

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені О.О.Богомольця

ЯНЦЬКА Леся Василівна

УДК 577.352:616.831:615.9:547.133:615.356:577.164.15:612.084

**ВИВЧЕННЯ БІОХІМІЧНИХ МЕХАНІЗМІВ ПОШКОДЖЕННЯ
МЕМБРАННИХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗКУ
В УМОВАХ ІНТОКСИКАЦІЇ
ХЛОРАЛКАНАМИ ТА КОРЕКЦІЇ НІКОТИНАМІДОМ**

14.01.32 - медична біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 2005

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вивчення механізмів негативного впливу високотоксичних ксенобіотиків на організм людини та вищих тварин, що має місце в умовах хімічного забруднення довкілля, лишається однією з центральних проблем медичної біохімії.

Особливо небезпечними для організму людини є біоцидні ксенобіотики з класу хлоровуглеводнів, зокрема хлоралкани, які використовуються в промисловому виробництві, побутовій хімії, є продуктами урбанізації навколишнього середовища (Ю.І.Губський, В.Б.Долго-Сабуров, В.В.Храпак, 1993; И.М.Трахтенберг, 2000, 2004; М.Г.Проданчук, 2001, 2004). За даними провідних вітчизняних та зарубіжних токсикологів, отруєння хлоралканами посідають друге - третє місце в структурі гострих інтоксикацій населення різними ксенобіотиками, а серед хлоралканів провідне місце (близько 90% всіх випадків гострих отруєнь) займають 1,2-дихлоретан та тетрахлорметан (М.Г.Кокаровцева, 1982; Е.А.Лужников, 1999 т.і.).

Зазначені сполуки є цитотоксичними отрутами, що спричиняють важкі ураження субклітинних структур життєво важливих органів: печінки, міокарду, головного мозку, нирок тощо, призводячи до важких некрозо-дистрофічних уражень цих органів (Е.А.Лужников, Л.Г.Костомарова, 1989; D.G.Barceloux, 1992). Як доведено сучасними дослідженнями, в основі молекулярних механізмів ушкодження тваринних клітин хлоралканами лежать їх мембранотоксичні ефекти з первинними змінами фізико-хімічних властивостей ліпідного матриксу біомембран та ураження генетичного апарату, що найбільш детально вивчені в клітинах печінки на прикладі тетрахлорметану (Ю.І.Губський та співавт., 1995 – 2001).

В останні роки особливу увагу фахівців привертає вивчення біохімічної токсикології 1,2-дихлоретану - ксенобіотика, що є широко розповсюдженим органічним розчинником, який використовується у промисловості як попередник в багатьох синтетичних процесах, сільському господарстві та побуті. Подібно до інших хлоралканів, 1,2-дихлоретан, як і тетрахлорметан, надходячи в організм теплокровних тварин, спричиняє важкі ушкодження мембранних структур, виявляючи до того ж виражену нейротоксичну дію з розвитком токсичної енцефалопатії. Враховуючи також наявність у хлоралканів значного наркотичного ефекту, застосування цих сполук, разом з іншими органічними розчинниками, має в наш час важливе медико-соціальне значення в практиці токсикології.

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Національному медичному університеті імені О.О.Богомольця Міністерства охорони здоров'я України

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор, член-кореспондент АМН України, **ГУБСЬКИЙ Юрій Іванович**, Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, завідувач кафедри біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор **Виноградова Руфіна Петрівна**, Інститут біохімії імені О.В.Палладіна НАН України, провідний науковий співробітник

доктор медичних наук, професор **Кульчицький Олег Костянтинович**, Інститут геронтології АМН України, завідувач лабораторії регуляції метаболізму

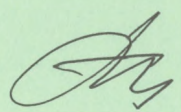
Провідна установа: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я.Горбачевського

Захист відбудеться „ ” вересня 2005 р. о 13 год. 30 хв. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.003.07 Національного медичного університету імені О.О.Богомольця (03057, Київ, пр.Перемоги, 34, фізико-хімічний корпус НМУ)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного медичного університету імені О.О.Богомольця (03057, Київ, вул. Зоологічна, 1)

Автореферат розісланий „ 15 ” серпня 2005 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради кандидат біологічних наук



О.І.Толстих

Разом з тим, незважаючи на високу небезпечність ураження центральної нервової системи 1,2-дихлоретаном та тетрахлорметаном, біохімічні механізми нейротоксичних ефектів цих хлоралканів, зокрема пошкодження мембранних структур нейронів, лишаються недостатньо з'ясованими, у зв'язку з чим специфічна антидотна терапія відсутня, а засоби фармакологічної корекції токсичного ураження хлоралканами клітин головного мозку є малоефективними, що і обґрунтовує актуальність дисертаційного дослідження.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було вивчення змін у функціонуванні ферментних систем синапсом та мітохондрій, стану пероксидного окислення біомолекул та ультраструктури клітин головного мозку білих щурів за умов гострої інтоксикації 1,2-дихлоретаном і тетрахлорметаном. Враховуючи нейротропні та антиоксидантні властивості нікотинаміду, доцільно було вивчити можливості його застосування для корекції ушкодження мембранних структур при токсичному ураженні головного мозку хлоралканами.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі задачі:

1. Дослідити мембранотоксичну дію 1,2-дихлоретану та тетрахлорметану на мембранні структури головного мозку щурів, а саме, оцінити в умовах гострої інтоксикації хлоралканами:
 - показники транспорту серотоніну в синапсосомах;
 - активність синапсомальної Na^+ , K^+ -АТРази;
 - активність сукцинатдегідрогенази мітохондрій;
 - реакції пероксидного окислення ліпідів та білків і активність антиоксидантної системи головного мозку та еритроцитів;
 - склад насичених та ненасичених жирних кислот в тканині головного мозку.
2. Проаналізувати та дослідити ультраструктуру клітинних елементів головного мозку за умов гострої інтоксикації 1,2-дихлоретаном та тетрахлорметаном.
3. З'ясувати можливість фармакологічної корекції нікотинамідом біохімічних та ультраструктурних змін в головному мозку щурів, отруєних хлоралканами.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті проведених досліджень вперше експериментально встановлено, що гостре отруєння щурів 1,2-дихлоретаном та тетрахлорметаном призводить до активації вільнорадикальних процесів, які зумовлюють порушення структурно-функціонального стану синапсом головного мозку та еритроцитів щурів.

Виявлено, що за умов інтоксикації хлоралканами відбуваються зміни ферментних та транспортних систем мембранних структур головного мозку тварин. Показано, що інтоксикація хлоралканами призводить до змін жирнокислотного складу ліпідів і окиснювальної модифікації білків в тканинах головного мозку, еритроцитах та плазмі крові. Наслідком таких змін є порушення процесів антиоксидантного захисту, що, у свою чергу призводить до морфологічних змін, які підтверджені електронно-мікроскопічними дослідженнями тканин головного мозку.

Введення нікотинаміду зменшує токсичну дію 1,2-дихлоретану та тетрахлорметану відносно синапсом головного мозку щурів, сприяє нормалізації мембранозв'язаних ферментних систем і реалтейку серотоніну в нервових закінченнях та біохімічних реакцій антиоксидантного захисту в тканині головного мозку та еритроцитах.

Практичне значення одержаних результатів. Робота відноситься до фундаментальних досліджень. Результати дисертаційної роботи мають практичне значення для медичної біохімії, фармакології та токсикології. Отримані експериментальні дані розширюють та поглиблюють існуючі уявлення про біохімічні механізми порушення мембранних структур головного мозку, які лежать в основі гострих токсичних уражень 1,2-дихлоретаном та тетрахлорметаном, дають змогу запропонувати викорис-тання нікотинаміду з метою корекції гострої інтоксикації хлоралканами.

Результати експериментальних досліджень впроваджені у навчальному процесі та науковій роботі кафедри біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії Національного медичного університету імені О.О.Богомольця.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто проведено патентно-інформаційний пошук, визначена мета, задачі дослідження, відпрацьовані моделі та виконана експериментальна частина роботи, а також статистична обробка отриманих результатів, оформлення їх у вигляді таблиць та діаграм, сформовані основні положення та висновки, опубліковані основні результати досліджень.

Дослідження по вивченню транспорту $[2-^{14}\text{C}]$ - серотоніну фракцією нервових закінчень головного мозку виконано спільно з д.б.н. Т.М.Кучмеровською (Інститут біохімії імені О.В.Палладіна НАН України), газохромотографічне дослідження жирних кислот та електронномікроскопічні дослідження – на базі НДЛЦ НМУ за допомогою с.н.с. Т.С.Брюзгіної, проф. Л.О.Стеченко та к.б.н. Т.П.Куфтеревої, за що автор висловлює їм слова щирої подяки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом наукових досліджень Національного медичного університету імені О.О.Богомольця, є фрагментом наукової теми кафедри біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії НМУ „Вивчення молекулярних механізмів пошкодження субклітинних структур печінки та головного мозку в умовах інтоксикації 1,2-дихлоретаном та тетрахлорметаном та їх експериментальної корекції” (№ державної реєстрації 0101U000887).

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були оприлюднені на VIII Українському біохімічному з'їзді (м. Чернівці – 2002); Установчому з'їзді Українського товариства клітинної біології (Львів – 2004); Міжнародній науково-практичній конференції „Сучасний стан і проблеми експериментальної та клінічної медицини” (Тернопіль – 2004); IX Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль – 2004); Науково-практичній конференції з міжнародною участю „Сучасні проблеми медичної та клінічної біохімії” (Чернівці – 2005).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковані в 14 наукових роботах (5 статей у фахових наукових журналах, затверджених ВАК України; 9 робіт в матеріалах і тезах конференцій, симпозиумів та виступах на наукових конференціях).

Структура та обсяг роботи. Дисертація викладена на 137 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження та їх обговорення, висновків, а також списку використаних джерел - 217 найменувань. Робота ілюстрована 13 рисунками і 11 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Моделювання гострої інтоксикації хлоралканами проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 180-200 г. 1,2-Дихлоретан (1,2-ДХЕ) та тетрахлорметан (ТХМ) вводили одноразово внутрішньошлунково у вигляді 25% -их розчинів на рослинній олії в дозах: 1,2-ДХЕ - 3,0 мл/кг, ТХМ – 2,0 мл/кг. Застосовані дози хлоралканів склали близько $\frac{1}{2}$ ЛД₅₀ для відповідних сполук.

Дослідження проводили через 24 та 48 год після введення токсикантів. В кожній з двох серій експериментів (отруєння 1,2-ДХЕ та отруєння ТХМ) щурів поділяли на 4 групи: 1-а - контрольна (тварини, що отримували розчинник); 2-а – тварини, отруєні 1,2-ДХЕ - дослідження через 24 год; 3-тя – тварини,

отруєні 1,2-ДХЕ (або ТХМ) - дослідження через 48 год; 4-та – тварини, яким вводили нікотинамід в дозі 200 мг/кг внутрішньоочеревинно через 1, 24 та 36 год після отруєння хлоралканами.

Декапітацію тварин проводили натщесерце, з використанням поверхневого ефірного наркозу.

Синаптосоми отримували за J.P.Abita et al. (1977) з внесенням 1 мМ PMSF до всіх буферів, які використовувались в роботі.

Мітохондрії головного мозку виділяли за N.Brustovetsky, J.M.Dubinsky (2000).

Визначення активності Na⁺, K⁺-АТФази синапсом головного мозку проводили спектрофотометрично за кінцевим продуктом АТФази реакції – неорганічним фосфатом (W.B.Rathbun, M.W.Betlach 1969).

Активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) визначали спектрофотометрично за відновленням акцептора електронів 2,6-дихлорфеноліндофенолу (E.Rossi, B.Norling, 1970).

Поглинання та вивільнення серотоніну проводили за V.C.Gandhi, D.I.Jones (1990) з використанням [2-¹⁴C]-серотоніну; радіоактивність вимірювали на висушених фільтрах у ЖС-101 рідинно-сцинтиляційним спектрометром "Intertechnique".

Жирнокислотний склад ліпідів головного мозку вивчали методом газової хроматографії на хроматографі „Цвет” в ізотермічному режимі з полум'яноіонізаційним детектором (С.Г. Гичка та співав., 1998)

Вміст дієнових кон'югатів визначали за ступенем поглинання спряжених подвійних зв'язків ненасичених жирних кислот в гептановому екстракті тканинних ліпідів при $\lambda_{\text{max}}=233$ нм (В.Б.Гаврилов, М.И.Мишкорудная, 1983.).

Вміст ТБК-позитивних продуктів визначали за М.А.Тимурбулатовим (1981).

Ступінь окиснювальної модифікації білків досліджували за А.І.Арчаковим та І.М.Міхосєєвим (1998) шляхом визначення 2,4-динітрофенілгідразонів, що утворюються при взаємодії альдегідо- та кетопохідних бічних аліфатичних радикалів амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразинном. Альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру реєстрували при 370 нм, основного- при 430 нм.

Активність супероксиддисмугази (СОД) визначали за С.Чеварі (1991) шляхом визначення супероксидних аніон-радикалів, що утворюються в результаті аеробної взаємодії NADH з феназинметасульфатом.

Активність каталази визначали за М.А.Королюком (1988) на підставі вивчення здатності H_2O_2 утворювати з солями молібдату пероксидний забарвлений комплекс.

Активність глутатіонпероксидази визначали за В.І.Моїним (1986) на основі вимірювання швидкості окиснення глутатіону в присутності гідропероксиду третинного бутану.

Одержання та аналіз еритроцитів проводили за Н.А.Сизовим (1980). Фракціонування еритроцитів проводили у градієнті щільності сахарози за Н.О.Сибірною (1997). Кислотну резистентність еритроцитів оцінювали за І.Б.Заводник (1997), визначення проникності еритроцитарної мембрани – за Л.С.Фірою (2003).

Визначення активностей аланінамінотрансферази (АлТ) та аспартат-амінотрансферази (АсТ) в сироватці крові визначали загальноприйнятими біохімічними методами (В.Г. Колб, В.С.Камышников, 1982).

Вміст білка визначали за методом О.Н. Lowry т.і. (1951).

Електронномікроскопічні дослідження ультраструктури головного мозку проводили за допомогою електронного мікроскопа ЭМВ-100 АК.

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики із застосуванням стандартного пакету прикладних програм на ЕОМ.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ФЕРМЕНТИ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ІНТОКСИКАЦІЇ ХЛОРАЛКАНАМИ ТА ДІЇ НІКОТИНАМІДУ

Токсичне ураження мембранних структур, зокрема плазматичних мембран та мітохондрій внутрішніх органів при інтоксикації багатьма біоцидними ксенобіотиками, в тому числі хлоралканами, призводить до вираженої гіперферментемії за рахунок вивільнення індикаторних ферментів внутрішньоклітинних органел, зокрема цитозолу та мітохондрій (Ю.І.Губський, 1989). Відповідно до цього, проведені нами дослідження виявили значне збільшення активностей аланін- та аспартат-амінотрансфераз в сироватці крові щурів через 48 год після отруєння як 1,2-ДХЕ, так і ТХМ, що свідчило про вихід цих ферментних білків з субклітинних органел внаслідок їх хімічного ушкодження.

В умовах гострого отруєння щурів 1,2-ДХЕ відбувається збільшення в сироватці крові активності АлТ на 157 та АсТ на 55% порівняно з контролем; за отруєння ТХМ також спостерігається збільшення активності сироваткових

амінотрансфераз АлТ та АсТ на 207 та 61%, відповідно, що свідчить про пошкодження мембранних структур паренхіматозних органів, в першу чергу печінки, серця, нирок та головного мозку. Коефіцієнт де Рітиса (відношення АсТ/АлТ), який в нормі складає 1,33, за умов отруєння 1,2-ДХЕ та ТХМ суттєво знижувався, складаючи 0,72 та 0,77, відповідно, що свідчило про глибоку патологію мембран субклітинних органел.

Враховуючи біологічну активність нікотинаміду, як сполуки, що, крім суто коферментних та антиоксидантних властивостей приймає участь в процесах АДР-рибозилування, є важливим внутрішньоклітинним регулятором багатьох метаболічних процесів в нервовій тканині (Г.В.Донченко т.і., 1995; Т.М.Кучмеровська т.і., 1999; 2000) становило інтерес вивчити вплив нікотинаміду на біохімічні процеси, порушені при інтоксикації хлоралканами.

Було встановлено позитивний ефект нікотинаміду в застосованій фармакологічній дозі на активність амінотрансфераз в сироватці крові отруєних щурів. Активність досліджуваних ферментів були нижчими порівняно з групами тварин, що не одержували нікотинамід: при інтоксикації 1,2-ДХЕ - АлТ та АсТ на 55 і 28%; при інтоксикації ТХМ - АлТ та АсТ на 57 і 31%, відповідно. Коефіцієнт де Рітиса суттєво нормалізувався, наближаючись до рівня контрольних тварин, що також свідчить про зменшення загальнотоксичної дії хлоралканів.

ФЕРМЕНТНІ ТА ТРАНСПОРТНІ СИСТЕМИ МЕМБРАННИХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЗА ІНТОКСИКАЦІЇ ХЛОРАЛКАНАМИ

Хлоралкани 1,2-ДХЕ та ТХМ належать до нейротропних отрут, що спричиняють синдром токсичної енцефалопатії з глибокими порушеннями функцій центральної нервової системи тварин. Разом з тим, біохімічні механізми нейротоксичної дії цих сполук, обмін нейротрансмітерів в синаптичних структурах головного мозку, зокрема стан серотонінергічної медіаторної системи, залишаються майже не вивченими.

Відомо, що одним з механізмів, який забезпечує вилучення нейромедіатору із синаптичної щілини та регуляцію його концентрації, є високо-афінне енергозалежне зворотне поглинання нейромедіатору пресинаптичними нервовими закінченнями. Проведені нами дослідження виявили значні порушення транспорту серотоніну в синапсоматозах головного мозку при гострому отруєнні хлоралканами, що стосуються як процесу його активного поглинання, так і пасивного вивільнення (табл.І.).

Так, поглинання $[2-^{14}\text{C}]$ -серотоніну синапсосомами головного мозку щурів зменшувалось за отруєння ДХЕ – на 45% та ТХМ – на 13% порівняно з контролем, відповідно, при цьому більш виразно за дії ДХЕ. Разом з тим пасивне вивільнення нейромедіатора суттєво порушувалось саме при інтоксикації ТХМ, зростаючи на 70% від контролю.

Враховуючи наявність у нікотинаміді виражених нейротропних властивостей, що пов'язані з його регуляторною участю у реаптейку та вивільненнім нейромедіаторів, зокрема серотоніну, та наявністю в синаптичних везикулах та синапсосомах NAD-модуляторної системи, виникло припущення про можливість направлено впливу нікотинаміді на процеси транспорту серотоніну в синапсосомах головного мозку за дії нейротоксичних хлоралканів. Введення нікотинаміді призводило до певної корекції енергозалежного поглинання $[2-^{14}\text{C}]$ -серотоніну нервовими закінченнями головного мозку на тлі отруєння як 1,2-ДХЕ, так і ТХМ (табл.1). Нікотинамід спричиняв також і деяку нормалізацію аномально підвищеного за інтоксикації ТХМ пасивного виходу серотоніну із синапсосом – зменшення на 20% порівняно з величиною у тварин, які не одержували нікотинамід, це свідчить про певне відновлення структурної цілості синапсосомальних мембран.

Таблиця 1

Транспорт серотоніну в синапсосомах головного мозку щурів за гострої інтоксикації 1,2-дихлоретаном, тетрахлорметаном (48 год) та введення нікотинаміді (НАм)
($M \pm m$; $n=6-9$)

Група тварин	Показники транспорту ^{14}C -серотоніна, $\text{імп} \cdot 10^3 (0,5 \text{ мг білка за } 1 \text{ хв})^{-1}$	
	поглинання	вивільнення
Контроль	$76\,226 \pm 47$	$1\,504 \pm 93$
1,2-ДХЕ	$52\,463 \pm 72^*$	$1\,711 \pm 71$
1,2-ДХЕ + НАм	$58\,024 \pm 52^{**}$	$1\,667 \pm 129$
Контроль	$12\,696 \pm 69$	$1\,560 \pm 46$
ТХМ	$11\,027 \pm 63^*$	$2\,660 \pm 77^*$
ТХМ + НАм	$12\,288 \pm 91^{**}$	$2\,120 \pm 123^{**}$

Примітка: * - зміни достовірні, порівняно з контролем ($p < 0,05$);

** - зміни достовірні, порівняно із значеннями у тварин, що не отримували НАм ($p < 0,05$)

Важливу роль у механізмах поглинання та вивільнення медіаторів в терміналях нейронів відіграє транспортна Na^+, K^+ -АТФаза, що виконує функції Na^+, K^+ -наосу і забезпечує створення трансмембранного потенціалу нервових закінчень. Оскільки активність Na^+, K^+ -АТФази, як інтегрального ферменту мембранних структур, залежить від стану фосфоліпідного матриксу біомембран, що порушується за дії ксенобіотиків хлорорганічного походження, становило інтерес дослідження активності Na^+, K^+ -АТФази синапсосомальних мембран в умовах гострого отруєння хлоралканами.

Активність Na^+, K^+ -АТФази синапсосом головного мозку щурів через дві доби після інтоксикації 1,2-ДХЕ та ТХМ знижувалась порівняно з контролем на 25 та 38% відповідно (рис.1), що є свідченням пошкодження мембран нервових закінчень. Оскільки зниження активності Na^+, K^+ -АТФази є одним з пускових механізмів для підвищення рівня надходження іонів Ca^{2+} всередину терміналей при їх збудженні, можливо саме цей процес активується за отруєння хлоралканами, спричиняючи глибокі порушення в біохімічній та структурній організації нейронів.

Виявлена також коригуюча дія нікотинаміді стосовно активності Na^+, K^+ -АТФази синапсосом головного мозку тварин, отруєних хлоралканами. Активність ферменту в групах тварин, що отримували нікотинамід, була вища у порівнянні з відповідною активністю у отруєних тварин, яким не вводили протекторний препарат, на 24% при отруєнні 1,2-ДХЕ та на 30% при отруєнні ТХМ (рис. 1).

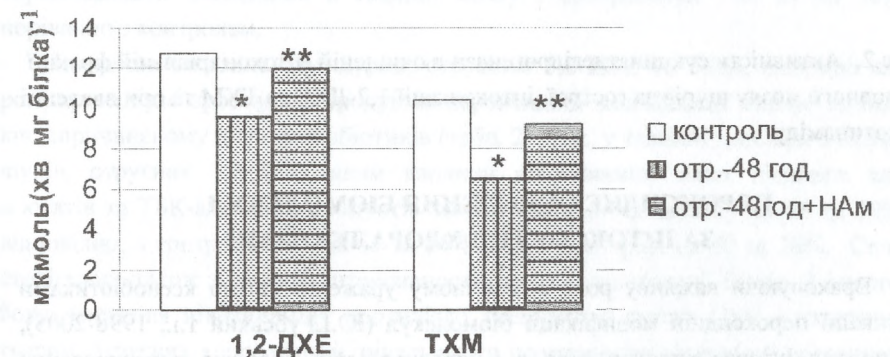


Рис. 1. Активність Na^+, K^+ -АТФази синапсосом головного мозку щурів за гострої інтоксикації 1,2-ДХЕ, ТХМ та введення нікотинаміді

Як свідчать літературні дані (С.Н.Голиков, И.В.Саноцкий, Л.А.Тиунов, 1986; И.И.Ивков, А.Б.Капитанов, 1986), отруєння хлоралканами призводить до суттєвого зменшення активності ферментів електронного ланцюгу в мітохондріях печінки та міокарду, разом з тим ферментні системи мітохондрій головного мозку за дії 1,2-ДХЕ та ТХМ раніше не досліджувались, що і стало за мету наступної серії експериментів.

Виявлено значне зниження активності СДГ порівняно з контролем в очищеній мітохондріальній фракції головного мозку отруєних тварин: зменшення на 14 % при дії 1,2-ДХЕ та на 13% при дії ТХМ (рис.2). При введенні нікотинаміду активність СДГ в мітохондріях головного мозку шурів, отруєних хлоралканами, була дещо вища, ніж в групах тварин, що не отримували коферментний препарат.

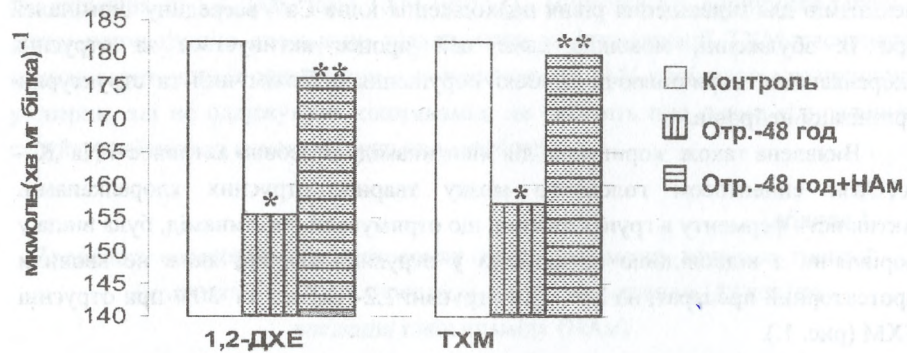


Рис.2. Активність сукцинатдегідрогенази в очищеній мітохондріальній фракції головного мозку шурів за гострої інтоксикації 1,2-ДХЕ та ТХМ та при введенні нікотинаміду

ПЕРОКСИДНЕ ОКИСЛЕННЯ БІОМОЛЕКУЛ ЗА ІНТОКСИКАЦІЇ ХЛОРАЛКАНАМИ

Враховуючи важливу роль в хімічному ураженні клітин ксенобіотиками активації пероксидної модифікації біомолекул (Ю.І.Губський т.і., 1998-2005), становило інтерес вивчити стан вільнорадикальних процесів переокислення ліпідів та білків за умов гострого отруєння 1,2-ДХЕ та ТХМ.

За умов токсичного ураження відбувається істотне зростання в тканині головного мозку вмісту продуктів пероксидної модифікації як ліпідів (дієнові кон'югати, ТБК-активні продукти), так і білків (табл.2). Значне збільшення

вмісту продуктів ліпопереокиснення та окиснювальної модифікації білків (ОМБ) спостерігалось також в еритроцитах і плазмі крові отруєних шурів. Зокрема, при інтоксикації 1,2-ДХЕ вміст дієнових кон'югатів зростає в тканині мозку в 3,2, в еритроцитах в 4,9 та в плазмі крові в 2,2 рази. Збільшення вмісту ТБК-позитивних сполук складало 85% в тканині мозку, 245% в еритроцитах і 86% в плазмі крові. Подібна направленість змін спостерігалась і щодо продуктів ліпопереокиснення в тканинах шурів, отруєних ТХМ: вміст дієнових кон'югатів зростає в тканині мозку в 3,7, в еритроцитах в 4,4; в 2 та 3,8 рази, відповідно; збільшувався і вміст кінцевих продуктів ліпопероксидації – ТБК-позитивних сполук.

За умов гострої інтоксикації як 1,2-ДХЕ, так і ТХМ (табл. 2) відбувалось також збільшення активності процесів ОМБ. Так, при дії 1,2-ДХЕ збільшення вмісту нейтральних та основних 2,4-динітрофенілгідрозонів, що відображують утворення карбонільних груп в поліпептидних молекулах, спостерігалось як в тканині мозку (на 42% та 50%), так і в еритроцитах (на 101% та 80%) та в плазмі крові (на 41% та 38%).

Відомо, що метаболіти 1,2-ДХЕ та ТХМ у другій фазі детоксикації вступають в реакцію кон'югації з глутатионом, що може бути однією з причин швидкого виснаження запасів та зниження концентрації останнього в тканинах отруєних тварин (М.Г.Кокаровцева, 1982; М.Я.Головенко, 2004).

Так, при отруєнні 1,2-ДХЕ зниження вмісту G-SH, порівняно з контролем, становило в тканині мозку та еритроцитах 36 та 61%, відповідно. У шурів, отруєних ТХМ, відбувались зміни тканинного вмісту G-SH такої ж спрямованості: зменшення в тканині мозку і еритроцитах на 29 та 56% порівняно з контролем.

Введення нікотинаміду шурам, отруєним 1,2-ДХЕ та ТХМ, значною мірою протидіяло зростанню продуктів пероксидної модифікації ліпідів та білків, спричиненому дією ксенобіотиків (табл. 2). Так, у тканині головного мозку шурів, отруєних 1,2-ДХЕ, яким вводили нікотинамід, вміст дієнових кон'югатів та ТБК-активних продуктів зменшувався в середньому на 58 та 39% відповідно, в еритроцитах - на 63 та 54 % і в плазмі крові на 50 та 38%. Спостерігалось також зниження інтенсивності окисної модифікації білків. З іншого боку, введення нікотинаміду протидіяло зменшенню вмісту GSH в тканинах тварин, отруєних хлоралканом, рівень якого перевищував відповідні показники в головному мозку та еритроцитах шурів, що не отримували коферментний попередник, на 51 та 63 %.

Таблиця 2

Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків за отруєння 1,2-дихлоретаном, тетрахлоретаном та введення нікотинамідом ($M \pm m$; $n=6-8$)

Досліджувані тварини	Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка	ТБК-позитивні продукти, нмоль/мг білка	HS-глутатіон, нмоль/мг білка	2,4-динітрофенілгідрозони	
				Нейтральні, мкмоль/мг білка	Основні, мкмоль/мг білка
Отруєння 1,2-ДХЕ					
Контроль	4,97 ± 0,39	7,31 ± 0,51	5,24 ± 0,42	0,38 ± 0,02	0,57 ± 0,04
Отруєння 1,2-ДХЕ	15,91 ± 0,95*	13,52 ± 0,67*	3,36 ± 0,20*	0,54 ± 0,04*	0,86 ± 0,07*
Отруєння 1,2-ДХЕ+ Nam	6,75 ± 0,60**	8,24 ± 0,57**	5,10 ± 0,41**	0,44 ± 0,03	0,63 ± 0,04**
Отруєння ТХМ					
Контроль	4,97 ± 0,39	7,31 ± 0,51	5,24 ± 0,42	0,38 ± 0,02	0,57 ± 0,04
Отруєння ТХМ	18,32 ± 1,12*	14,67 ± 0,71*	3,77 ± 0,19*	0,65 ± 0,05*	0,94 ± 0,07*
Отруєння ТХМ+ Nam	7,56 ± 0,44**	9,40 ± 0,65**	5,83 ± 0,37**	0,47 ± 0,03	0,50 ± 0,04**

Примітка* – зміни достовірні, порівняно з контролем ($p < 0,05$);

** – зміни достовірні, порівняно з групою тварин, яким вводили ДХЕ та ТХМ ($p < 0,05$)

Введення нікотинамідом щурам, отруєним ТХМ, також значною мірою протидіяло змінам у вмісті продуктів пероксидної модифікації ліпідів та білків, спричиненим дією ксенобіотика (табл. 2). Так, в тканині головного мозку і еритроцитах отруєних тварин зменшувався вміст дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів та 2,4-динітрофенілгідрозонів.

Активність протікання процесів пероксидної модифікації біомолекул в нормі та при дії ксенобіотиків, значною мірою залежить від активності ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ). Проведені дослідження показали значне зниження активності ферментів АОЗ в тканині головного мозку щурів, що були отруєні як 1,2-ДХЕ, так і ТХМ. Зокрема, при гострій інтоксикації 1,2-ДХЕ та ТХМ активність СОД зменшувалася на 59 та 42%, активність ГПО – на 31 та 53%, активність каталази – на 57 та 50%, відповідно.

Введення експериментальним тваринам нікотинамідом суттєво нормалізувало активності ферментів АОЗ за умов гострого отруєння 1,2-ДХЕ та ТХМ, які достовірно не відрізнялися від контрольних значень.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про суттєву активацію процесів вільнорадикального пероксидного окиснення в тканині головного мозку та еритроцитах за умов гострої інтоксикації щурів нейротоксичними ксенобіотиками 1,2-ДХЕ та ТХМ, що можна розглядати як ключовий патобіохімічний механізм біоцидної дії цих хлоралканів. Спричинена дією хлоралканів або продуктами їх гомолітичної біотрансформації пероксидна модифікація мембранних ліпідів супроводжувалась суттєвими змінами жирнокислотного складу фосфоліпідів головного мозку.

Встановлено, що за отруєння 1,2-ДХЕ та ТХМ відбуваються суттєві зрушення у співвідношеннях окремих жирних кислот в тканині головного мозку, зокрема зниження на 57% та 34% вмісту стеаринової кислоти ($C_{18:0}$) та збільшення вмісту мінорної міристинової кислоти ($C_{14:0}$) - на 93% та 20%, відповідно. Поряд з цим, спостерігається зниження вмісту окремих ненасичених жирних кислот - олеїнової ($C_{18:1}$) та лінолевої ($C_{18:2}$) та значне зростання (на 64 та 81%) відносного вмісту поліненасиченої арахідонової кислоти ($C_{20:4}$). Введення нікотинамідом практично нормалізувало жирнокислотний склад ліпідів головного мозку щурів, отруєних хлоралканами. Зокрема, вміст насичених стеаринової та міристинової жирних кислот наближався до контрольних значень, суттєво нормалізувався також вміст ненасичених жирних кислот.

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА ІНТОКСИКАЦІЇ 1,2-ДИХЛОРЕТАНОМ ТА ТЕТРАХЛОРЕТАНОМ

Електронномікроскопічне дослідження кори головного мозку щурів в умовах гострої інтоксикації 1,2-ДХЕ та ТХМ виявило виразні ультраструктурні зміни, що спостерігались в усіх клітинних компонентах кори та свідчили про розвиток явищ глибокої гістотоксичної гіпоксії тканини.

Зокрема, в мітохондріях нейронів отруєних тварин відмічались деструктивно змінені кристи та ділянки лізису матриксу, які досить часто досягали

великих розмірів. Дегенеративно змінені мітохондрії виявлялися також в аксоплазмі нейронів. Число синаптичних контактів зменшувалось, а пресинаптичні терміналі змінювалися за "світлим" типом, тобто відбувався набряк останніх та зникнення синаптичних пухирців. Зміни мієлінових волокон стосувалися, головним чином, їх конфігурації та нашарування мієліну. Спостерігались також явища пошкодження компартментів зернистої ендоплазматичної сітки та підвищення, у порівнянні з клітинами контрольних тварин, кількості вторинних лізосом, які вміщували ліпідні гранули. Ознаки гіпоксії мозку демонстрували і кровonosні мікросудини, просвіти яких були заповнені електроннощільним вмістом та форменими елементами крові, тобто спостерігалися явища сладж-феномену.

Введення нікотинаміду за умов отруєння 1,2-ДХЕ та ТХМ запобігало розвитку патологічних зрушень в структурних компонентах кори головного мозку, зокрема проявам гіпоксичних та деструктивно-дистрофічних змін в нейронах та нейрогліальних елементах. Таким чином, електронномікроскопічні дослідження підтверджують біохімічні дані про те, що застосування нікотинаміду, як корегуючого засобу, при пошкодженні головного мозку 1,2-ДХЕ та ТХМ призводить до часткового відновлення ультраструктури нейронів кори та процесів синаптичної передачі.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено біохімічні механізми пошкодження головного мозку щурів за умов експериментального моделювання хімічного ураження клітин хлоралканами: 1,2-дихлоретаном і тетрахлорметаном та корекції виявлених метаболічних порушень нікотинамідом.

1. Гостре одноразове отруєння щурів 1,2-дихлоретаном і тетрахлорметаном в дозах $\frac{1}{2}$ ЛД₅₀ призводило через 48 год до глибоких порушень транспорту серотоніну, ферментних та іонтранспортних процесів мембранних структур головного мозку.

2. В умовах гострого отруєння 1,2-дихлоретаном та тетрахлорметаном спостерігалось суттєве пригнічення активного поглинання $[2-^{14}\text{C}]$ – серотоніну (на 45 та 13%) та активація пасивного вивільнення нейромедіатора (на 13 та 70%) із синаптосомальних везикул головного мозку.

3. При гострій інтоксикації хлоралканами відбувалось значне зменшення активності Na^+ , K^+ -АТРази синаптосом головного мозку – на 25 та 38% за дії 1,2-дихлоретану та тетрахлорметану, відповідно. Порушення ферментної системи мембранного транспорту іонів в синаптосомах було більш вираженим при інтоксикації 1,2-дихлоретаном порівняно з тетрахлорметаном.

4. Введення хлоралканів призводило також до ушкодження мітохондрій головного мозку експериментальних тварин, що проявлялось зниженням активності сукцинатдегідрогенази в очищеній мітохондріальній фракції – на 14 та 13% в умовах отруєння 1,2-дихлоретаном та тетрахлорметаном, відповідно.

5. За умов гострої інтоксикації 1,2-дихлоретаном та тетрахлорметаном встановлено виражене зростання вмісту проміжних та кінцевих продуктів пероксидного окислення ліпідів та активності процесів окиснювальної модифікації білків в головному мозку, еритроцитах та плазмі крові, що супроводжувалось достовірним зниженням активності ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, каталази).

6. Ультраструктурні зміни в клітинах головного мозку щурів за умов інтоксикації хлоралканами характеризувались морфологічними проявами гістотоксичної гіпоксії нейронів та гліальних елементів, зокрема деструктивними явищами в синаптичних утвореннях та мітохондріях, порушенням мікроциркуляції в судинному руслі.

8. Введення щурам нікотинаміду в дозі 200 мг/кг суттєвою мірою сприяло нормалізації біохімічних та морфологічних зрушень, що розвивались за експериментальної інтоксикації 1,2-дихлоретаном та тетрахлорметаном. Корекція нікотинамідом призводила до зменшення пошкоджуючої дії хлор-

алканів щодо процесів поглинання та вивільнення серотоніну синапсом головного мозку, активності Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани синапсом та сукцинатдегідрогенази мітохондрій. За умов введення нікотинаміду спостерігались також менш виражені ультраструктурні зміни в тканині головного мозку щурів, отруєних хлоралканами.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Губський Ю.І., Яніцька Л.В., Великий М.М., Кучмеровська Т.М. Na^+ , K^+ -АТРаза активність та транспортування серотоніну у фракції синапсом головного мозку щурів за гострої інтоксикації 1,2-дихлоретаном та введення нікотинаміду // Український біохімічний журнал. - 2004. - Т.76, №3. - С.106-110.
2. Яніцька Л.В., Брюзгіна Т.С., Губський Ю. І. Жирнокислотний склад ліпідів головного мозку щурів при токсичному ураженні 1,2-дихлоретаном та введенні нікотинаміду // Современные проблемы токсикологии. - 2005. - №1. - С.19-22.
3. Яніцька Л.В., Губський Ю.І., Кучмеровська Т.М., Великий М.М. Вплив нікотинаміду на перебіг реакцій пероксидного окислення в головному мозку та еритроцитах щурів за токсичного ураження 1,2-дихлоретаном // Український біохімічний журнал. - 2004. - Т.76, №5. - С.98-102.
4. Губський Ю. І., Яніцька Л.В., Брюзгіна Т.С., Великий М.М., Кучмеровська Т.М. Пошкодження мембранних структур головного мозку щурів в умовах отруєння тетрахлоретаном та корекції нікотинамідом // Современные проблемы токсикологии. - 2005. - №2. - С.15-19.
5. Яніцька Л.В. Корекція нікотинамідом оксидативного стресу в тканинах щурів за токсичного ураження тетрахлорметаном // Буковинський медичний вісник. - 2005. - Т.9. - №2. - С.269-271.
6. Задоріна О.В., Парамонова Г.Ш., Великий О.М., Яніцька Л.В. Оксигеназні реакції в умовах ушкодження біомембран та дії антиоксидантів // Матеріали II національного з'їзду фармакологів України „Крок у майбутнє”. - Харків. - 2001. - С.91.
7. Губський Ю.І., Левицький Є.Л., Задоріна О.В., Яніцька Л.В. Механізми токсичної гибелі клітки в умовах острого отруєння тетрахлоретаном и 1,2-дихлоретаном // Матеріали науково-практичної конференції „Організація токсикологічної допомоги в Україні”. - Київ. - 2002. - С.86.

8. Губський Ю.І., Задоріна О.В., Яніцька Л.В., Прадій Т.П., Афанасенко О.В. Оксигеназні реакції за хімічного ураження і антиоксидантної недостатності // Матеріали VII Українського біохімічного з'їзду. - Чернівці. - 2002. - Т.74. - №4а. - С.133.
9. Губський Ю.І., Задоріна О.В., Осинська Л.Ф., Юрженко Н.М., Яніцька Л.В., Прадій Т.П. Процеси перекисного окислення ліпідів та окиснювальної модифікації білків в умовах хімічного ураження клітин // Матеріали VII з'їзду Всеукраїнського лікарського товариства. - Тернопіль. - 2003. - Т.5. - №1(63). - С.209.
10. Губський Ю.І., Яніцька Л.В., Кучмеровська Т.М., Великий М.М. Корекція нікотинамідом дисфункції клітин центральної нервової системи за дії 1,2-дихлоретану // Матеріали установчого з'їзду товариства клітинної біології. - Львів. - 2004. - С.224.
11. Губський Ю.І., Левицький Є.Л., Задоріна О.В., Яніцька Л.В., Кучмеровська Т.М. Молекулярні механізми токсичного ураження клітин печінки та головного мозку хлоралканами // Матеріали II з'їзду токсикологів України. - Київ. - 2004. - С.32.
12. Губський Ю.І., Задоріна О.В., Яніцька Л.В. Вільнорадикальні механізми токсичної загибелі клітин печінки та головного мозку // Медична хімія. - Тернопіль. - 2004. - Т.6. - №3. - С.157.
13. Яніцька Л.В., Губський Ю.І., Кучмеровська Т.М. Активність сукцинатдегідрогенази мозку щурів за короткої експозиції 1,2-дихлоретану: ефект нікотинаміду // - Тернопіль. - 2004. - Т.6. - №3. - С.170.
14. Губський Ю.І., Левицький Є.Л., Задоріна О.В., Яніцька Л.В., Афанасенко О.В. Біохімічні та молекулярно-біологічні механізми хімічної загибелі клітин за ураження високотоксичними ксенобіотиками // Буковинський медичний вісник. - 2005. - Т.9. - №2. - С.76-77.

АНОТАЦІЯ

Яніцька Л.В. Вивчення біохімічних механізмів пошкодження мембранних структур головного мозку в умовах інтоксикації хлор- алканами та корекції нікотинамідом. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.01.32 - медична біохімія. - Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, Київ, 2005.

Дисертація присвячена вивченню біохімічних механізмів пошкодження мембранних структур головного мозку за гострого отруєння 1,2-дихлоретаном

та тетрахлорметаном в дозах $\frac{1}{2}$ ЛД₅₀ та введення нікотинаміду в дозі 200 мг/кг через 1, 24 та 36 год після отруєння хлоралканами. Встановлено, що через 48 год після введення хлоралканів відбувається суттєве пригнічення поглинання [2-¹⁴C]-серотоніну разом з активацією його пасивного вивільнення із синаптосомальних везикул, зменшення активностей Na⁺, K⁺-АТРази синаптосом та сукцинатдегідрогенази мітохондрій головного мозку. Інтотоксикація хлоралканами призводила також до порушення процесів антиоксидантного захисту, змін жирнокислотного складу ліпідів та пероксидної модифікації ліпідів і білків, що супроводжувалося ультраструктурними порушеннями в клітинах головного мозку. Введення нікотинаміду зменшувало токсичну дію 1,2-дихлоретану та тетрахлорметану відносно синаптосом головного мозку шурів, сприяло нормалізації мембранозв'язаних ферментних систем і реаптейку серотоніну в нервових закінченнях та біохімічних реакцій антиоксидантного захисту.

Ключові слова: 1,2-дихлоретан, тетрахлорметан, хлоралкани, інтоксикація, головний мозок, синаптосоми, серотонін, пероксидне окислення, нікотинамід.

АННОТАЦИЯ

Яницкая Л.В. Изучение биохимических механизмов повреждения мембранных структур головного мозга в условиях интоксикации хлоралканами и коррекции никотинамидом. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.32 – медицинская биохимия. – Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, 2005.

Диссертация посвящена изучению биохимических механизмов повреждения мембранных структур головного мозга при остром отравлении 1,2-дихлоретаном и тетрахлорметаном в дозах $\frac{1}{2}$ ЛД₅₀ и введении никотинамида в дозе 200 мг/кг через 1, 24 и 36 час после отравления хлоралканами. Исследования проводились на белых крысах-самцах линии Вистар через 24 и 48 час после введения хлоралканов. Установлено, что через 48 час после введения токсикантов происходит значительное торможение активного поглощения [2-¹⁴C]-серотонина вместе с активацией его пасивного выхода из синаптосомальных везикул головного мозга. Одновременно отмечалось снижение активностей Na⁺, K⁺-АТРази синаптосом и сукцинатдегідрогеназы

митохондрий головного мозга. Интоксикация хлоралканами приводила также к изменениям жирнокислотного состава липидов, в частности сдвигам в соотношениях насыщенных (C_{18:0}, C_{14:0}) и ненасыщенных (C_{18:1}, C_{18:2}) кислот мембранных липидов. Активация реакций перекисления биомолекул в условиях острого отравления 1,2-дихлоретаном и тетрахлорметаном проявлялась снижением содержания в тканях исследованных животных глутатиона, уменьшением активностей ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, каталазы) и выраженным накоплением продуктов липопероксидации – ТБК-активных веществ и диеновых конъюгатов, а также окислительной модификацией белков головного мозга и эритроцитов. Биохимические проявления нейротоксического действия хлоралканов сопровождалось глубокими ультраструктурными изменениями в нейронах и глиальных клетках головного мозга экспериментальных животных, характерными для процесса гистотоксической гипоксии. Установлено, что введение животным, отравленным хлоралканами, никотинамида снижало токсическое действие 1,2-дихлоретана и тетрахлорметана относительно мембранных структур головного мозга и эритроцитов крыс, способствовало нормализации мембранозв'язаних ферментних систем и реаптейка серотонина в нервних окончаннях и активностей биохимических реакций антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: 1,2-дихлоретан, тетрахлорметан, хлоралканы, интоксикация, головной мозг, синаптосома, серотонин, пероксидное окисление, никотинамид.

SUMMARY

Yanitska L.V. The study of biochemical mechanisms of the rat brain membrane structures damage under the chloroalkanes intoxication and nicotinamide treatment. - Manuscript.

Dissertation for the scientific degree of a Candidate of Biological Sciences graduation in the speciality 14.01.32 – Medical Biochemistry. O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, 2005.

The dissertation deals with the study of biochemical mechanisms of the rat brain membranes structures injury under conditions of 1,2-dichloroethane and tetrachloromethane acute intoxication. The biochemical and morphological investigations were performed in 24 and 48 hours after toxins administration. It was shown that following 48 hours after intoxication both the brain synaptosomes vesicles

serotonin transport system, Na^+, K^+ -ATPase and mitochondrial succinate dehydrogenase activities were drastically altered. The monoamine transport system and membrane-bound enzyme activities alteration was accompanied by the significant shifts in brain lipids fatty acids composition and brain tissue and erythrocytes membranes lipids and proteins peroxidative modification. The treatment of rats with nicotinamide (200 mg/kg body weight) resulted in considerable normalization of rat brain biochemical and ultrastructural disturbances induced by chloroalkanes acute intoxication.

Key words: 1,2-dichloroethane, tetrachloromethane, chloroalkanes intoxication, rat brain, synaptosomes, lipoperoxidation, nicotinamide.

Підписано до друку 12.07.2005г. Формат 60x84 1/16.
Папір офсетний. Друк офсетний. Ум. др. арк. 1,17
Тираж 140 прим. Зам. № 0711-02.

Підприємство УВОІ "Допомога"
03056, м. Київ, пров. Політехнічний 6, корп. 5 (КШ)
Тел.: 241-71-46.