

УДК 577.156 + 612.015 + 576.311

В. С. Недзвецький

*Дніпропетровський національний університет***АНТИОКСИДАНТНА ДІЯ МЕЛАТОНІНУ
ПРИ ЗАХИСТІ ЦЕНТРАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ
ВІД ІНТОКСИКАЦІЇ ТОЛУЕНОМ**

Досліджено вплив толуену на вміст і склад поліпептидних фрагментів білка гліальних проміжних філаментів. Показано, що фармакологічні дози мелатоніну попереджають розвиток оксидативного стресу й астрогліозу в нервовій тканині.

Influence of toluene on the content and composition of polypeptide fragments of intermediate filaments' glial proteins was studied. Pharmacological doses of the melatonin prevent oxidative stress development and astrogliosis in the nervous system.

Вступ

Сучасні промислові розчинники – хімічні суміші, що здебільшого вміщують толуен як головний компонент [9]. Неправильне використання та хронічний вплив толуенвмісних розчинників спричиняє структурні та функціональні розлади у різних органах і тканинах. Респіраторне надходження навіть невеликої кількості таких розчинників – одна з основних причин розвитку енцефалопатії, що може викликати незворотні пошкодження мозку [7]. Хронічний вплив толуенвмісних розчинників індукує перманентні зміни у структурах мозку, що може бути причиною нейрональної дисфункції [19].

Досліджені гострий і хронічний вплив толуену на нейрони. Показано, що толуенова інгаляція викликає активацію астрогліальних клітин. Астроцити, як відомо, відіграють важливу роль у виживанні нейронів у центральній нервовій системі (ЦНС), регулюють іонний баланс нейронального оточення та залучаються до специфічних нейрональних функцій [17]. Гліальні клітини здійснюють ранню клітинну відповідь на різні за природою пошкодження ЦНС. Реактивний гліоз – поширена реакція астроцитів на нейрональне пошкодження внаслідок фізичного чи хімічного інсульту. Така реакція завжди супроводжується надмірною експресією ГФКБ – специфічного маркера астроцитів [10].

Нещодавно виявлена здатність толуенової інгаляції індукувати оксидативний стрес. У той же час, відсутні дані про потенціальну протективну дію природних антиоксидантів в умовах токсичного впливу органічних толуенвмісних розчинників. Мелатонін – гормон епіфізу, відомий як природний антиоксидант – може знижувати нейротоксичні ефекти оксидативного стресу [16].

Відсутні дані про потенціальну протективну дію мелатоніну в умовах токсичного впливу органічних толуенвмісних розчинників. Передбачається, що один із найважливіших протективних ефектів мелатоніну у ЦНС реалізується через його вплив на гліальні клітини [6]. Останні дослідження показали, що мелатонін має високий захисний ефект у нейронах і гліальних клітинах проти хімічного інсульту [3; 14].

У даній роботі досліджено вплив мелатоніну на розвиток оксидативного стресу та гліальну реактивність у ЦНС щурів при інгаляції толуенвмісного розчинника.

© В. С. Недзвецький, 2006

122

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на дорослих щурах лінії Вістар вагою 200 ± 20 г. Тварини випадковим чином були розділені на три групи, утримувалися в умовах постійної температури ($+24 \pm 2^\circ\text{C}$) та контрольованої довжини світлового дня (12 / 12 годин). Щури двох груп ($n = 15$) щодня протягом 60 хвилин утримувались у скляній камері з 3000 рМ випару розчинника, який містив 66 % толуену, 20 % ацетону, 10 % ізобутилацетату, 3 % бутилгліколю, 1 % ізобутанолу. Щури однієї із цих груп отримували інтраперитонеально щоденні ін'єкції розчину мелатоніну в дозі 10 мг/кг. Через 45 днів тварини експериментальних і контрольної груп були декапітовані. Із головного мозку на холоді відокремлювали тканини гіпокампа, мозочка та кори великих півкуль.

Фракції цитоскелетних білків отримували з тканини відповідних відділів мозку, як описано раніше [2]. Білки обох фракцій розділяли методом електрофорезу у градієнті поліакриламідного гелю (7–18 %) з 0,1 % додецилсульфатом натрію [12]. Визначення поліпептидного складу гліальних філаментів проводили за допомогою імуноблотингу з використанням поліклональної моноспецифічної антисироватки у розведенні 1 : 1500, як описано раніше [4]. Кількісний аналіз ГФКБ проводили за допомогою комп'ютерної обробки сканованих результатів імуноблотингу (LabWork 4.0). Рівень перекисного окислення ліпідів вимірювали з використанням тест-набору LPO-586 (Oxis, Int. Inc., USA). Вміст загального білка визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера [15].

Обробку отриманих даних проводили методами математичної статистики для малих вибірок [1]. Відносний вміст ГФКБ виражали у вигляді середньої величини та стандартної похибки середньої. Достовірну різницю між групами оцінювали із застосуванням *t*-критерію Стьюдента ($p < 0,05$) після перевірки гіпотез про нормальність розподілу та різницю між генеральними дисперсіями.

Результати та їх обговорення

У мозку групи щурів, які отримували інгаляцію розчинника з толуеном, рівень ТБК-реактивних продуктів значно вищий порівняно з контролем (рис. 1). Значних змін вмісту GSH у цій групі тварин не виявлено. В мозку тварин, які отримували курсові ін'єкції мелатоніну, рівень глутатіону відновленого був значно вищим порівняно з контрольною групою та групою тварин, які дихали випарами розчинника.

Значне підвищення вмісту ГФКБ виявлене в усіх досліджених відділах мозку при впливі толуену (рис. 2). Підвищення вмісту ГФКБ супроводжувалось не лише зростанням вмісту інтактного поліпептиду 49 кДа та появою фрагментів ГФКБ з меншою *Mr*. Рівень цих деградованих поліпептидів ГФКБ вищий у гіпокампі, ніж у мозочку та корі великих півкуль.

У мозку групи щурів, які отримували ін'єкції мелатоніну протягом 45 днів за умов інтоксикації толуеном, вміст ГФКБ значно нижчий порівняно з мозком інтоксикованих щурів. Найбільші відмінності виявлені у гіпокампі ($p < 0,001$). Достовірні, але не такі значні, відмінності виявлені також у корі ($p < 0,01$) та мозочку ($p < 0,05$).

Швидка реакція астроцитів – важлива частина клітинної відповіді ЦНС на різні за природою пошкодження. Ця відповідь характеризується надмірним рівнем експресії ГФКБ, проліферацією та диференціацією астроцитів.

Отримані результати показують, що інгаляція толуенвмісного розчинника сприяє підвищенню експресії ГФКБ і активації цитоскелетних перебудов. Надмірна експресія ГФКБ, яка відображає реактивний гліоз, була нещодавно показана в мозку щурів

після інгаляції випару органічних розчинників. У цій роботі визначений надмірний рівень вмісту ГФКБ, зокрема, у гіпокампі. Толуен-індукований реактивний гліоз, передбачається, може бути наслідком підвищення генерації РСК [10].

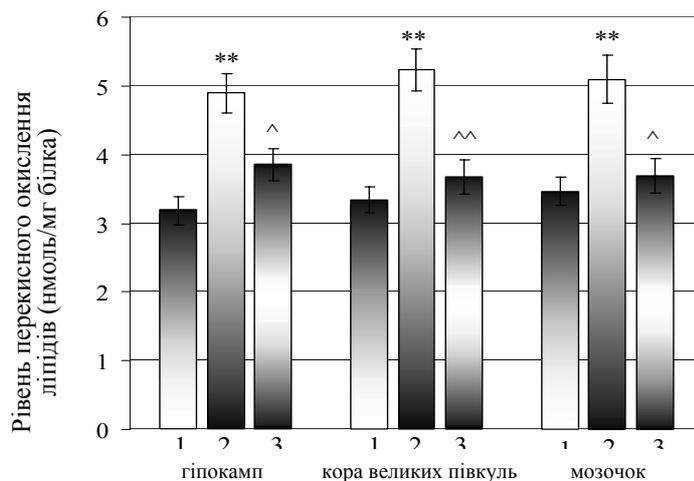


Рис. 1. Вміст ТБК-реактивних продуктів у мозку щурів контрольної (1), інтоксикованої толуеном (2) і групи щурів, які отримували ін'єкції мелатоніну за умов інтоксикації (3):

** – $p < 0,01$ – достовірність різниці відносно контрольної групи;

^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$ – відносно групи 2.

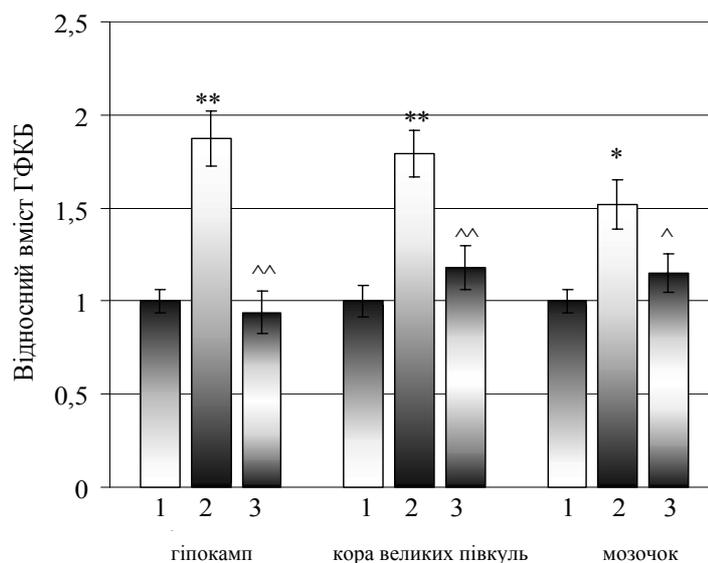


Рис. 2. Відносний вміст ГФКБ у мозку щурів контрольної (1), інтоксикованої толуеном (2) і групи щурів, які отримували ін'єкції мелатоніну за умов інтоксикації (3):

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – достовірність різниці відносно контрольної групи;

^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$ – відносно групи 2.

Результати свідчать про те, що курсові ін'єкції мелатоніну щурам, які отримували інгаляції толуенового розчинника, значно знижують рівень продуктів перекисного окислення ліпідів у всіх досліджених відділах мозку. У недавніх роботах показана здатність мелатоніну знижувати нейротоксичну дію різних чинників [16]. Біль-

шість авторів передбачають, що нейропротекторні ефекти мелатоніну можуть бути пов'язані з його властивістю поглинати надлишок вільних радикалів. Згідно з цими даними, толуен-індуковане зростання генерації вільних радикалів і розвиток реактивного гліюзу в нашому дослідженні свідчить на користь того, що саме вільні радикали викликають реактивну гліальну відповідь.

Введення антиоксидантів гальмує розвиток гліюзу через нейтралізацію вільних радикалів і зниження пошкодження біомембран шляхом пригнічення перекисного окислення ліпідів. Отримані результати вперше показали, що введення фармакологічних доз мелатоніну попереджає підвищення вмісту ГФКБ і кількості його деградованих продуктів, які викликаються інгаляцією толуен-вмісного розчинника.

Оскільки вільні радикали відіграють важливу роль у розвитку реактивного гліюзу, введення мелатоніну може попереджати гліоз двома головними шляхами: через пригнічення генерації вільних радикалів, активацію антиоксидантних ферментів і за рахунок безпосередньої нейтралізації.

У ЦНС глутатіон сконцентрований переважно в гліальних клітинах. Висока внутришньоклітинна концентрація GSH у них необхідна для захисту нейронів від нейротоксичних інсультів [17]. Результати даної роботи показують, що мелатонін підвищує загальний нейрональний рівень GSH. Попередні роботи демонструють також, що введення мелатоніну сприяє зростанню активності ферментів метаболізму GSH [13]. Нещодавно отримані дані свідчать про те, що мелатонін у нормальних умовах стимулює активність стримуючого ферменту, такого як γ -глутамілцистеїн синтази, продукції GSH [19]. Це підтверджує, що важлива частина протективної дії мелатоніну проти вільних радикалів може бути пов'язана із здатністю підтримувати рівень GSH і його рециклінг.

Астроцити грають життєво важливу роль у регуляції мікрооточення нейронів і взаємодії між нейронами та капілярами мозку. Гліальні клітини більш вразливі, ніж нейрони, до нейротоксичних інсультів і більш чутливі до нейропротекторних заходів. Отримані дані показують, що мелатонін може захищати нейрони від дії токсичних сполук, таких як толуен, через підвищення виживання гліальних клітин. Разом із корисним ефектом прямої дії антиоксидантної підтримки нейронів мелатонін може підсилювати нейропротекторну дію проти толуенової токсичності через сприяння виживанню гліальних клітин шляхом підвищення їх антиоксидантної спроможності.

Висновок

Фармакологічні дози мелатоніну проявляють нейропротекторний ефект на рівні молекулярних окисних ушкоджень і реактивної клітинної відповіді астроцитів, що сприяє виживанню клітин нервової тканини за умов токсичного впливу толуену.

Бібліографічні посилання

1. **Кокунин В. А.** Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. ж. – 1975. – Т. 47, № 6. – С. 776–790.
2. **Недзвецкий В. С.** Влияние мелатонина на познавательную способность и экспрессию молекулы адгезии нервных клеток NCAM при стрептозотоцин-индуцированном диабете / В. С. Недзвецкий, П. А. Неруш, С. В. Кириченко // *Neurophysiology / Нейрофизиология.* – 2003. – Т. 35, № 6. – С. 463–469.

3. **A novel role** for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex / G. Baydas, V. S. Nedzvetsky, P. A. Nerush et al. // *Neurosci Lett.* – 2002. – Vol. 326, N 2. – P. 109–112.
4. **Altered expression** of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus / G. Baydas, V. S. Nedzvetskii, P. A. Nerush et al. // *Life Sci.* – 2003. – Vol. 73. – P. 1907–1916.
5. **Altered glial acidic protein** content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin / G. Baydas, R. J. Reiter, V. S. Nedzvetskii et al. // *J. Pineal Res.* – 2002. – Vol. 33. – P. 1–6.
6. **Cuzzocrea S.** Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury / S. Cuzzocrea, R. J. Reiter // *Eur. J. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 426. – P. 1–10.
7. **Developmental neurotoxicity** of toluene: in vivo and in vitro effects on astroglial cells M. Burry, M. Guizzetti, J. Oberdoerster, L. G. Costa // *Dev. Neurosci.* – 2003. – Vol. 25, N 1. – P. 14–19.
8. **Effect of chronic inhalation** of toluene and dioxane on activity of free radical processes in rat ovaries and brain / S. O. Burmistrov, A. V. Arutyunyan, M. G. Stepanov et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 3, N 2. – P. 832–836.
9. **Effect of toluene inhalation** on astrocytes and neurotrophic factor in rat brain / T. Gotohda, I. Tokunaga, S. Kubo et al. // *Forensic Sci. Int.* – 2000. – Vol. 11, N 2. – P. 233–238.
10. **Free radical-mediated molecular damage.** Mechanisms for the protective actions of melatonin in central nervous system / R. J. Reiter, D. Acuna-Castroviejo, D. X. Tan, S. Burkhardt // *Ann. of the N.-Y. Acad. of Sci.* – 2001. – Vol. 939. – P. 200–215.
11. **Glutathione** is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons / S. P. Raps, J. C. Lai, L. Hertz, A. J. Cooper // *Brain Res.* – 1989. – Vol. 593, N 1. – P. 398–401.
12. **Laemmli O. H.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, N 1. – P. 243–246.
13. **Melatonin induces** gglutamylcysteine synthase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells / Y. Urata, S. Honma, S. Goto et al. // *Free Rad. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27, N 1. – P. 838–847.
14. **Melatonin protects** the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis / G. Baydas, R. J. Reiter, V. S. Nedzvetskii et al. // *Toxicol. Lett.* – 2003. – Vol. 137, N 3. – P. 169–174.
15. **Miller G. L.** Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol. 31, N 5. – P. 964–966.
16. **Reactive astrocytes:** cellular and molecular cues to biological function / J. L. Ridet, S. K. Malhotra, A. A. Privat, F. H. Gage // *Trends Neurosci.* – 1997. – Vol. 20, N 12. – P. 570–577.
17. **Safavi-Abbasi S.** Rapid morphological changes in astrocytes are accompanied by redistribution but not by quantitative changes of cytoskeletal proteins / S. Safavi-Abbasi, J. R. Wolff, M. Missler // *Glia.* – 2001. – Vol. 36, N 1. – P. 102–115.
18. **Vitamin E,** ascorbate, glutathione disulfide and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain / T. K. Makar, M. Nedergaard, A. Preuss et al. // *J. Neurochem.* – 1994. – Vol. 62, N 2. – P. 45–53.
19. **Yamaguchi H.** Toluene at environmentally relevant low levels disrupts differentiation of astrocyte precursor cells / H. Yamaguchi, Y. Kidachi, K. Ryoyama // *Arch. Environ. Health.* – 2002. – Vol. 57, N 3. – P. 232–238.

Надійшла до редколегії 15.01.06.