

УДК 616.831:577.112.6]-092.9-099:547.42

Ю.К. Резуненко

ВПЛИВ ПОЛІОЛІВ НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРОЛУ НА СТАН СТРЕС-ЛІМІТУЮЧИХ СИСТЕМ ОРГАНІЗМУ ЩУРІВ

Харківський національний медичний університет
кафедра біологічної хімії
(зав. – д.мед.н., проф. В.І. Жуков)

Ключові слова: поліолі, щури, гама-аміномасляна кислота, триптофан, серотонін, простагландини

Key words: polyols, rats, gamma-aminobutyric acid, tryptophan, serotonin, prostaglandins

Резюме. В работе изучено состояние серотонин- и ГАМК-ергической стресс-лимитирующих систем головного мозга и простагландиновой системы сыворотки крови крыс в условиях длительного воздействия промышленных химических загрязнителей окружающей среды – полиолов, что является необходимым для раскрытия механизмов их биологического действия. Полиолы на основе глицерола (П-1103К, П-3003) в дозах 1/10 и 1/100 LD₅₀ на 30-е сутки перорального воздействия повышают содержание серотонина, его предшественника триптофана на фоне снижения ГАМК в головном мозге, а также повышают в сыворотке крови концентрацию простагландинов E₁ и E₂. Выявленные нарушения необходимо учитывать при составлении прогноза неблагоприятного влияния полиолов на здоровье населения.

Summary. The present work investigated state of serotonin- and GABA-ergic stress-limiting systems of brain and prostaglandin system of rat blood plasma in conditions of prolonged action of industrial chemical pollutants-polyols which is necessary for establishing their biological action. Polyols structurally based on glycerol (P-1103K, P-3003) in 1/10 and 1/100 LD₅₀ on the 30th day of peroral action increase the content of serotonin, its precursor-tryptophan on the background GABA decrease in brain. Polyols also increase concentration of prostaglandins E₁ and E₂ in the blood plasma. The revealed impairments must be considered when elaborating the prognosis of unfavorable influence of the substances on health population.

Сучасний рівень матеріального виробництва характеризується інтенсивним зростанням хімічної промисловості. На широкому використанні її продукції базується прогрес багатьох галузей народного господарства. Разом з тим, хімізація супроводжується потраплянням до навколишнього середовища шкідливих промислових хімічних сполук, що пов'язано з небезпекою безпосереднього та віддаленого впливу на здоров'я населення [2, 3, 7]. До числа промислових хімічних забруднювачів доквілля, зокрема водних екосистем, належать поліолі на основі гліцеролу, які характеризуються великим об'ємом синтезу, широким використанням у різних галузях народного господарства та побуті як основи промислового випуску пластмас, пінопластів, епоксидних смол, лаків, миючих засобів, емульгаторів тощо [9]. У зв'язку з цим актуальним є проведення глибоких і всебічних досліджень з метою розробки медичних заходів у системі «навколишнє середовище – здоров'я населення». Крім того, для цих речовин відсутня комплексна токсиколого-гігієнічна характеристика, не визначений прогноз біологічної активності та віддалених наслідків впливу на організм.

Вплив багатьох факторів довкілля, зокрема хімічної природи, на організм людини та тварин призводить до зміни відносної сталості внутрішнього середовища, дестабілізації біохімічних і фізіологічних процесів. У відповідь на це формується гомеостатична реакція організму, в основі якої лежить активація й мобілізація функціональних систем, специфічно відповідальних за адаптацію [1, 5]. Попередніми дослідженнями виявлено зсув оксидантно-антиоксидантної рівноваги в напрямку активації процесу перекисного окислення ліпідів і білків у біологічних мембранах та рідинах організму експериментальних тварин за умов тривалого перорального надходження поліолів. Це, у свою чергу, можна розглядати як вагомий сигнал для запуску стрес-реакції. Відомо, що активація ПОЛ є загальною метаболічною ланкою реакції напруги, тобто окислювального стресу, та ініціюючою причиною мобілізації відповідних реакцій організму [1]. Крім того, у розвитку адаптації організму експериментальних тварин до дії поліолів спостерігалася активація стрес-реалізуючих систем – симпато-адреналової та гіпоталамо-гіпофізарно-кортикоадреналової, що підтверджувалося збільшенням вмісту кортикотропіну, кортизолу,

адреналіну, норадреналіну та дофаміну в сироватці крові, головному мозку та печінці. З функціонуванням стрес-реалізуючих систем організму поєднано функціонування стрес-лімітуючих систем, яке спрямовано на забезпечення обмеження стрес-реакції.

Метою цього дослідження було вивчення тривало впливу поліолів на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003-2-60) у дозах 1/10 і 1/100 LD₅₀ на стан простагландинової, серотонін- і ГАМК-ергічної стрес-лімітуючих систем сироватки крові та головного мозку щурів.

Робота виконана у межах науково-дослідної роботи Харківського національного медичного університету «Вивчення механізмів біологічної дії простих поліолів у зв'язку з проблемою охорони навколишнього середовища» (номер держреєстрації 0110U001812).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: поліоксипропілентриол – П-1103К і поліоксиетиленоксипропілентриол – П-3003-2-60. Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 200-220г. Проведення процедур з експериментальними тваринами здійснено згідно з вимогами Державного комітету з етики. Тварини утримувалися у стаціонарних умовах віварію за постійної температури та природного освітлення [8]. Їх піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 30 днів у дозах 1/10 і 1/100 LD₅₀, що відповідно становило для П-1103К – 0,12 і 0,012 г/кг, П-3003-2-60 – 0,32 і 0,032 г/кг маси. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми води. Дослідження вмісту показників активності стрес-лімітуючих систем – серотоніну, триптофану, γ -аміномасляної кислоти (ГАМК), простагландинів - здійснювали через 30 днів після початку експерименту. У кожній групі було по 10 тварин. Забій тварин проводили шляхом декапітації, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Вміст серотоніну, триптофану в гомогенатах головного мозку щурів визначали за методом Endo, Ogura [11]. Після декапітації у тварин швидко препарували головний мозок, тканину зважували, подрібнювали й розтирали у 0,4 н HClO₄ у співвідношенні 1:10, потім центрифугували протягом 5 хв. при 3000 об/хв при температурі 0°C. Надосадову рідину переносили у пробірки і доводили до pH 5-6 за допомогою 2н КОН на холоді. Удруге центрифугували протягом 5 хв. при 3000 об/хв і температурі 0°C. Розділення амінів проводили на колонці з карбоксиметилцелюлозою (КМЦ) типу CM-52 фірми Whatman Biochemical (Англія). КМЦ-колонку (0,6x10 см) врівноважували 0,01 М фосфатним

буфером (pH 6,2) та наносили нейтралізований тканинний екстракт кількістю 1-4 мл. Елюцію триптофану проводили при кімнатній температурі 15 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH 6,2), елюцію серотоніну - 15 мл 0,03 М фосфатного буфера (pH 6,2). Спектрофлюориметричне визначення здійснювали на спектрофлюориметрі MPF-4A фірми «Хітачі» (Японія). Довжина хвилі збудження для триптофану 290 нм, довжина хвилі люмінесценції – 345 нм, для серотоніну – 303 нм і 330 нм відповідно. Вміст ГАМК визначали методом рідинної хроматографії на автоматичному аналізаторі типу ААА-339 (Чехія). Для проведення калібрувальних тестів, а також кількісної оцінки хроматограм використовували промислові стандартні розчини амінокислот виробництва фірми „Lachema”, що поставляються в наборі реактивів до автоматичного аналізатора амінокислот. Вміст ГАМК визначали після її виділення хроматографічним методом на колонках з катіонообмінною смолою Dowex 50Wx4, 200-400 mesh [10]. Визначення вмісту простагландинів у сироватці крові щурів проводили з використанням методу конкурентного твердофазного радіоімунного аналізу з використанням лічильника гама-імпульсів «Бета-2» за допомогою наборів реактивів фірми «Advanced Magnetirs inc» (США). Методичні деталі проведення радіоконкурентного аналізу описані у протоколах фірми-виробника для радіоімунного комплекту. Математичну обробку результатів вимірювань проводили за допомогою калібрувальних кривих. Статистичний аналіз цифрового матеріалу здійснювали за допомогою комп'ютерного пакета для обробки й аналізу статистичної інформації Statistica 6.0 [4]. Для перевірки гіпотез щодо рівності генеральних середніх двох незалежних, непов'язаних вибірок використовували t-критерій Стьюдента з попередньою перевіркою нормальності розподілу варіант. Визначали середнє арифметичне варіаційного ряду (M) та його середню помилку (m). Відмінності між двома вибірками вважали достовірними, якщо імовірність випадкової різниці не перевищувала 0,05 (p<0,05).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

До числа центральних стрес-лімітуючих систем належить серотонін- та ГАМК-ергічна. Під впливом поліолів у головному мозку щурів, порівняно з контролем, спостерігалось на 30-ту добу дії 1/100 LD₅₀ збільшення вмісту серотоніну на 93% і 41% та його попередника триптофану – на 46% і 50% відповідно для 1103-К і 3003-2-60. Доза 1/10 LD₅₀ чинила менш виразний вплив на рівень серотоніну, його збільшення становило лише 38% і 20% на фоні незмінного вмісту триптофану (табл. 1).

Вплив поліолів на вміст серотоніну, триптофану та ГАМК у головному мозку щурів (30-а доба, $M \pm m$, $n=10$)

Поліол	Доза, LD ₅₀	Серотонін, нмоль/г тканини	Триптофан, нмоль/г тканини	ГАМК, мкмоль/г тканини
1103-К	1/10	17,5±1,22*	33,8±2,52	1,12±0,08*
	1/100	24,5±1,46*	45,3±3,84*	1,45±0,10*
3003-2-60	1/10	15,2±1,08*	29,7±2,22	1,13±0,09*
	1/100	17,9±1,38*	46,6±3,73*	1,38±0,12*
Контроль		12,7±1,14	31,1±2,52	2,32±0,13

Примітка: * - $p < 0,05$ відносно контролю

Спостережуване збільшення концентрації серотоніну може виступати фактором деякого обмеження збудження адренергічних центрів і, тим самим, лімітування стрес-реакції. З іншого боку, отримані зміни щодо вмісту попередника й представника індоламінів можна пояснити збільшенням проникності гематоенцефалічного бар'єра нейронів для триптофану й стимуляції синтезу серотоніну в головному мозку тварин, яким вводили поліоли.

Отримані результати свідчили про достовірне зниження вмісту ГАМК на 30-ту добу дії 1/10 і 1/100 LD₅₀, яке відповідно становило в середньому 52% і 40% порівняно з контролем (табл. 1). ГАМК-ергічна система є основною гальмівною системою головного мозку, яка відіграє провідну роль в обмеженні пошкоджуючої дії процесів перезбудження за умов несприятливих впливів. ГАМК виконує дві основні функції у нервовій тканині: з одного боку, є основним медіатором гальмування, а з іншого – проміжним субстратом ГАМК-шунта, що бере участь у компенсації метаболічних розладів у головному мозку. Зниження концентрації ГАМК чітко вказує, перш за все, на неефективність захисних механізмів гальмування при підгострому впливі поліолів.

При стрес-реакції будь-якого походження, як правило, активуються й периферійні стрес-лімітуючі системи, до яких відносять антиокси-

дантну та нітрооксидергічну, а також систему простагландинів. Захисна дія простагландинів, особливо групи E, при стресорних впливах визначається трьома основними властивостями: здатністю пригнічувати викид катехоламінів з симпатичних нервових закінчень, чинити вазодилататорну та пряму цитопротективну дію [6]. У нашому випадку поява підвищеної кількості активних форм кисню за умов тривалого впливу поліолів є суттєвим сигналом для активації фосфоліпаз, насамперед фосфоліпази A₂. Цей фермент каталізує вивільнення арахідонату з фосфоліпідів. Цикло- та ліпооксигенази здійснюють ферментативне перекисне окислення арахідонової кислоти через проміжні продукти радикальної природи з утворенням важливих внутрішньоклітинних регуляторів, зокрема простагландинів.

На 30-ту добу вплив поліолів 1103-К і 3003-2-60 супроводжувався достовірним збільшенням у сироватці крові вмісту ПГЕ₁ і ПГЕ₂, порівняно з контрольною групою тварин. Для дози 1/10 LD₅₀ у випадку ПГЕ₁ це в середньому становило 42%, а для ПГЕ₂ – 23%. Для дози 1/100 LD₅₀ відповідно 92% і 58%. Концентрація ПГФ_{2α} за умов впливу 1/100 LD₅₀ практично не змінювалася, а 1/10 LD₅₀ дещо достовірно знижувалася в середньому на 38%, порівняно з контролем (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив поліолів на вміст простагландинів у сироватці крові щурів (30-а доба, pg/ml , $M \pm m$, $n=10$)

Поліол	Доза, LD ₅₀	ПГЕ ₁	ПГЕ ₂	ПГФ _{2α}
1103-К	1/10	2534±168*	4956±327*	3,28±0,44*
	1/100	3243±179*	6572±430*	4,65±0,59
3003-2-60	1/10	2776±152*	4878±269*	3,44±0,53*
	1/100	3945±188*	6058±342*	4,95±0,67
Контроль		1878±122	4012±274	5,42±0,31

Примітка: * - $p < 0,05$ відносно контролю

ВИСНОВКИ

1. У розвитку адаптації організму щурів до дії поліолів спостерігається неоднозначне реагування стрес-лімітуючих систем - активація серотонінергічної, простагландинової на фоні зменшення активності ГАМК-ергічної. Це підтверджується збільшенням вмісту серотоніну, триптофану та зменшенням ГАМК у головному мозку, підвищенням концентрації простагландинів E1 і E2 в сироватці крові.

2. Дози поліолів 1/10 і 1/100 LD50 виявляють односпрямований вплив на вміст серотоніну, триптофану та простагландинів. За умов дії 1/100 LD50 збільшення вмісту цих показників є більш виразним, ніж у випадку 1/10 LD50, що пояснюється формуванням стану організму, направленою на збереження стабільних параметрів

гомеостазу. Вплив поліолів у дозі 1/10 LD50 супроводжується виникненням напруженого адаптивного стану з початковими ознаками виснаження захисно-компенсаторних механізмів.

3. Практично однаковий рівень зниження вмісту ГАМК за умов тривалої дії поліолів, як у дозі 1/10 LD50, так й 1/100 LD50, свідчить про неефективність захисних механізмів гальмування в організмі експериментальних тварин.

4. Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується провести комплекс досліджень, спрямованих на всебічне обґрунтування механізмів біологічної дії поліолів з метою визначення їх потенційної небезпеки та нормування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В.А. Барабой // Успехи соврем. биологии. – 1991. – Т. 111, № 6. – С. 923-931.
2. Белицкий Г.А. Химический канцерогенез / Г.А. Белицкий // Проблемы клинич. медицины. – 2006. – № 1 (5). – С. 10-15.
3. Белозерова С.М. Особенности формирования заболеваемости в условиях индустриального труда и новых технологий / С.М. Белозерова // Медицина труда и пром. экология. - 2011. - № 3. - С. 13-19.
4. Боровиков В.А. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере / В.А. Боровиков. – СПб.: Питер, 2003. – 688 с.
5. Григорян Р.Д. Самоорганизация гомеостаза и адаптации / Григорян Р.Д. – К.: Академперіодика, 2004. – 501 с.
6. Кухарь В.П. Химия биорегуляторных процессов / В.П. Кухарь, А.И. Луйко. – К.: Наукова думка, 1991. – 367 с.
7. Малышева А.Г. Неучтенная опасность воздействия химических веществ на здоровье человека / А.Г. Малышева // Гигиена и санитария. - 2003. - № 6. - С. 34-36.
8. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко [та ін.]. – К.: Авіценна, 2002. – 156 с.
9. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / Л.Д. Попова, О.В. Зайцева, Р.И. Кратенко [и др.]; под ред. В.И. Жукова. – Х.: Торнадо, 2000. – 438 с.
10. Carmona F. Purification of GABA on small columns of DOWEX 50W, combination with a method for separation of biogenic amines / F. Carmona, C. Gomes, G. Trolin // Acta Pharmacol. Toxicol. – 1980. – Vol. 46. – P. 235-240.
11. Endo J. Separation of biogenic amines in rat brain on a phosphorylated cellulose column / J. Endo, J. Ogura // Eur. J. Pharmacol. – 1973. – N 21. – P. 293-298.

