику щурів I, II та IV дослідних груп, тоді як у щурів III та V дослідних груп встановлено вірогідне підвищення вмісту Купруму на 50 % та 51 %.

На останньому терміні досліджень (на 14-ту добу експерименту) вміст Купруму в товстому кишечнику щурів I дослідної групи (НкМе 0,3 мг/кг маси тіла) вірогідно перевищував контроль на 27 %, тоді як у останніх групах реєстрували лише тенденцію: у II та IV – до зниження, а у III та V – до підвищення.

Динаміка щодо вмісту Купруму в печінці представлена на рис. 1.

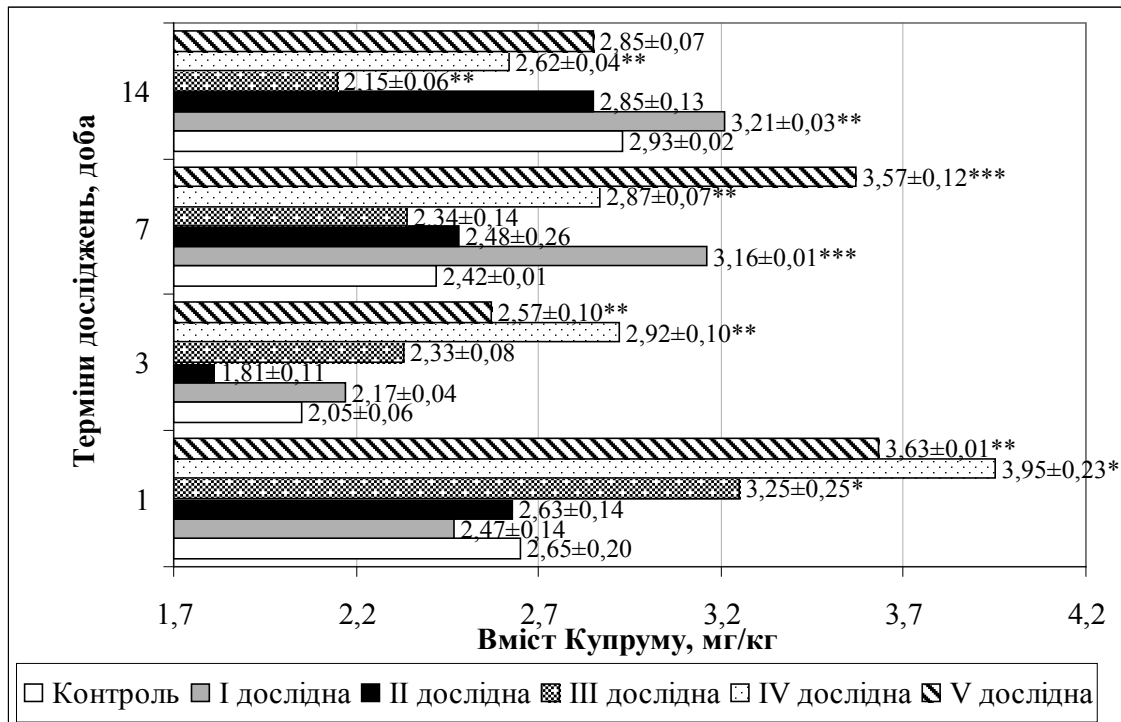


Рис. 1. Вміст Купруму в печінці щурів протягом досліду (M±m, n=3; * – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001 – відносно контролю).

На 1-шу добу досліду вміст Купруму в печінці щурів I та II дослідних груп не відрізнявся від значення контрольного показника, тоді як у щурів, які отримували підвищені дози НкМе (III, IV та V дослідні групи), вміст Купруму був вірогідно вищим за контроль на 23, 49 та 37 %.

На 3-тю добу досліду вірогідно вищими за контроль залишалися показники Купруму в печінці щурів IV та V дослідних груп на 42 та 25 % відповідно, тоді як у інших групах показник Купруму значно не відрізнявся від контролю.

На 7-му добу експерименту вміст Купруму в печінці щурів I (отримували НкМе 0,3 мг/кг маси тіла), IV (НкМе 2,0 мг/кг маси тіла) та V (НкМе 4,0 мг/кг маси тіла) дослідних груп був вірогідно вищим за контроль на 31 %, 19 % та 48 %, тоді як у щурів II (отримували суміш солей металів 0,3 мг/кг маси тіла) і III (НкМе 1,0 мг/кг маси тіла) дослідних груп вміст Купруму вірогідно не відрізнявся від контролю.

На останньому терміні досліджень (14-ту добу експерименту) вміст Купруму в печінці щурів II та V дослідних груп значно не відрізнявся від контролю, тоді як у щурів III та IV дослідних груп він був вірогідно нижче за контроль на 27 % та 11 % і у I дослідній групі перевищував контроль на 10 %.

Одним з органів, що відноситься до кровотворної функції, є селезінка (в ній відбувається «руйнування» еритроцитів).

Вміст Купруму в селезінці щурів вдалося визначити лише на 1-шу та 14 - ту доби досліджень. На 1-шу добу досліду вміст Купруму в селезінці щурів I, II та IV дослідних груп був вірогідно нижчим за контроль на 41 %, 33 % та 67 %, а у щурів III дослідної групи перевищував контроль на 17 %, тоді як у щурів V дослідної групи Купруму визначено не було.

На 14-ту добу досліду не визначено Купруму в селезінці щурів контрольної, II та V дослідної групи, тоді як у щурів I дослідної групи показник вмісту Купруму становив 0,05 мг/кг, III дослідної групи – 0,10 мг/кг і в щурів IV дослідної групи був максимальним – 1,10 мг/кг.

На 1-шу добу досліду значний вміст Купруму виявляли в легенях щурів IV дослідної групи, він на 120 % був вищим за контроль, тоді як у щурів III дослідної групи даний показник майже не відрізнявся від контрольного, а в щурів I, II та V дослідних груп був вірогідно нижчим за контроль на 43 %, 23 % та 34 %.

На 3-тю добу експерименту у щурів I дослідної групи встановлено вірогідне підвищення вмісту Купруму в легенях на 157 %. У щурів II та V дослідних груп реєстрували тенденцію до зниження вмісту Купруму, у III дослідній групі – тенденцію до його підвищення і в IV дослідній групі щурів Купруму виявити в даному органі не вдалося.

На 7-му добу досліду Купрум виявили лише в легенях щурів II та V дослідних груп.

На 14-добу вмісту Купруму не виявлено в легенях щурів II дослідної групи. Найнижчим показник вмісту Купруму був в легенях щурів III дослідної групи (на 87 % відносно контролю), децю вищим був вміст металу в I і V дослідних групах (але вірогідно нижчим за контроль на 22 % в обох групах), і в легенях щурів IV дослідної групи спостерігали тенденцію до підвищення вмісту Купруму.

Стабільною динамікою характеризувався вміст Купруму у серці дослідних щурів. На 1-шу добу дослідження вміст Купруму в серці щурів усіх дослідних груп був вірогідно нижчим за контроль: у I дослідній групі на 12 %, у II – на 36 %, III – на 16 %, IV – на 34 % і в щурів V дослідної групи – на 20 %.

На 3-тю добу експерименту вірогідних відхилень вмісту Купруму в серці не встановлено у щурів II та V дослідних груп, тоді як у I та II дослідних групах відмічено вірогідне його зниження на 53 % та 15 %, а в щурів IV дослідної групи – підвищення на 27 %.

На 7-му добу дослідження Купруму не було виявлено в серці щурів IV та V дослідних груп, що отримували НкМе в дозах 2,0 та 4,0 мг/кг маси тіла, а у серці щурів I, II та III дослідних груп встановлено вірогідне зниження вмісту Купруму на 63 %, 29 % та 43 % відповідно.

Схожу картину спостерігали і на 14-ту добу дослідження: не було виявлено Купруму в серці щурів V дослідної групи, а у серці щурів I, II, III та IV дослідних груп встановлено вірогідне зниження вмісту Купруму на 99 %, 13 %, 26 % та 14 % відповідно.

Динаміку щодо вмісту Купруму в нирках щурів представлено на рис. 2.

На 1-шу добу досліджень вміст Купруму вірогідно перевищував контроль лише в нирках щурів I дослідної групи, що отримували НкМе 0,3 мг/кг маси тіла, на 25 %. У щурів II, III, IV та V дослідних груп вірогідних змін вмісту Купруму не встановлено.

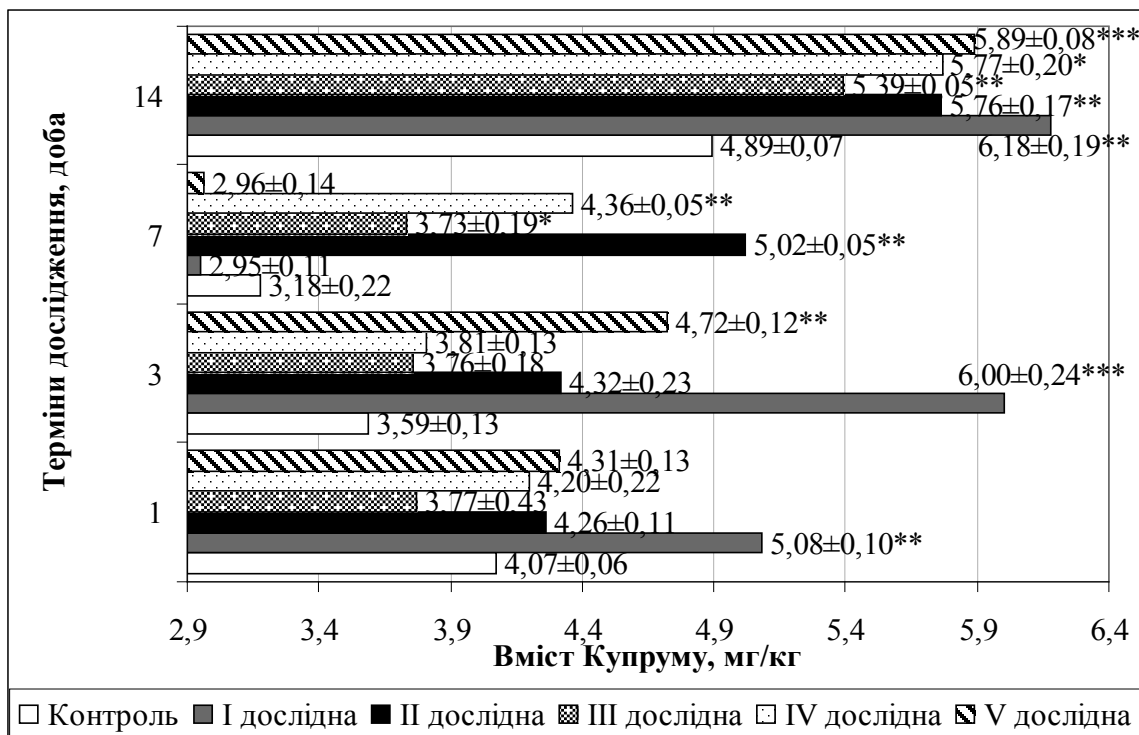


Рис. 2. Вміст Купруму в нирках щурів протягом дослідження (M±m, n=3; * – P < 0,05; ** – P < 0,01; *** – P < 0,001 – відносно контролю).

На 3-тю добу досліджень тенденцію до підвищення вмісту Купруму в нирках спостерігали в щурів II, III та IV дослідних груп, а у щурів I та V дослідних груп вміст Купруму на даному терміні досліджень вірогідно перевищував контроль на 98 % та 31 % відповідно.

На 7-му добу дослідження навпаки у нирках щурів I та V дослідних груп спостерігали тенденцію до зниження вмісту Купруму, тоді як у нирках щурів II, III та IV груп встановлено вірогідне підвищення вмісту металу на 58 %, 17 % та 37 % відповідно.

На 14-ту добу дослідження вірогідне підвищення вмісту Купруму відмічали в нирках щурів усіх дослідних груп, зокрема, в I дослідній групі щурів (НкМе 0,3 мг/кг маси тіла) – на 26 %, II дослідній групі (суміш солей металів 0,3 мг/кг маси тіла) – на 18 %, III (НкМе 1,0 мг/кг маси тіла) – на 10 %, IV (НкМе 2,0 мг/кг маси тіла) – на 18 % і в щурів V дослідної групи (НкМе 4,0 мг/кг маси тіла) – на 20 %.

Вміст Купруму в головному мозку щурів, які отримували різні дози НкМе, на 1-шу добу після введення препаратів вірогідно перевищував контроль на 182 %, 103 %, 247 % та 226 % відповідно в I, III, IV та V дослідних групах, тоді як у щурів II дослідної групи (суміш солей металів) не встановлено відхилень від контролю.

На 3-тю добу дослідження Купрум у головному мозку виявляли лише у контрольній та III дослідній групах, причому у щурів III групи даний показник був вірогідно нижчим за контроль на 73 %.

На 7-му добу дослідження вміст Купруму виявлено лише в головному мозку щурів IV дослідної групи.

На останньому терміні дослідження вміст Купруму в головному мозку щурів I та IV дослідних груп вірогідно перевищував контроль на 254 % та 341 %, тоді як у щурів II дослідної групи даний показник був нижчим за контроль на 68 %, а в тварин III і V груп наявність Купруму встановити не вдалося.

Досить неоднозначні результати отримані щодо розподілу Купруму в м'язах щурів (вмісту металу не було виявлено на 3-тю та 14 доби експерименту).

Розподіл Купруму в м'язах щурів на першу добу досліджу у щурів I та II дослідних груп вірогідних відхилень від контрольного показника не встановлено, тоді як у III, IV та V дослідних групах вміст Купруму вірогідно перевищував контроль на 250 %, 264 % та 79 % відповідно.

На 7-му добу досліджу вміст Купруму в м'язах щурів II дослідної групи мав тенденцію до зниження, а в дослідних групах щурів, що одноразово отримували НкМе у різних дозах, був вірогідно нижче за контроль на 70 %, 46 %, 57 % та 30 % у I, III, IV та V групах відповідно.

Низький, але стабільний вміст Купруму відмічали в репродуктивних органах (сім'яниках) щурів контрольної групи протягом всього досліджу. На 1-шу добу експерименту вміст Купруму в сім'яниках щурів вірогідно перевищував контроль у всіх дослідних групах, яким одноразово вводили НкМе в дозовому діапазоні, на 440 %, 600 %, 550 % та 1550 % у I, III, IV та V відповідно, тоді як у щурів II дослідної групи, яким вводили суміш солей металів, відмічено лише тенденцію до підвищення.

На 3-тю добу досліджу вміст Купруму в сім'яниках щурів IV дослідної групи не відрізнявся від контролю, тоді як вірогідне підвищення вмісту металу реєстрували у тварин I, II, III та V груп на 144 %, 225 %, 119 % та 256 % відповідно.

На 7-му добу експерименту не відрізнявся від контролю вміст Купруму в сім'яниках щурів I дослідної групи, тоді як вірогідне підвищення вмісту металу реєстрували у тварин II, III, IV та V груп на 83 %, 92 %, 417 % та 242 % відповідно.

Майже аналогічну картину спостерігали і на 14-добу досліджу відмінним було лише те, що вміст Купруму в сім'яниках щурів III дослідної групи не відрізнявся від контролю, а вірогідне підвищення вмісту металу фіксували у тварин I, II, IV та V груп на 164 %, 214 %, 71 % та 486 % відповідно.

Також дослідження вмісту металу проводили в шкірі з шерстю. На 1-шу добу досліджу в шкірі з шерстю щурів I дослідної групи відмічали вірогідне підвищення вмісту Купруму на 100 %, тоді як показники вмісту металу в інших групах не відрізнялися від контролю.

На 3-тю добу досліджу вміст Купруму в шкірі з шерстю щурів усіх дослідних груп вірогідно перевищував контроль: у I групі на 131 %, у II – на 173 %, у III – на 147 %, у IV – на 227 % і в V – на 222 %.

На 7-му ж добу досліджу навпаки: вміст Купруму в шкірі з шерстю щурів усіх дослідних груп був вірогідно нижчим за контроль: у I групі на 22 %, у II – на 80 %, у III – на 28 %, у IV – на 13 % і в V – на 45 %.

І на 14-ту добу досліджу залишався нижчим за контроль вміст Купруму в шкірі з шерстю щурів усіх дослідних груп, яким ввели НкМе: у I групі на 27 %, у III – на 30 %, у IV – на 43 % і в V – на 38 %, а у щурів II дослідної групи змін даного показника відносно контролю не встановлено.

Висновки. 1. Ступінь всмоктування Купруму з НкМе зворотно пропорційно залежить від величини введеної дози, про що свідчить динаміка вмісту Cu в ШКТ щурів, які отримували НкМе у дозі 4,0 мг/кг маси тіла, а саме: у шлунку – 1,89 мг/кг, тонкому та товстому відділах кишечника – 1,05 і 3,73 мг/кг.

2. Основними «органами-концентраторами» Cu є нирки (4,50 мг/кг) і печінка (2,75 мг/кг).

3. При порівнянні біотичних доз НкМе і суміші солей металів встановлено, що Купрум у іонній формі всмоктується швидше і в більшій мірі, але вже на 3-тю добу його вміст у більшості органів знижувався, тоді як Cu в нанорозмірній формі діє пролонговано: на 14-ту добу досліджу його вміст у більшості органів і тканин перевищував контрольний.

Перспективи подальших досліджень. Проведення гострого експерименту на моделі лабораторних тварин (білих щурів) виявилось недостатнім для встановлення токсичної дії дослідного зразка НкМе на макроорганізм, тому отримані результати є передумовою для вивчення тривалого (хронічного) надходження вивчених наночастинок металів.

Список літератури

1. Структура, свойства и токсичность наночастиц оксидов серебра и меди [Текст] / И.Н. Андрусишина [и др.] // Биотехнология. – 2011. – Т.4, № 6. – С. 51–58.
2. Горобец, А.И. Использование меди в кормлении птицы [Текст] / А.И. Горобец // Птахівництво : міжвід. темат. наук. зб. / ІП УААН. – Х., 2005. – Вип. 57. – С. 162–174.
3. Mineral tolerance of animals [Text] / Committee on Minerals and Toxic Substances, Board on Agriculture and Natural Resources, Division on Earth and Life Studies. – Second Revised Ed., 2005. – 500 p.
4. Вплив наночастинок металів на резистентність курчат-бройлерів [Текст] / В.Б. Борисевич [та ін.] // Сучасне птахівництво. – 2009. – № 1 (74). – С. 4–5.
5. Визначення неорганічних елементів у біологічних субстратах методом рентген-флуоресцентного аналізу [Текст] : метод. вказівки, затв. Держ. ком. вет. медицини України 23-24.12.2009 р., протокол № 1 / О.О. Малинін [та ін.].

TOXICOKINETICS OF COPPER IN RATS AFTER INTRAGASTRIC ADMINISTRATION OF METAL NANOCOMPOSITE (AG, CU, FE, MN DIOXIDE) IN THE CONDITIONS OF ACUTE EXPERIMENT

Orobchenko O.L.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

By the result of the study of copper toxicokinetics in rats after intragastric administration of nanocomposite of metals (Ag, Cu, Fe, Mn dioxide) (NcMe) in acute experiments, there has been determined that the extent of absorption of copper from NcMe is pivoting proportional to the magnitude of the dose, as evidenced by dynamic of Cu content in the gastrointestinal tract of rats that received NcMe in a dose of 4.0 mg/kg of body weight, as follows: in the stomach – 1.89 mg/kg, the small and large intestine - 1.05 and 3.73 mg/kg. The main "organs-concentrators" of copper are the kidneys (4.50 mg/kg) and liver (2.75 mg/kg). When comparing biotic doses of NcMe doses and mixtures of metal salts, copper in the nanoscale form was more bioavailable, as evidenced by its high content in most organs and tissues on the 14th day of the experience.