

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ЛУКОШКО Світлана Олександрівна

МЕМБРАНОТРОПНА АКТИВНІСТЬ ДИМЕТИЛЕТАНОЛАМІНУ

14.00.23 - гістологія, цитологія, ембріологія

03.00.04 - біохімія

А в т о р е ф е р а т

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата
біологічних наук

Київ - 1994

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00755899 (0)

AB 31.487

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в лабораторії мембранології НДІ фізіології
Київського університету імені Тараса Шевченка

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор

Рибальченко В.К.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, проф. В.І. Малюк

доктор біологічних наук, проф. М.П. Зурський

Провідна установа - *Дніпропетровська державна
медична академія*

Захист дисертації відбудеться 29 грудня 1994 року
о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д.01.01.13 при Київському Університеті імені Тараса Шевченка.
Адреса: 252017 Київ-17, вул.Володимірска, 64

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Київського
Університету ім.Тараса Шевченка.

Автореферат розісланий "28" ..X.. 1994 року.

Вчений секретар
спеціалізованої ради,

кандидат біологічних наук, доцент
ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Данилова О.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Хімічні речовини, як фактори зовнішнього середовища викликають зміни функціонального стану організму, що є наслідком адсорбції та зв'язування їх на плазматичній та інших клітинних мембранах. Однією з найбільш раних і універсальних ознак токсичного ефекту хімічних речовин є дестабілізація біомембран. Суттєвим виявом мембраноушкоджуючої дії хімічних речовин є збільшення проникності мембран разом з порушенням функціонування мембранозв'язаних рецепторів і ферментів [Покровский А.А., 1976], внаслідок чого порушується клітинний гомеостаз, що призводить до функціональних порушень на відповідних рівнях організації організму [Галактионов С., 1988; Меркурьева Р.В., 1986; Хухо Ф., 1990].

До таких біологічно активних сполук відноситься диметилетаноламін (ДМЕА), який широко використовується у виробництві пластмас, смол і т.п., у парфюмерії та медицині [Измеров Н.Ф., Саночкий И.В., 1977; Перегуд Е.А., 1978; Lambert P.A., 1978; Caraceni T.A., 1978; Finney T.V. et al., 1977]. Дані про його токсичність у вітчизняній та іноземній літературі вельми обмежені та відносяться до розробок початку 70-х років. Що ж стосується молекулярних механізмів дії аміноспирту на організм, цитолого-гістологічних і біохімічних наслідків такої дії, то такі дослідження проведені нами вперше.

Мета і основні завдання досліджень. Метою роботи є проведення комплексних досліджень на різних рівнях організації живого мембрани, клітини, органи і організм - для встановлення морфологічних, фізіолого-біохімічних та фізико-хімічних механізмів впливу ДМЕА при його інгаляційній дії на організм і контактній взаємодії з органами, тканинами і клітинами. Перед нами ставилися такі завдання:

1. Провести гістологічні дослідження органів і тканин при хронічній затравці ДМЕА та вивчити вплив аміноспирту на активність ферментів крові тварин.

2. Вивчити взаємодію аміноспирту з штучними мембранами різного ступеню організації з метою встановлення молекулярних механізмів процесу.

3. Дослідити активність мембранних ферментів та іонну про-

никність мембран під впливом різних концентрацій ДМЕА.

4. За біохімічними, гістологічними та токсикометричними критеріями, рефлекторними та резорбтивними ефектами обґрунтувати гранично допустимі максимальну разову та середньодобову концентрації аміноспирту в атмосферному повітрі населених місць.

Наукова новизна досліджень. Вперше встановлено, що диметилетаноламіну притаманні поверхнево-активні властивості, здатність утворювати мономолекулярні поверхневі структури на поверхні розподілу фаз і взаємодія з ліпідними моношарами, наслідком чого є зміна граничного потенціалу і двомірного тиску. ДМЕА взаємодіє також з бішаровими ліпідними мембранами, мембранами ацинарних і гладком'язових клітин, змінюючи і модифікуючи їх ферментативні, іон-транспортні і електричні властивості.

Мембранотропна дія ДМЕА полягає в модифікації ферментативних, іон-транспортних і електричних властивостей біологічних мембран, результатом чого є зворотні зміни морфологічних, біохімічних та фізико-хімічних властивостей клітин, тканин і органів та зворотні зміни в перетіканні фізіологічних процесів в організмі.

Практичне значення роботи. Встановлено гранично допустимі максимальну разова і середньодобова концентрації (ГДК_{м.р.}, ГДК_{с.д.}) ДМЕА в атмосферному повітрі населених місць, які складають 0,25 і 0,06 мг/м³. Встановлений клас (4-ий) хімічної небезпеки ДМЕА. Ці результати затверджені і впроваджені МОЗ СРСР як обов'язкові санітарно-гігієнічні нормативи для виробництв на території СНД.

Результати по вивченню мембранотропних властивостей ДМЕА на штучних та біологічних мембранах відкривають нові підходи до визначення впливу поверхнево-активних речовин на клітини, органи і організм і можуть знайти застосування як експрес-методи в експериментальній токсикології і медицині.

Апробація роботи і публікації. Матеріали дисертації доповідались і обговорювались на конференції "Медико-біологічні і гігієнічні аспекти охорони на підприємствах медичної промисловості" (Стара Купавна, 1991), конференції "Актуальні проблеми фізіології" (Київ, 1992), наукових конференціях і наукових семінарах лабораторії мембранології НДІ фізіології Київського університету імені Тараса Шевченка (Київ, 1989, 1990, 1993). За матеріалами дисертації опубліковано 7 наукових робіт.

Об'єм і структура дисертації. Робота виконувалась у відпо-

відності з планами науково-дослідних робіт Київського університету ім. Тараса Шевченка - тема N 472-86 "Вивчити біологічну інгаляційну дію диметилетаноламіну для розробки ГДК у атмосферному повітрі населених місць". Дисертація має ¹⁶⁹ сторінок машинописного тексту, ілюстрована 42 рисунками і 13 таблицями, включає вступ, огляд літератури, главу, присвячену матеріалам та методам досліджень, дві глави результатів експериментальних досліджень, обговорення, висновки, список цитованої літератури, що містить 220 бібліографічних найменувань.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженнях використовувалися тонкий кишечник безпорідних кролів одного віку та маси, taenia coli мурчаків, тканини печінки, легень, нирки, наднирників та мозку білих щурів, підшлункова залоза собаки. Досліди по хронічній затравці тварин проведені на білих безпорідних щурах.

Поверхневу активність аміноспирту досліджували на межі розподілу фаз "розчин електроліту-повітря" за методом Ленгм'юра, граничний стрибок потенціалу (ГСП) моношару вимірювали методом динамічного конденсатора з використанням золотого та хлорсрібного електроду, а поверхневий тиск за допомогою напівзануреної платинової пластинки [Карамушка В.И., 1983]. Моношари ліпідів формували з азолектину, як субфазу використовували електроліт з низькою іонною силою: KCl-0,01 M; трис-HCl-0,01 M, pH=7,2 [Schurholz Jr., Schindler H., 1981].

Бімолекулярні ліпідні мембрани (БЛМ) формували з загальної фракції фосфоліпідів мозку бика за методом [Mueller P. et al, 1963, Бергельсон Л.Д., 1981]. Для порівняння змін електричних параметрів БЛМ під впливом ДМЕА використовували результати досліджень по впливу аніонного (додецилсульфат натрію) і катіонного (цетилтриметиламонію бромистого) детергентів [Рыбальченко В.К., 1987, Омельченко А.М., 1991]. Про стан (БЛМ) судили по почорнінню мембрани (мікроскоп МБС-2), та по значенням опору і електроємності, що реєструвались методом циклічних вольт-амперних характеристик [Карамушка В.И., 1983]. Розчин електроліту: 0,01 M KCl, 2 mM ацетатний буфер (pH=4,5).

Для вивчення проникаючої здатності протонованої форми аміноспирту в БЛМ застосували метод теоретичного аналізу [Топалы В.П. и соавт., 1984]. Використовуючи фрагментарний метод [Hansch

C., Leo A., 1979] були розраховані загальна площа поверхні і радіус молекули ДМЕА, а також профілі його потенціальної енергії.

Вивчення екто-АТФазної активності проводили на ізольованих клітинах *taenia coli* та тонкого кишечника кроля. Клітини виділяли за методом [Small J.V., 1977] у модифікації Богача П.Г. і співроб. [1983] з використанням розчинів ХЕНКА: 1. NaCl-120; KCl-4,6; Na₂HPO₄-0,4; NaHCO₃-4,0; глюкоза - 5,5 ммоль/л. 2. NaCl-120; KCl-4,6; NaHCO₃-4,0; глюкоза -5,5; CaCl₂ - 1,0 ммоль/л. Розчини готували на гістидиновому буфері концентрації 20 ммоль/л, рН=7,4 при 37⁰С. Величину екто -АТФазної активності визначали за методом [Ribalchenko V.K. et al., 1982].

Фракцію плазматичних мембран (ПМ) виділяли із гладком'язової тканини тонкого кишечника кроля методом диференційного центрифугування в градієнті щільності цукрози [Рыбальченко В.К. и соавт., 1984]. Кількісно мембранну фракцію характеризували по наявності в ній білка, який визначали за методом [Lowry O.H. et al., 1951]. Активність АТФаз субклітинних фракцій реєстрували по кількості неорганічного фосфату [Rathbun W.B., Betlach M.V., 1969]. Аналіз чистоти фракції ПМ проводили за активністю її маркерних ферментів: Na⁺, K⁺ и Mg²⁺, Ca²⁺- АТФаз, 5'-нуклеотидази [Грузина Т.Г. и соавт., 1984]. За величиною гальмування АТФазної активності азидом натрію судили про наявність мітохондріальних мембран [Kroll J.F., Korenman S.G., 1979], а по активності глюкозо-6-фосфатази - мембран ендоплазматичного ретикулулу [Bers D.M., 1979].

АТФ-залежне накопичення ⁴⁵Ca²⁺ фракцією ПМ тонкого кишечника кроля реєстрували за методом [Grover A.K. et al., 1980], реакцію зупиняли за допомогою фільтрування через мембранні фільтри "Millipore", розмір пор 0,45 мкм (HAWP 02500, "Millipore", (США). Радіоактивність препаратів (Ca) вимірювали за допомогою рідинного сцинтиляційного спектрометра SL-4000 фірми "Intertechnique" (Франція).

Електрофізіологічні дослідження проведені на ацинусах підшлункової залози собаки. Перфузія ацинусов в проточній камері здійснювалась при температурі +37⁰С розчином Кребса (в ммоль/л) : NaCl- 120; KCl- 5,9; NaHCO₃-15,5; NaH₂PO₄- 1,2; MgCl₂-1,2; CaCl₂- 2,5; глюкоза -11,5; рН розчину -7,2-7,4. Внутрішньоклітинне відведення електричних потенціалів проводили за допомогою скляних мікроелектродів [Костюк П.Г., 1986].

Дослідження рефлекторної дії парів ДМЕА здійснювалось за методом визначення порогу сприйняття запаху і подразнювальної дії речовини [Рязанов В.А., Буштуева К.А., 1957]. Обґрунтування відсутнього до теперішнього часу нормативу -максимально разової гранично допустимої концентрації ДМЕА в атмосферному повітрі населених місць, проведено за допомогою графічного методу пробіт-анализу [Андреещева Н.Г., 1976, 1977] та математичних методів "трьох точок" [Штабский В.М. и соавт.,1980] і "найменших квадратів" [Прозоровский В.В.,1962].

Вивчення резорбтивної дії ДМЕА в хронічному експерименті проводили на тваринах, яких розміщали у герметичних затравочних камерах Курляндського емністю 200 л, до яких безперервно на протязі 120 діб для контрольних тварин подавали чисте повітря, для піддослідних тварин - аероволь і пари аміноспирту відповідної концентрації [Попов В.А.,1971]. Концентрації ДМЕА у повітрі затравочних камер визначали, керуючись методом [Путилина О.Н., Ярым-Агаева Н.Т.,1981]. Стабільність заданих концентрацій аміноспирту як і подання повітря до камер забезпечувались методами [Пазынич В.М., Хлебников В.В., 1978; Перегуд Е.А., Горелик Д.О., 1981]. Проби із камер відбирались через кожні 48 годин на протязі всього періоду хронічної затравки.

Дослідження морфологічного складу крові піддослідних тварин на протязі хронічного експерименту проводили за методами [Бацман С.М., 1958; Предтеченский В.Е., 1964]. Активність холінестерази (ХЕ) визначали за модифікованим Колбом В.Г. і Камішніковим В.С. [1976] методом [Nestrin S., 1949]. Активності аланін-, і аспарат-амінотрансфераз (АЛТ, АСТ) визначали за уніфікованим методом [Райтман С., Френкель С.,1966]. У тварин відбирали проби крові в кінці кожного місяця на протязі всього періоду інгаляційної затравки.

Дослідження гістоструктури внутрішніх органів піддослідних тварин на протязі хронічної дії ДМЕА проводили за [Меркулов Г.А.,1969]. Для вияву тигроїду зрізи головного мозку фарбували кризливим фіолетовим по Нісслю [Елисеєв В.Г.,1967]. Одержання зрізів, фарбування зрізів та інтерпретація результатів виконувались відповідно рекомендацій [Войно-Ясенецкий М. В., Жаботинский Ю.М.,1978]. Спостереження за загальним станом і масою тіла тварин здійснювалось за методом [Западнюк И.П. и соавт.,1983]. Міорелаксантну дію аміноспирту оцінювали за [Давиденко А.В.,1983]. Вста-

новлення сумацийно-порогового показника (СПП) проводилось за методом [Сперанский С.В., 1975].

Статистичну обробку результатів виконували за методом [Плохинский Н.А., 1978]. Ступінь вірогідності (P) визначали за критерієм Ст'юдента для малих виборок.

1. ДОСЛІДЖЕННЯ РЕФЛЕКТОРНОГО ТА РЕЗОРБТИВНОГО ЕФЕКТИВ ДИМЕТИЛЕТАНОЛАМІНУ

1.1. Дослідження рефлекторної дії парів диметилетаноламіну.

Поріг сприйняття запаху ДМЕА визначали у 20 практично здорових волонтерів в віці від 20 до 45 років з нормальною функцією нюхового аналізатора. У 360 дослідях було опробовано 6 концентрацій аміноспирту (від 3,55 мг/м³ до 0,40 мг/м³). Відповідно до залежності "концентрація-ефект", на логарифмічній сітці інтенсивність збільшення запаху для ольфактивних речовин має форму прямої, кут нахилу якої по відношенню до осі абсцис (логарифм концентрації) складає 37°. За даними [Андреещева Н.Г., Пинигин М.А. 1977, 1978] речовини, кут нахилу збільшення концентрацій яких менший за 43°, відносяться до 4 класу небезпечності. Розрахований нами коефіцієнт запасу (К_з) аміноспирту дорівнює 2, що теж дозволяє віднести ДМЕА до 4 класу небезпечності [Андреещева Н.Г., Пинигин М.А., 1978]. Таким чином, за ступенем небезпечності ольфактивних реакцій та К_з ДМЕА відноситься до 4 класу - речовина малонебезпечна, а поріг запаху аміноспирту сягає 0,50 мг/м³ повітря. Окрім класу небезпечності встановлена максимально разова гранично допустима концентрація (ГДК_{м.р.}) ДМЕА у атмосферному повітрі населених місць - 0,25 мг/м³. Рекомендовану нами величину ГДК_{м.р.} - 0,25 мг/м³ було затверджено МОЗ СРСР (Список N 5158-89 від 24.11.89 р.).

1.2. Вплив диметилетаноламіну на сумацийну здатність центральної нервової системи щурів.

Діапазон концентрацій (коливань) аміноспирту у затравочних камерах за період інгаляційної затравки по кожній камері показав достовірність (P < 0,05) сталості заданих параметрів і складав для першої групи тварин 2,76 ± 0,06, для другої групи - 0,30 ± 0,08

та для третьої - $0,06 \pm 0,01$ мг ДМЕА/м³ повітря.

Дані досліджень функціонального стану центральної нервової системи щурів за умов тривалої інгаляційної дії аміноспирту свідчать про достовірні зміни СШП у двох групах піддослідних тварин: при хронічній затравці ДМЕА у концентрації $2,76 \pm 0,6$ мг/м³, починаючи з 30 дня ($3,59 \pm 0,08$ мВ при $3,04 \pm 0,6$ мВ у контролі) та при концентрації $0,30 \pm 0,08$ мг/м³, починаючи з 90 діб ($3,49 \pm 0,11$ мВ при $3,16 \pm 0,09$ мВ у контролі) і до кінця досліджень. Зміни СШП свідчать про порушення динамічної рівноваги між процесами гальмування та збудження з переважанням останнього [Сперанский С.В., 1972,1975].

Результати досліджень міорелаксантаної дії ДМЕА свідчать про достовірне зниження працездатності тварин двох дослідних груп: за умов дії найвищої концентрації аміноспирту - з першого місяця ($126 \pm 5,6$ хв при $165 \pm 8,5$ хв у контролі), а при концентрації $0,30 \pm 0,08$ мг/м³ - тільки наприкінці інгаляційної затравки (120 день) ($132 \pm 4,1$ хв при $165 \pm 8,38$ хв у контролі). Це свідчить, що токсичність ДМЕА проявляється і у зниженні працездатності піддослідних щурів, а швидкість наступання ефекту залежить від тривалості хімічного впливу.

1.3. Зміни активності ферментів крові тварин під впливом хронічної інгаляції диметилетаноламіном.

Як видно з рис. 1, у тварин, які зазнавали хронічної затравки ДМЕА у концентраціях $0,30 \pm 0,08$ та $0,06 \pm 0,01$ мг/м³, активність ХЕ майже не відрізняється від активності ферменту крові контрольної групи. Достовірне зниження активності ХЕ крові спостерігається у щурів, що зазнавали хронічної інгаляційної затравки ДМЕА у концентрації $2,76 \pm 0,06$ мг/м³ з другого місяця затравки і до кінця досліду.

Результати експериментів свідчать, що підвищення активності АСТ під впливом ДМЕА спостерігається у двох дослідних груп тварин, що зазнавали дії аміноспирту у концентраціях $0,30$ і $2,76$ мг/м³ (рис. 2). Зміни активності АЛТ менш виражені (рис. 3). Підвищення ферментативної активності спостерігається у тих самих дослідних груп тварин. У щурів першої групи ($2,76$ мг/м³) на третій місяць досліду активність ферменту підвищується на 42% (у 2 рази нижче показника активності АСТ).

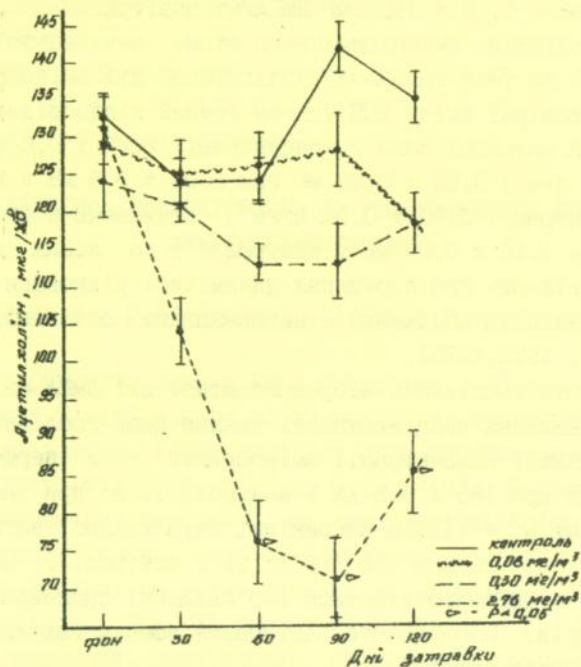


Рис. 1. Активність холінестерази в крові щурів під час хронічної інгаляційної дії різних концентрацій ДМЕА.

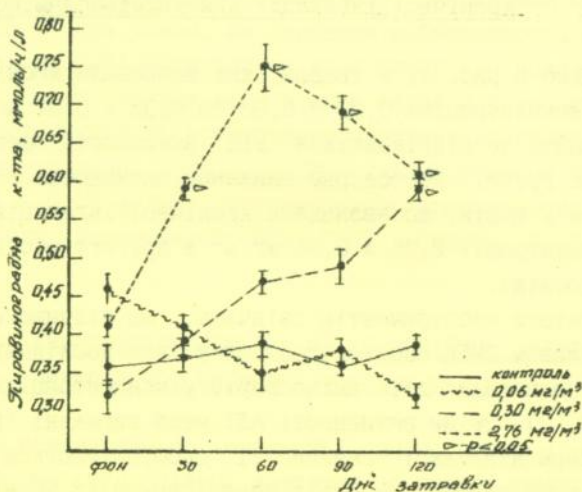


Рис. 2. Активність аспартат-амінотрансферази в крові щурів під час хронічної інгаляційної дії різних концентрацій ДМЕА.

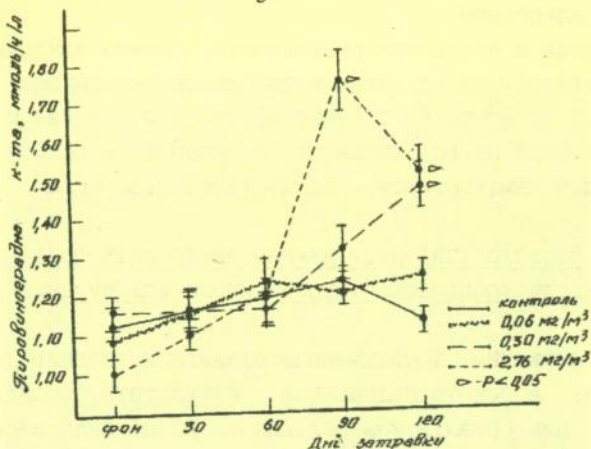


Рис. 3. Активність аланін-амінотрансферази в крові щурів під час хронічної інгаляційної дії різних концентрацій ДМЕА.

Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок про те, що порогова концентрація аміноспирту, виходячи із змін активності амінотрансфераз, складає $0,30 \text{ мг/м}^3$.

1.4. Вплив диметилетаноламіну на клітинний склад крові.

Встановлено, що тривалий інгаляційний вплив ДМЕА викликає достовірне зниження вмісту гемоглобіну ($167,5 \pm 2,64 \text{ г/л}$ при $177,5 \pm 2,64 \text{ г/л}$) по відношенню до вихідних показників на 120 день експерименту для першої групи тварин. Для лейкоцитів спостерігається достовірне підвищення їх кількості в крові тварин двох дослідних груп. Для тварин, що утримувались при концентрації $2,76 \pm 0,06 \text{ мг/м}^3$ ці зміни зафіксовано з 30 дня затравки і складають по відношенню до контролю: на 29,3% (30 діб), 60,3% (60 діб), 45,3% (90 діб) та 51,5% (120 діб). Для тварин другої групи ($0,30 \text{ мг/м}^3$) це підвищення зафіксовано лише на 120 добі експерименту.

Для лімфоцитів та сегментоядерних нейтрофілів відмічено достовірне їх підвищення на 30 добу інгаляційної затравки ($102,8 \pm 1,5\%$ при $70,1 \pm 1,4\%$ і $28,6 \pm 1,41\%$ при $23,71 \pm 1,2$ у контролі, відповідно), що свідчить про адаптаційну та захисну реакції організму. Такий важливий показник, як кількість еозинофілів в крові, що характеризує алергійний стан організму, у всіх тварин залишається незмінним та відповідає фізіологічній нормі. Тобто,

ДМЕА не є алергеном.

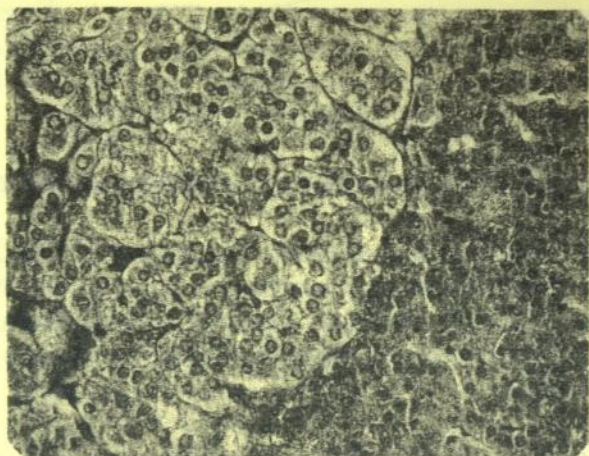
Виходячи з наведених результатів, можна заключити, що ДМЕА при тривалій дії на організм є токсичною речовиною у концентрації $2,76 \pm 0,06 \text{ мг/м}^3$ та його неспецифічна дія полягає у функціональних змінах перш за все кількості лейкоцитів в крові. Пороговою є концентрація аміноспирту, що дорівнює $0,30 \text{ мг/м}^3$.

1.5. Гістологічні дослідження внутрішніх органів тварин, які зазнавали хронічного інгаляційного впливу диметилетаноламіну.

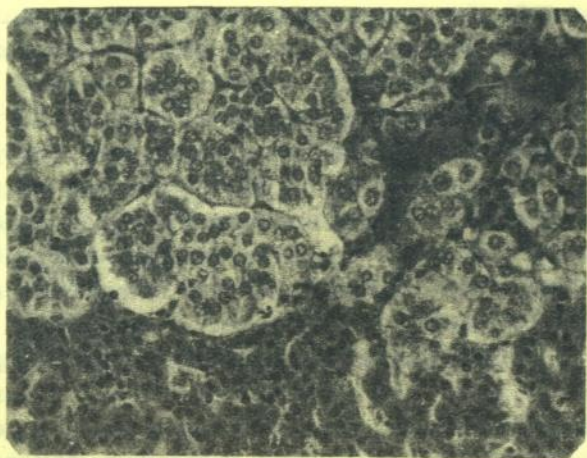
Гістологічним дослідженням підлягали органи: печінка, нирки ки, легені, мозок та наднирники. Результати досліджень гісто-структури цих органів контрольних та дослідних тварин, що підлягали дії низьких концентрацій аміноспирту ($0,30$ і $0,06 \text{ мг/м}^3$), не показують патологічних змін. У тварин першої дослідної групи, де концентрація ДМЕА у затравочній камері була найвищою, зареєстровані зміни: центральні вени печінки помітно розширені та дещо збільшені елементи триад, спостерігається помітне розширення капілярів у судинних клубочках ниркових тілець, відмічено явне розширення судин в усіх зонах наднирників, особливо, у мозковій. Капіляри гіпоталамічної ділянки мозку також розширені (рис. 4).

Такі, на перший погляд незначні, але характерні зміни на клітинно-тканинному рівні розцінюються як значимі, якщо вони носять "системний характер" [Трахтенберг И.М. и соавт., 1987]. У наших експериментах такі зміни простежуються у всіх тканинах (крім легень) і у найбільшій мірі - в органах детоксикації та елімінації шкідливих речовин - печінці та нирках. Біохімічні, фізіологічні і морфологічні зміни спостерігаються при дії такої ж концентрації ДМЕА, а саме - $2,76 \text{ мг/м}^3$. У зв'язку з цим, можна вважати, що ДМЕА у концентрації $2,76 \pm 0,06 \text{ мг/м}^3$ є токсичним, викликає слабковиражені та зворотні зміни метаболічної активності клітин органів, що характерно для хронічних отруєнь [Лукошко С.А. и соавт., 1989].

На підставі вивчення резорбтивної дії, а саме інтегрального комплексу фізіологічних, біохімічних досліджень та специфічних морфологічних показників, що дозволяють всебічно оцінити стан організму на різних його рівнях, дійшли висновку, що найменша діюча концентрація ДМЕА дорівнює $0,30 \pm 0,08 \text{ мг/м}^3$, а концентрація $0,06 \pm 0,01 \text{ мг/м}^3$ є підпороговою. Враховуючи рекомендації і



a



b

Рис. 4. Гістоструктура мозгової речовини наднирника
контрольного щура (а) та щура, який утриму-
вався при концентрації $2,76 \pm 0,06$ мг/м³ ди-
метилетаноламіну (б).

Забарвлення гематоксиліном і еозином.
x 200.

сучасні вимоги до досліджень по нормуванню токсичних речовин у атмосферному повітрі, а також встановлену нами ГДК_{м.р.}, середньодобова гранично допустима концентрація (ГДК_{с.д.}) диметилетаноламіну в атмосферному повітрі населених місць рекомендована нами по підпороговій концентрації аміноспирту на рівні 0,06 мг/м³, яку було затверджено МОЗ СРСР [Список N 5158-89,1989].

2. МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ ДІМЕТИЛЕТАНОЛАМІНУ

З метою розкриття молекулярних механізмів дії ДМЕА ми провели комплексні дослідження його мембранної активності, використовуючи для цього модельні мембрани, фракції плазматичних мембран, ізольовані міоцити тонкого кишечника кроля та тканину підшлункової залози собаки.

2.1. Поверхнева активність диметилетаноламіну.

Внесення ДМЕА в об'єм електроліту викликає дозозалежне концентрування аміноспирту на межі поділу фаз. Система досить швидко (20-30 хв) досягає стаціонарного стану, але величина адсорбції дуже низька. При підвищенні концентрації ДМЕА від 10⁻³ до 10⁻² М відбувається незначне збільшення поверхневого тиску (П) до 1,7-1,9 мН/м. Рівень адсорбції ДМЕА на поверхні поділу фаз (Г) дорівнює: 1,848 · 10⁻⁸. Площа, яку займає молекула ДМЕА у моношарі Si, дорівнює 8,99 · 10³ А². Таке низьке значення Г свідчить, що моношари ДМЕА є розтянутими, молекули знаходяться на значній відстані одна від одної.

Адсорбція аміноспирту на поверхні електроліту супроводжується падінням поверхневого потенціалу (рис. 5,6), що свідчить про певну орієнтацію іоногенних груп аміноспирту на межі поділу фаз. Можливо, від'ємно заряджений кисень в молекулі ДМЕА розташований ближче до повітря, ніж позитивно заряджений азот. При зміні концентрації аміноспирту у субфазі змінюється й орієнтація молекул у моношарі. Так, при наближенні концентрації до 10⁻¹ моль/л знову підвищується потенціал можливо, внаслідок переорієнтації молекул ДМЕА (або їх фрагментів) на межі поділу фаз та, в першу чергу, азоту і кисню).

Ми припустили, що одним з механізмів дії аміну на плазматичну мембрану клітини може бути взаємодія його з мембранними ліпі-

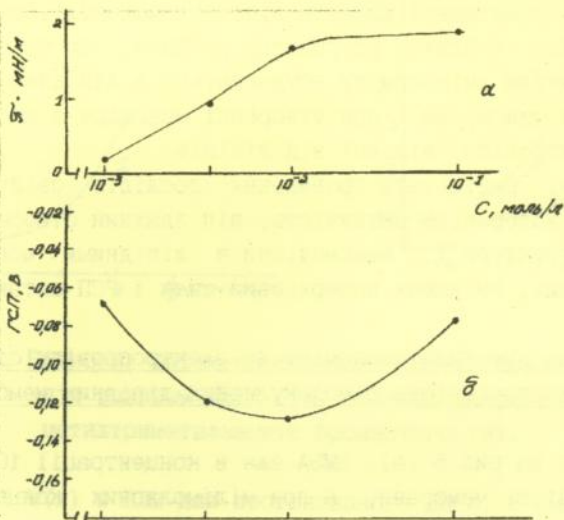


Рис. 5. Зміни поверхневого тиску (а) та ГСП (б) на границі поділу фаз "розчин електроліту-повітря" під впливом ДМЕА.

дами. У зв'язку з цим ми досліджували взаємодію аміноспирту з ліпідними моношарами з азолектину. Про взаємодію ДМЕА з фосфоліпідним моношаром судили за зміною поверхневого тиску і ГСП у відповідь на введення аміноспирту в субфазу (попадання ДМЕА на поверхню розподілу фаз виключалось). Виявлено, що при концентрації ДМЕА в інтервалі 10^{-4} - $1,6 \times 10^{-2}$ моль/л практично відсутні зміни поверхневого тиску, яке значно підвищується і досягає на протязі 20 хвилин 34,4 мН/м при концентрації аміноспирту 10^{-1} моль/л.

Таким чином, азолектиновий моношар відіграє роль "затравки" і сприяє більш інтенсивній (порівняно з чистою поверхнею електроліту) адсорбції молекул ДМЕА на межі розділу фаз. Різкі зміни поверхневого тиску спостерігаються лише при концентрації аміноспирту в субфазі, яка перевищує 10^{-2} моль/л. Одночас з різким збільшенням двовірного тиску спостерігається і зниження ГСП, що може бути зумовлено двома причинами. По-перше, вбудуванням молекул ДМЕА в азолектиновий моношар може призвести до деякої переорієнтації диполей ліпідних молекул внаслідок взаємодії іоногенних груп молекул ліпиду і аміноспирту. По - друге, інкорпорууючись в ліпідний моношар, молекули ДМЕА орієнтуються таким чином, що

від'ємно заряджений кисень молекули розташований ближче до повітря (тобто в області позитивних зарядів ліпідних молекул), а позитивно заряджений азот - ближче до границі субфази, що також знижує ГСП. Тобто, молекули аміноспирту вбудовуються в ліпідний моношар, напевне таким же чином, як і при утворенні моношару з аміноспирту на поверхні електроліту, вільної від ліпідів.

Таким чином, результати проведених дослідів свідчать, що ДМЕА притаманна поверхнева активність, він здатний створювати номомолекулярні структури і, взаємодіючи з ліпідними моношарами, вбудовується в них, змінюючи поверхневий тиск і ГСП останніх.

2.2. Вплив диметилетаноламіну на електропровідність та електроємність бімолекулярних ліпідних мембран.

Як показано на рис.6 (а), ДМЕА вже в концентрації 10^{-5} моль/л підвищує провідність мембрани, а при мілімолярних концентраціях провідність БЛМ збільшується у 1,5 рази. В протилежність детергенту ДМЕА не призводить до утворення дискретної провідності бішару. Збільшення електроємності мембрани з ростом концентрації аміноспирту в розчині майже повністю співпадає з числовими значеннями збільшення електропровідності (рис.6 (б), та, як і у першому випадку, збільшення електроємності БЛМ під впливом ДМЕА значно нижче змін електроємності під впливом катіонного детергенту цетилтриметиламонію бромистого.

Отримані ефекти можна пояснити тим, що молекула аміноспирту в слабкокислому середовищі електроліту може приєднувати протон і переходити в іонізовану форму з зарядом +1. В результаті цього, а також в наслідок певної ліпофільності аміну, збільшення провідності БЛМ, можливо, пов'язано з інкорпорацією і трансмембранним рухом іонізованої форми ДМЕА через бішар [Лукошко С.А., Островская Г.В., 1990]. Збільшення ємності БЛМ також пов'язане з інкорпорацією молекул аміноспирту, дипольний момент яких складає біля 2,2 Дебая [Осипов О.А. и др. 1971]. При інкорпорації таких диполей всередину гідрофобної зони БЛМ збільшується діелектрична проникність бішару і, як наслідок, пропорційно збільшується ємність мембрани при постійній її товщині.

Нами був проведений теоретичний аналіз проникаючої здатності катіонної форми аміноспирту. На рис. 7 подано профіль потенціаль-

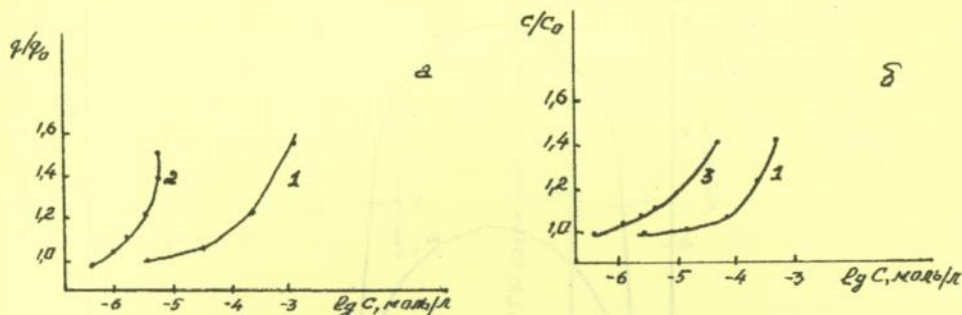


Рис. 6. Відносні зміни провідності (а) та ємності (б) БЛМ під впливом ДМЕА (1), додецилсульфату натрію (2), цетилтриметиламонію бромистого (3).

ної енергії $W(x)$ в БЛМ для протонованого ДМЕА, з якого видно, що максимальне значення потенціальної енергії $W(d/2)$ складає 59 кТ. Ця величина відповідає коефіцієнту розподілу $K(d/2)$ $2,3 \cdot 10^{-26}$. Оцінки, наведені у роботі [Маркин В.С., Чизмаджиев Ю.А., 1974], дають для неорганічних однозарядних катіонів величину $K(d/2)$, що дорівнює 10^{-30} . Ці дані свідчать, що протонованій формі ДМЕА властива більш висока проникна здатність, ніж неорганічним катіонам.

Вагомим фактором, що впливає на провідність БЛМ для ДМЕА є його ліпофільність. Концентрація іонів мінімальна у середині БЛМ, де енергетичний бар'єр є максимальним. Власна провідність мембрани визначається в першу чергу переносом іону через її середину. ДМЕА може зменшити електростатичну взаємодію, тільки збільшуючи діелектричну проникність. Тобто збільшення іонної провідності БЛМ є, можливо, результатом порушення (зменшення в'язкості) щільної структури бішару крупними сферичними молекулами аміноспирту, що знаходяться у ньому, внаслідок чого дифузія іонів та молекул полегшується [Лукошко С.А. и соавт., 1991].

2.3. Вплив диметилетаноламіну на 5'-нуклеотидазну, Na^+, K^+ -АТФазну активності та на активний транспорт кальцію фракцією плазматичних мембран міоцитів.

На рис. 8 представлені результати, що свідчать про зміни ак-

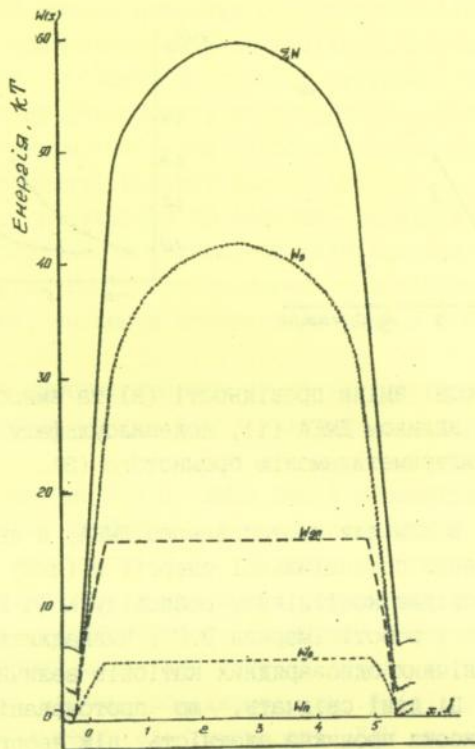


Рис. 7. Профілі енергій W_N , W_B , W_{DP} , W_E та ΣW для протонованого ДМЕА з радіусом 3,1 Å. Відстань X - координата перпендикулярна площині мембрани (0 відповідає лівій межі БЛМ). Розрахунки виконано для БЛМ з параметрами: $\varphi_{п} = -60$ мВ, $\varphi_{дп} = 400$ мВ, $t = 25^\circ\text{C}$.

тивності Na^+, K^+ -АТФази та 5'-нуклеотидази при дії різних концентрацій ДМЕА. Видно, що активність 5'-нуклеотидази, розташованої на зовнішній поверхні мембрани, надто чутлива до дії ДМЕА в усьому діапазоні використаних концентрацій, значно збільшуючись при $10^{-6} - 10^{-4}$ моль/л. Навпаки, вплив аміноспирту на активність Na^+, K^+ -АТФази майже не спостерігається при концентраціях ДМЕА, що досліджувалися. Якісно аналогічний характер збільшення активності 5'-нуклеотидази під впливом ДМЕА має і концентраційна залежність впливу ДМЕА на активний транспорт кальцію ПМ (рис. 9).

Ці результати дозволяють зробити висновок про те, що ДМЕА,

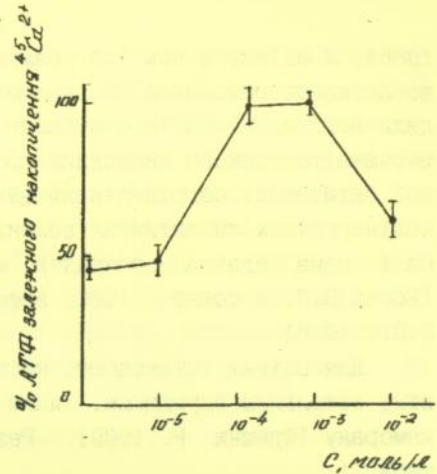
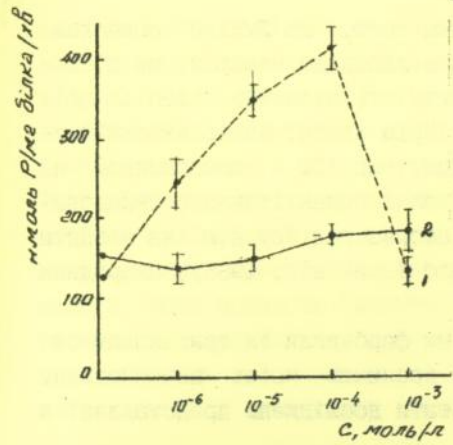


Рис. 8. Вплив ДМЕА на 5'-нуклеотидазну (1) та Na⁺,K⁺-АТФазну (2) активності плазматичної мембрани міоцитів.

Рис. 9. Зміни АТФ-залежного накоплення кальцію фракцією плазматичних мембран міоцитів під впливом ДМЕА.

якому притаманна поверхнева активність (див.2.1.), взаємодіє з плазматичною мембраною гладком'язових клітин, змінюючи при цьому як активність мембранозв'язаних ферментів, так і активний транспорт кальцію. Тобто, ДМЕА можна віднести до мембранотропних речовин, при взаємодії з мембраною він змінює фізико-хімічні властивості ліпідного матриксу і, як наслідок, функціональну активність мембрани.

Заслугує уваги і те, що аміноспирт в досліджуваних концентраціях, не викликає незворотних змін вказаних процесів, що дуже важливо у зв'язку з використанням його у фармакології, парфюмерії та у виробництві, що обумовлює пряме його попадання через атмосферне повітря та повітря робочої зони в організм.

2.4. Вплив диметилетаноламіну на екто-АТФазну активність ізольованих міоцитів.

Одним з найбільш чутливих показників цитотоксичного ефекту різноманітних хімічних сполук є зміни активності ферментів, що локалізовані на зовнішній поверхні мембрани.

1985]. У зв'язку з цим і з урахуванням того, що ДМЕА є поверхнево-активною речовиною та взаємодіє з ліпідами мембран, ми дослідили його вплив на екто-АТФазну активність міоцитів *taenia coli* мурчака та тонкого кишечника кроля. Крім цього, вибір екто-АТФазної активності обґрунтований ще й тим, що АТФ є компонентом як холінергічних синаптичних везикул, так і позаклітинного середовища і сама здатна проявляти медіаторно-подібну дію на міоцити [Богач П.Г. и соавт., 1981, Hoggbland J. et al., 1985, Загороднюк В.П., 1986].

Для оцінки інтактності клітин ми фарбували їх трипановим синім, вітальним барвником, який не проникає крізь непошкоджену мембрану [Фрешни Р., 1989]. Результати досліджень представлені в табл. 1.

Таблиця 1.

Вплив диметилетаноламіну на життєздатність та екто-АТФазну активність гладком'язових клітин.

Концентрація ДМЕА в :% клітин, не забарвлених: Екто-АТФаза :
інкубаційному сере- : трипановим синім через : активність, % :
довищі, М : 15 хв інкубації з ДМЕА : :

10^{-7}	95 ± 2	100	:
10^{-6}	93 ± 1	98 ± 2	:
10^{-5}	89 ± 3	94 ± 2	:
10^{-4}	91 ± 2	66 ± 3	:
10^{-3}	86 ± 4	15 ± 3	:
10^{-2}	80 ± 3	0	:

З табл. 1, що ДМЕА в мікромольній концентрації практично не впливає на екто-АТФазну активність суспензії ізольованих гладком'язових клітин. Збільшення вмісту аміноспирту в середовищі знижує екто-АТФазну активність, а в концентрації 10^{-2} моль/л аміноспирт повністю її блокує. Цей ефект є зворотнім, однак після вилучення ДМЕА з інкубаційного середовища екто-АТФаза активність не досягає вихідного рівня. У той же час зниження та блокування екто-АТФазної активності не супроводжується суттєвим руйнуванням плазматичних мембран клітин, про що свідчить забарвлення трипа-

пановим синім : кількість забарвлених клітин зростає всього до 15% навіть після інкубації препарату з ДМЕА в концентрації 10^{-2} моль/л. Різке зниження та пригнічення екто-АТФазиної активності, як і неповна зворотність ефекту високих доз аміноспирту, дозволяє зробити висновок, що цитотоксичний ефект ДМЕА проявляється при його концентраціях, що перевищують 10^{-4} моль/л. Слід відзначити, що саме в діапазоні концентрацій 10^{-4} - 10^{-3} моль/л ДМЕА виявляє максимальний ефект на характеристики БЛМ. При концентрації 10^{-2} моль/л, коли повністю блокується екто-АТФазна активність, спостерігається максимальна адсорбція ДМЕА на ліпідних моношарах. Ці дані свідчать про основну роль взаємодії аміноспирту з ліпідним матриксом ПМ у здійсненні його токсичної дії на клітину.

2.5. Вплив диметилетаноламіну на електричні реакції ацинарних клітин.

Відомо [Шевчук П.М., Магура І.С., 1989, 1991], що мембранний потенціал ацинарних клітин підшлункової залози собаки варіює в межах 12,0-27,5 мВ, а значення вхідного опору коливається від 0,5 до 4,0 МОм, що підтверджується і нашими дослідженнями. ДМЕА в концентрації 1 ммоль/л викликає деполяризацію мембран на 5-10 мВ та зменшує вхідний опір ацинарних клітин. З часом вхідний опір зменшується на 30 - 35% відносно контролю. При збільшенні концентрації аміноспирту до 5 ммоль/л зменшення вхідного опору складає 60 - 70%. Подальше збільшення концентрації ДМЕА (10 ммоль/л) не викликає істотних змін електрофізіологічних параметрів ацинарних клітин, що аналогічно впливу аміноспирту на мембранні ферменти і Са - насос гладком'язових клітин (рис. 10,11). Ці дані свідчать, що аміноспирт в мілімолярних концентраціях модулює електрогенез ацинарних клітин, не порушуючи при цьому електричний зв'язок між клітинами одного ацинуса підшлункової залози.

Для встановлення іонного механізму ефектів ДМЕА на електричні параметри клітин ми дослідили вплив аміноспирту на ацинарні клітини в умовах безкальцієвого і безнатрієвого середовищ. Виявилось, що внесення аміноспирту в концентрації 1 ммоль/л в безкальцієвий розчин Кребса, що містить 1 ммоль ЕГТА, також призводить до деполяризації мембрани на 3-3,5 мВ і до зменшення вхідного опору на 70-72%. Збільшення концентрації аміноспирту до 5 ммоль/л викликає деполяризацію мембрани 3,5 - 4,0 мВ і зменшення вхідного

опору секреторних клітин. Так, на 6-ій хвилині дії безкальцієвого розчину Кребса, що містить 5 ммоль/л ДМЕА, величина вхідного опору складає 90% відносно контролю, на 20-ій - 77%, на 18-ій - 68%. В присутності 10 ммоль/л аміноспирту вхідний опір ацинарних клітин на 5-ій хвилині дії безкальцієвого розчину складає 72%, на 10-ій - 62% і на на 15-ій - 52%. При цьому спостерігається деполяризація мембрани на 7,5 - 10 мВ, тоді як дія безкальцієвого розчину Кребса, що містить ЕГТА викликає деполяризацію мембрани на 10-12 мВ і зменшує вхідний опір клітини.

Перфузія ацинарних клітин безнатрієвим розчином Кребса (іони Na^+ замінили на іони Трис-(оксиметил)-амінометану) викликає гіперполяризацію мембрани на 8-10 мВ і значне зменшення вхідного опору. Додавання ДМЕА (10ммоль/л) в такий розчин викликає гіперполяризацію мембрани на 5,6-6,0 мВ, яке супроводжується зменшенням вхідного опору. Відмивання ацинарних клітин розчином Кребса приводить до відновлення мембранного потенціалу і вхідного опору до вихідних значень, що свідчить про зворотній ефект аміноспирту на ацинарні клітини в умовах безнатрієвого середовища.

Таким чином, отримані результати є підставою припускати, що ДМЕА збільшує калієву і натрієву провідність мембран ацинарних клітин.

В результаті проведених комплексних досліджень на різних рівнях організації організму та на модельних і біологічних мембранах отримана нова інформація про вплив диметилетаноламіну на організм. Показано, що ДМЕА, якому властива поверхнева активність, взаємодіє з мембранами клітин, модифікуючи при цьому не тільки ліпідний матрикс мембран, а й білково-ліпідні функціонально-активні мембранні комплекси. Все це проявляється в зміні електрогенезу, мембранного транспорту, активності мембранозв'язаних ферментів, що в кінцевому результаті приводить до зворотніх порушень морфологічних властивостей та біохімічних процесів організму.

Проведені дослідження, окрім внеску в розуміння молекулярних механізмів впливу диметилетаноламіну, дали можливість встановити і гранично допустимі концентрації аміноспирту в повітрі, що має прикладне значення.

В И С Н О В К И

1. Хронічна інгаляція тварин диметилетаноламіном не викликає незворотних гісто- морфологічних порушень у крові та тканинах печінки, легенів, мозку, наднирників. Проте, активність ферментів крові (холінестераза, аспартат- та аланінамінотрансферази) при максимальних концентраціях аміноспирту у повітрі ($2,76 \text{ мг/м}^3$) зворотно пригнічується до 56%.

2. Встановлена поверхнева активність диметилетаноламіну і його здатність утворювати мономолекулярні структури на межі поділу фаз та вбудовуватись у ліпідні моношари, про що свідчить зменшення граничного стрибка потенціалу на 39 мВ та збільшення поверхневого тиску моношару на 16,6 мН/м.

3. При інкорпорації дипольних молекул диметилетаноламіну всередину гідрофобної зони бішарових ліпідних мембран відбувається збільшення діелектричної проникності бішару, та, внаслідок цього, пропорційне підвищення електроємності та електропровідності мембрани у 1,5 рази.

4. Взаємодіючи та модифікуючи ліпідну фазу біологічної мембрани, диметилетаноламін у мілімолярних концентраціях збільшує активність мембранозв'язаних ферментів (5'-нуклеотидаза, Na^+ , K^+ -АТФаза, екто-АТФаза), активний транспорт кальцію та електричні властивості плазматичних мембран.

5. В результаті досліджень мембранотропних властивостей диметилетаноламіну, патоморфології внутрішніх органів, активності ферментів крові, суматійної здатності центральної нервової системи та працездатності тварин при інгаляції на протязі 120 діб встановлена середньодобова гранично допустима концентрація аміноспирту в атмосферному повітрі населених місць на рівні $0,06 \text{ мг/м}^3$. За рефлекторною дією диметилетаноламіну максимально разова гранично допустима концентрація складає $0,25 \text{ мг/м}^3$. Ці нормативи затверджені МОЗ СРСР і впроваджені на території СНД.

Основні публікації за темою дисертації:

1. Материали к обоснованию максимально разовой предельно допустимой концентрации диметилэтанолamina в атмосферном воздухе /В.К. Рыбальченко, В.Е. Присяжнюк, С.А.Лукошко и др. -К.:КГУ. 1987. 44 с.
2. Взаимодействие диметилэтанолamina с плазматической и липид-

ными искусственными мембранами / С.А.Лукошко, Г.В. Островская, В.К.Рыбальченко и др.//Обзор деп. в УкрНИНТИ. N2983-Ук.88.-К. 1988. 47 с.

3. Установление ПДК диметилэтанолamina в атмосферном воздухе населенных мест/С.А. Лукошко, Т.А. Ковальчук, Л.И. Ребрикова и др.//Обзор деп. в УкрНИНТИ N607-Ук89.-К. 1989. 65 с.
4. Лукошко С.А., Островская Г.В. Исследование влияния различных концентраций диметилэтанолamina на проводимость и емкость бислойных липидных мембран//Молекуляр. генетика и биофиз.-К.: Вища школа.1990. Вып.15. С.51-53.
5. Влияние ингаляционного воздействия диметилэтанолamina на структуру внутренних органов крыс/С.А. Лукошко, О.В. Данилова, В.К. Рыбальченко, С.Н. Цивинская//Проблемы общей и молекуляр. биол.-К.: Вища школа. 1991. Вып.9. С.134-138.
6. Определение критерия вредности и мембранотропных свойств веществ на примере диметилэтанолamina/С.А.Лукошко, В.К. Рыбальченко, А.М.Омельченко, Г.В.Островская //Тез.докл. конф. "Медико-биологические и гигиенические аспекты охраны среды на предприятиях медицинской промышленности". -Старая Купавна. 1991. С.129.
7. Поверхностно-активные свойства диметилэтанолamina и его влияние на экто-АТФазную активность плазматических мембран / С.А. Лукошко, В.К. Рыбальченко, Г.В. Островская, Н.В.Куликова //Бюлл. exper. биол. 1991. N 2. С.157-159.
8. Лукошко С.А., Ковальчук Т.А., Рыбальченко В.К. Изменения суммационной способности ЦНС под влиянием диметилэтанолamina//Тез. конф."Актуальні проблеми фізіології". -К.: Либідь. 1992. С.9.

Лукошко С.А. Мембранотропная активность диметилэтанолamina. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.00.23-гистология, цитология, эмбриология.; 03.00.04-биохимия, Киевский университет имени Тараса Шевченко, Киев, 1994.

Защищается 8 научных работ, которые содержат теоретические и экспериментальные исследования. Проведены комплексные исследования на разных уровнях организации организма и на модельных и биологических мембранах. Показано, что диметилэтаноламин (ДМЭА), которому свойственна поверхностная активность, взаимодействует с мембранами клеток, модифицируя при этом не только липидный матрикс, но и белково-липидные мембранные комплексы. Это проявляется в изменении электрогенеза, мембранного транспорта, активности мембраносвязанных ферментов, что в конечном результате приводит к обратимым нарушениям морфо-физиологических особенностей и биохимических процессов организма.

Наряду с вкладом в понимание молекулярных механизмов действия ДМЭА, проведенные исследования дали возможность установить регламенты ПДК ДМЭА, утвержденные МЗ СССР и внедренные на территории СНГ.

Lukoshko S.A. Membrane tropic activity of dimethylethanolamine.

Thesis for Ph.D. degree of histological and biochemical science on speciality 14.00.23-histology, cytology, embryology; 03.00.04-biochemistry, Taras Shevchenko University, Kiev, 1994.

There are defence of 8 scientific works containing theoretical and experimental researches. As a result of the complex investigations on various levels of organism and on the artificial and biological membranes it was obtained a new information about dimethylethanolamine (DMEA) influence on the organism. It was shown that DMEA which possessed the surface activity, interacted with the cell membranes by modifying not only lipid membrane matrix but also protein-lipid functionally active membrane complex. It is expressed in the changes of electrogenesis, membrane transport and activity of the membrane-bound enzymes, and resulted in reversible disturbance of morphophysiological properties and biochemical processes in

organism.

Besides the significance for understanding of molecular mechanisms of DMEA, carried out investigations allowed to determine limiting permissible concentrations of amino ethanol in air. Latter fact has applied significance.

Ключові слова:

Диметилетаноламін, ГДК, токсичність, мембранотропні властивості.

806557

AB 31.487

AB 31.487