УДК: 57.017.645;57.04;577.334.611.018

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТОЛУОЛА НА НЕЙРОГЕНЕЗ В СТРУКТУРАХ ЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И КОРРЕКЦИЯ ВЫЯВЛЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ МИРАДОЛА

Т.В. Саникидзе, доктор биол. наук, Д.П. Мусеридзе, доктор биол. наук, И.К. Сванидзе, доктор биол. наук, Е.В. Дидимова, Л.Г. Гегенава, доктор биол. наук, Н.Н. Гвинадзе

Центр экспериментальной биомедицины им. И.Бериташвили, г. Тбилиси, Грузия

РЕЗЮМЕ. *Исследовали изменения интенсивности сигналов липопероксирадикалов (LOO˙) и свободного оксида азота (NO) с помощью спин-ловушек PBN и DETC в лимбической коре и гиппокампе крыс на P15, P30 и P60 этапах развития, которые в течение P2-P21 параллельно с ингаляцией 1200 ppm толуола получали мирадол с целью коррекции выявленных изменений. Определяли также число погибших нейронов в вышеотмеченных структурах. Полученные результаты показали снижение интенсивности окислительного стресса и степени окислительного повреждения нейронов при одновременном воздействии толуола и мирадола, а также снижение числа погибших нейронов, что указывает на антиоксидантную активность этого препарата и возможность его применения в качестве протектора, препятствующего развитию деструктивных нарушений в процессе нейрогенеза.*

Ключевые слова: лимбическая кора, гиппокамп, толуол, мирадол, свободные радикалы.

Потребление токсикоманами органных разбавителей, содержащих 60–70% толуола, для достижения эйфорического состояния, чаще всего наблюдается среди детей и подростков, т.к. они легко доступны и недороги по сравнению с другими препаратами. Ранний период постнатального развития структур головного мозга характеризуется особенной чувствительностью к воздействию внешних нейротоксических факторов, что проявляется в интенсивной реорганизации синаптических сетей и ряда трансмиттерных систем [1]. В отмеченном периоде толуол оказывает значительное повреждающее влияние на процессы пролиферации и миграции, вызывая нарушение формирования структур головного мозга, оказывает сильное влияние на развитие и ветвление базальных дендритов пирамидных нейронов в разных областях коры головного мозга крыс [2]. Ингаляция толуолом в дальнейшем ведет к формированию неврологических расстройств у людей и нарушению поведенческих параметров у животных [3, 4].

Особая чувствительность нервной системы к толуолу обусловлена большим количеством жирных кислот в мембранах нервных клеток, которые являются главной мишенью для свободных радикалов, образующихся после интоксикации. Свободные радикалы вызывают нарушение стабильности белков и хроматина, а также дыхательной цепи в митохондриях, ингибируют репликацию ДНК, тормозят развитие клеточного цикла, повреждают клеточные мембраны, что способствует гибели клеток путем некроза или апоптоза и обусловливает формирование дистрофических процессов в корковых и подкорковых структурах головного мозга [5].

Исходя из вышесказанного, особый интерес представляет попытка ослабить вызванные толуолом деструктивные процессы с помощью антиоксидантов с нейропротекторной специфичночтью. С целью превенции токсического эффекта толуола в последнее время активно используются различные фармакологические вещества и ряд растительных антиоксидантов. Особо следует отметить антиоксидантную активность мелатонина и его метаболитов, выражающуюся в нейтрализации свободных радикалов, образующихся после интоксикации толуолом [6, 2].

В проведенных нами ранних исследованиях было показано, что добавление в пищевой рацион животных препаратов плаферона-ЛБ и мирадола ослабляло цитотоксическое действие толуола в корковых и подкорковых структурах двигательной системы [3, 7].

В настоящей работе с целью коррекции вызванных интоксикацией толуолом нарушений в формировании корковых и подкорковых структур лимбической системы мы использовали мирадол, характеризующийся выраженной способностью обезвреживать токсины и блокировать образования свободных радикалов. Мирадол содержит антиоксидант нового поколенияя эпофен (2,4-гидроксифенилен)-1-окси, 4-гидроксифенилен), а также аминокислоты, макро- и микроэлементы, полисахариды, витамины группы В, РР, Е, Н и автолизат дрожжей, что в свою очередь усиливает превентивное воздействие препарата.

Материал и методы. Исследовали 3 группы белых крыс на ранних этапах постнатального

развития (P3, P7. P15, P21): I - контрольная (интактная) группа; II - экспериментальная группа - животные (пять дней в неделю) путем ингаляции вдыхали пары толуола (1200ppm); III - экспериментальная группа - животные в период лактации, параллельно с ингаляцией толуола, получали мирадол с молоком матери. Кормящие самки получали мирадол (0.7гр) натощак в период лактации.

Изменения интенсивности сигналов свободных радикалов исследовали в коре головного мозга и гиппокампе на P15, P30 и P60 этапах развития крыс, которые в течение P2-P21 параллельно с ингаляцией толуолом получали мирадол с молоком матери. Интенсивность сигналов липопероксирадикалов (LOO·) и свободного оксида азота (NO) выявляли с помощью спин-ловушек PBN (а-фенил-тертбутилнитрон) (Sigma) и с DETC (диэтилдитиокарбамат натрия) (Sigma), соответственно с использованием метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Ткань коры головного мозга и гиппокампа помещали в полиэтиленовые трубки, толщиной 20-25мм и содержали в жидком азоте при температуре - 196°С. Регистрация ЭПР спектров производилась на радиоспектрометре РЭ-1307 (Россия).

Для определения числа нейронов в структурах лимбической системы мозг фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы (10 мкм) окрашивались крезил-виолетом. Плотность (количество) нервных клеток определяли в каждом третьем срезе в 10 полях зрения (0,0256 мм^2) с помощью окулярной сетки (увеличение ок.10, об.40) в световом микроскопе (Amplival, Zeiss). Число нейронов у контрольных и экспериментальных животных определяли в лимбической коре (поясная извилина, энторинальная кора), аммоновом роге и зубчатой фасции гиппокампа на ранних этапах постнатального развития (P3, P7, P15, P21).

Эксперименты проводились согласно правилам, выработанным комитетом биоэтики Центра экспериментальной биомедицины им. И.С.Бериташвили. Полученные цифровые показатели обрабатывались статистически с использованием критерия Фишера-Стьюдента.

Результаты. Интоксикация толуолом вызывала в коре головного мозга и гиппокампе резкое увеличение интенсивности ЭПР сигналов спинмеченных липопероксидов (LOO·) на этапе P30 - P60 (рис.1). Интенсив-ность сигнала спинмеченного свободного оксида азота (NO) также увеличивалась, однако в меньшей степени (рис.2).

Изучение плотности распределения нейронов в поясной извилине, энторинальной коре, аммоновом роге и зубчатой фасции гиппокампа показало, что вдыхание 1200 ppm толуола на всех изученных этапах развития (P3, P7, P15, P21) ведет к уменьшению числа нейронов по сравнению с контрольными животными. Особенно чувствительными к повреждающему влиянию толуола оказались пирамидные нейроны энторинальной коры и аммонова рога гиппокампа, а также гранулярные клетки зубчатой фасции гиппокампа, преимущественно на P15 и P21 этапах постнатального развития (табл.1).

Потребление мирадола в период лактации (P3-P21) вызывало снижение числа погибших

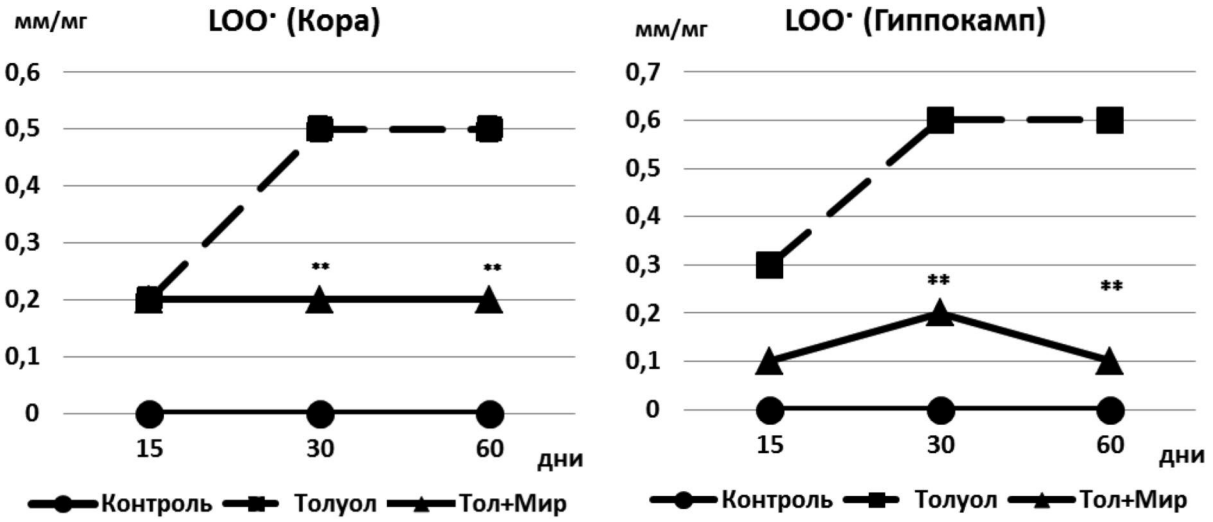

Рис. 1 Кривые изменения липопероксидрадикалов (LOO•) на ранних этапах постнатального развития в коре головного мозга (а) и гиппокампе (б) после воздействия толуола и одновременного влияния толуола и мирадола.

* - достоверные изменения между контролем и толуолом

** - достоверные изменения между толуолом и толуол+мирадолом

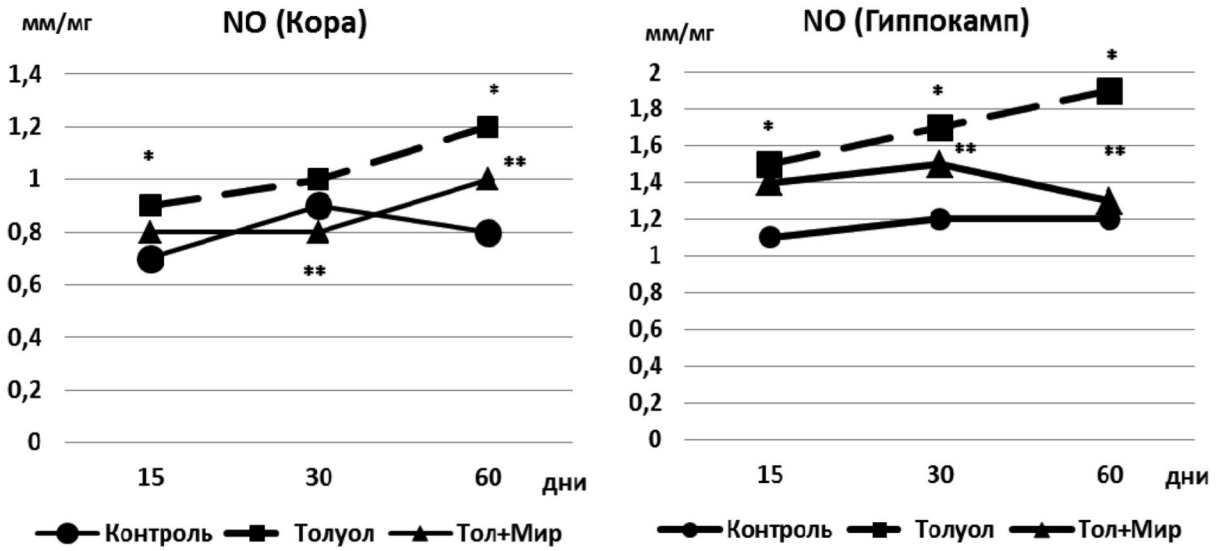

Рис. 2 Кривые изменения свободного оксида азота (NO) на ранних этапах постнатального развития в коре головного мозга (а) и гиппокампе (б) после воздействия толуола и одновременного влияния толуола и мирадола.
* - достоверные изменения между контролем и толуолом
** - достоверные изменения между толуолом и толуол+мирадолом

Таблица 1

Количество нейронов в структурах лимбической системы при потреблении толуола и Мирадола

	Энторинальная кора	**Поясная извилина**	**Аммонов рог**	**Зубчатая фасция**
3 дня				
Контроль	26,6 ± 07	40,1 ± 0,6	450,2 ± 6,5	100,6 ± 0,5
Толуол	19,0 ± 0,3*	32,2 ± 0,5*	350,1 ± 5,8*	78,9 ± 0,8*
Толуол+Мирадол	19,5 ± 0,7	35,2 ± 1,6	434,2 ±0,3**	83,1 ±1,5**
7 дней				
Контроль	28,1 ± 0,4	37,6 ± 0,6	441,5 ± 3,5	110,5 ± 0,4
Толуол	17,6 ± 0,5*	30,0 ± 0,8*	353,4 ± 2,8*	69,2 ± 0,6*
Толуол+Мирадол	26,0 ± 1,0**	32,4 ± 0,7**	396 ± 2, 8**	133 ± 1,0**
15 дней				
Контроль	22,4 ± 0,5	26,6 ± 0,4	466,7 ± 3,1	160,8 ± 3,4
Толуол	15,0 ± 0,4*	23,2 ± 0,3*	271,0 ± 3,3*	73,3 ± 3,6*
Толуол+Мирадол	22,2 ± 0,3**	24,9 ± 0,5**	351,0 ±3,5**	132 ± 3,2**
21 день				
Контроль	21,1 ± 0,4	22,3 ± 0,5	470,3 ± 8,9	105,0 ± 2,1
Толуол	13,5 ± 0,4*	14,3 ± 0,4*	227,1 ± 3,4*	70,2 ± 2,0*
Толуол+Мирадол	24,1 ± 0,5**	18,5 ± 0,5**	345,0 ±3,0**	95,2 ±1,1**

* - достоверные изменения между контролем и толуолом
** - достоверные изменения между толуолом и толуол+Мирадолом

нейронов в структурах лимбической системы на всех изученных этапах развития (табл. 1). Интенсивность сигналов ЭПР спинмеченных липопероксидов (LOO·) и свободного оксида азота (NO) в коре головного мозга и гиппокампе у животных на этапах Р30 и Р60 также были понижены по сравнению со значениями этих показателей во время интоксикации толуолом (рис. 1, 2).

Обсуждение. Редокс-система играет важную роль в регуляции функционирования нервной системы, включая процессы развития, контроль клеточного метаболизма и инициацию нейротоксических реакций. Исследо-вания последних лет указывают на ключевую роль оксида азота (NO) и прооксидантов в патогенезе функционального и структурного повреждения нейронов различных областей головного мозга [8]. В мезанизме интоксикации толуолом окислительный стресс, вызванный дисфункцией митохондрий, способствует усиленной генерации свободных радикалов кислорода, интенсификации окисления белков, ДНК и липидов, что в конечном счете ведет к активации апоптоза или некрозу нейронов и глии [2]. Нами было выявлено, что увеличение интенсивности ЭПР-сигнала липопероксидрадикалов в коре головного мозга и гиппокампе крыс на более поздних стадиях развития (Р30 - Р60), свидетельствует об интенсификации перекисного окисления липидов. Одновременное увеличение интенсивности спинмеченного свободного NO в структрах головного мозга может быть вызвано повышеной экспрессией iNOS в условиях окислительного стресса. Избыток NO в условиях окислительного стресса характеризуется цитотоксичностью и совместно со свободнорадикальными формами кислорода и липидов (липопероксидов) способствует повреждению нервных структур. Последнее проявляется уменьшением числа нейронов (в особенности пирамидных нейронов энторинальной коры и аммонова рога гиппокампа и гранулярных клеток зубчатой фасции гиппокампа) на фоне интоксикации толуолом на Р15 и Р21 этапах постнатального развития по сравнению с контрольными животными.

Наши результаты совпадают с данными литературы и подтверждают мнение об особой чувствительности процесса нейрогенеза к воздействию толуола в раннем постнатальном периоде [1, 7]. Это особенно выражено в гиппокампе, формирование которого происходит в течение первого месяца после рождения (активная пролиферация зернистых клеток в зубчатой фасции и формирование структуры гиппокампа) [9]. Нашими ранними исследованиями было показано, что ингаляция 500 ppm толуола вызывает также гибель пирамидных нейронов моторной коры, нейронов мозжечка и подкорковых ядер [7].

Во время нейродегенеративных заболеваний с целью стабилизации митохондриальных мембран, нервных клеток, подвергнутых действию окислительного стресса, часто используют антиоксиданты (например, фолиевая кислота или витамины группы В, коэнзим Q_{10}, антиоксиданты растительного происхождения), которые значительно увеличивают биосинтез убихинона в организме и способствуют восстановлению функций митохондрий [10].

Мирадол содержит антиоксидант эпофен - аналог полифенольных соединений, синтезированный из гидрохинона и представляет собой два ароматических шестичленных цикла. Первый ароматический цикл эпофена гидрохинон входит в структуру витаминов группы К, а его окисленная форма убихинон представляет собой не что иное, как общеизвестный коэнзим Q_{10}. Второй ароматический цикл эпофена также является типичным представителем полифенолов природного происхождения и является структурным компонентом большинства широкоизвестных b-флавоноидов, а также входит в состав витаминов РР и Е и многих других натуральных соединений. Молекула эпофена может являться донором электронов для радикалов и таким образом обезвреживать их и препятствовать повреждению молекул активных ингредиентов. Помимо эпофена мирадол содержит дрожжевой автолизат, в состав которого входят витамины группы В и другие аминокислоты, что усиливает антиоксидантные способности этого препарата.

Полученные нами данные показали, что при интоксикации толуолом мирадол может быть использован в качестве антиоксиданта, оказывающего защитное действие на нервные клетки, что проявилось в снижении числа погибших нейронов в лимбической коре и гиппокампе на ранних этапах постнатального онтогенеза. Интенивность свободнорадикальных сигналов липопероксидов (LOO·) и свободного оксида азота (NO) в тканях головного мозга после использованиия мирадола также уменьшилась, что указывает на снижение деструктивных процессов, вызванных интенсификацией оксидативного стресса на фоне толуоловой интоксикации.

Таким образом, выявленные при толуоловой интоксикации нарушения нейрогенеза являются следствием усиленной генерации реактивных соединений кислорода и развития окислительного стресса. Снижение интенсивности окислительного стресса и степени окислительного повреждения нейронов при одно-

временном воздействии толуола и мирадола указывает на антиоксидантную активность этого препарата и возможность его применения в качестве протектора, препятствующего развитию деструктивных нарушений в процессе нейрогенеза.

Работа выполнена при поддержке гранта (№ 1-2.53) Национального научного фонда им. Ш. Руставели, Грузия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Toluene Exposure during the Brain Growth Spurt Reduced Behavioral Responses to Nicotine in Young Adult Rats: A Potential Role for Nicotinic Acetylcholine Receptors in Fetal Solvent Syndrome / [M.H. Chan, Yu-Chi Tang, Te-H Chien, H-H. Chen]// Toxicological Sciences. — 2008. — № 101(2). — P. 286–93.
2. Reiter R.J. Free Radical Mechanisms and Melatonin Protection / R.J. Reiter, L.C. Manchester, Dun-Xian Tan// Curr Neuropharmacol. — 2010 September; №8(3). — P.194–210.
3. Коррекция изменений, вызванных толуолом в корковых и подкорковых структурах головного мозга белых крыс / И.К. Сванидзе, Д.П. Мусеридзе, Е.В. Дидимова [et al.]// Известия РАН, серия биологическая. — 2007, № 3. — P. 325-28.
4. Smaller gray matter volumes in frontal and parietal cortices of solvent abusers correlated with cognitive deficits // K. Aydin, S. Kirkan, S. Sarwar [et al.] // Am. J. Neuroradiol.–2009. — №30. — P.1922–28).
5. El-Nabi Kamel MA. Effect of toluene exposure on the antioxidant status and apoptotic pathway in organs of the rat / M.A. El-Nabi Kamel, M. Shehata // Br J Biomed Sci.–2008; №65(2). — P. 75–79.
6. Learning and memory deficits in rats induced by chronic thinner exposure are reversed by melatonin / [G. Baydas, F. Ozveren, I. Akdemir, M. Tuzcu, A. Yasar]// Journal of Pineal Research – 2005 August. №39(1). — P. 50–56.
7. Нарушение морфогенеза корковых и подкорковых структур двигательной системы крыс на ранних этапах постнатального развития после интоксикации толуолом и коррекция этих нарушений с помощью антиоксиданта // Д.П. Мусеридзе, И.К. Сванидзе, Е.В. Дидимова [и др.] // Современные проблемы токсикологии. — 2010, №2-3. — P. 29–32.
8. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets / C.D. Munhoz, B. Garcna-Bueno, J.L. Madrigal [et al.] Med Biol Res. – 2008 Dec; №41(12). — P. 1037–46.
9. Toluene inhibit hippocampal neurogenesis in adult mice / H.S. Seo, M. Yang, M.S. Song [et al.] // Pharmacol Biochem Behav. – 2010, № 94. — P.588–94.
10. Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q10 / M. Somayajulu, S. McCarthy, M. Hung,. Neurobiol Dis. – 2005, April № 18(3). — P. 618–27.

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ТОЛУОЛУ НА НЕЙРОГЕНЕЗ У СТРУКТУРАХ ЛІМБІЧНОЇ СИСТЕМИ ТА КОРЕКЦІЯ ВИЯВЛЕНИХ ЗМІН ЗА ДОПОМОГОЮ МІРАДОЛУ

Т.В. Санікідзе, доктор біол. наук, Д.П. Мусерідзе, доктор біол.наук, І.К. Сванідзе, доктор біол.наук, Е.В. Дидімова, Л.Г. Гегенава, доктор біол.наук, Н.Н. Гвінадзе
ЦЕНТР ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ БІОМЕДИЦИНИ ІМ.І.БЕРИТАШВІЛІ, М. ТБІЛІСІ, ГРУЗІЯ

РЕЗЮМЕ. *Досліджували зміни інтенсивності сигналів ліпопероксирадикалів (LOO˙) та вільного оксиду азоту (NO) за допомогою спин-пасток PBN та DETC у лімбічній корі та гіпокампі щурів на P15, P30 і P60 етапах розвитку, які протягом P2-P21 паралельно з інгаляцією 1200 ppm толуолу одержували мірадол з метою корекції виявлених змін. Визначали також кількість гинучих нейронів у зазначених структурах. Одержані результати засвідчили зниження інтенсивності окислювального стресу і ступеня окислювального ушкодження нейронів за одночасної дії толуолу та мірадолу, а також зниження кількості загиблих нейронів, що вказує на антиоксидантну активність цього препарату і можливість його застосування як протектора, що запобігає розвиткові деструктивних порушень у процесі нейрогенезу.*
Ключові слова: лімбічна кора, гіпокамп, толуол, мірадол, вільні радикали.

STUDIES OF THE EFFECT OF TOLUENE ON NEUROGENESIS IN THE STRUCTURES OF THE LIMBIC SYSTEM AND THE CORRECTION OF DETECTED CHANGES BY MIRADOL

T. Sanikidze, D.Sc., D. Museridze, D.Sc., I. Svanidze, D.Sc., E. Didimova, L. Gegenava, D.Sc., N. Gvinadze
I. BERITASHVILI CENTER OF EXPERIMENTAL BIOMEDICINE, TBILISI, GEORGIA

SUMMARY. *The study investigated the changes in signal intensity of lipoperoxidradikals (LOO˙) and free nitric oxide (NO) by spin-trap PBN and DETS in the limbic cortex and hippocampus of rats at P15, P30 and P60 stages of development, which for a P2-P21 parallel to the inhalation of 1200ppm toluene to correct the identified changes received miradol. It was also defined also the number of perished neurons in the limbic structures. The results showed a decrease in the intensity and degree of oxidative stress induced neuronal damage, while toluene and miradol effects as well as reducing the number of perished neurons. All these points to the oxidative activity of the drug and the possibility of its use as a protector from the development of degenerative diseases in the process of neurogenesis.*
Key words: limbic cortex, hippocampus, toluene, miradol, free radicals.

Надійшла до редакції 5.06.2013 р.