

# ВПЛИВ ПОЛІОЛІВ НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРОЛУ НА ПАРАМЕТРИ ЗВ'ЯЗУВАННЯ СЕЛЕКТИВНИХ ЛІГАНДІВ АДРЕНОРЕЦЕПТОРАМИ НЕОКОРТЕКСА ЩУРІВ

Доц. Ю. К. Резуненко, проф. В. І. Жуков, проф. В. А. Прокопов

Харківський національний медичний університет

*За допомогою радіоізотопного методу у статті визначено параметри зв'язування  $^3\text{H-WB4101}$  і  $^3\text{H}$ -дигідроалпренололу  $\alpha_1$ - і  $\beta$ -адренорецепторами синапсом неокортекса щурів за умов тривалого впливу поліолів на основі гліцеролу в дозі  $1/100\text{ LD}_{50}$ . Було встановлено, що поліоли 1103К і 3003-2-60 викликають зниження константи дисоціації та максимальної кількості місць зв'язування  $^3\text{H-WB4101}$   $\alpha_1$ -адренорецепторами на тлі збільшення максимальної кількості місць зв'язування  $^3\text{H}$ -дигідроалпренололу  $\beta$ -адренорецепторами. Отримані результати підтверджують мембранотропну дію поліолів, що реалізується через зміну активності рецепторних мембранозв'язаних комплексів.*

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИОЛОВ НА ОСНОВЕ ГЛИЦЕРОЛА НА ПАРАМЕТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ СЕЛЕКТИВНЫХ ЛИГАНДОВ АДРЕНОРЕЦЕПТОРАМИ НЕОКОРТЕКСА КРЫС

Доц. Ю. К. Резуненко, проф. В. І. Жуков,  
проф. В. О. Прокопов

*Радиоизотопным методом в статье определены параметры связывания  $^3\text{H-WB4101}$  и  $^3\text{H}$ -дигидроалпренолола  $\alpha_1$ - и  $\beta$ -адренорецепторами синапсом неокортекса крыс в условиях длительного воздействия полиолов на основе глицерола в дозе  $1/100\text{ LD}_{50}$ . Было установлено, что полиолы 1103К и 3003-2-60 снижают константу диссоциации и максимальное количество мест связывания  $^3\text{H-WB4101}$   $\alpha_1$ -адренорецепторами на фоне повышения максимального количества мест связывания  $^3\text{H}$ -дигидроалпренолола  $\beta$ -адренорецепторами. Полученные результаты подтверждают мембранотропное действие полиолов, которое реализуется через изменение активности рецепторных мембраносвязанных комплексов.*

## THE INFLUENCE OF POLYOLS STRUCTURALLY BASED ON GLYCEROL ON PARAMETERS OF SELECTIVE LIGANDS BINDING BY RAT NEOCORTEX ADRENORECEPTORS

Yu. K. Resunenko, V. I. Zhukov, V. A. Prokopov

*Using radioisotopic method the present research established binding parameters of  $^3\text{H-WB4101}$  and  $^3\text{H}$ -dihydroalprenolole by  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoreceptors correspondently of rat neocortex at conditions of prolonged influence of polyols structurally based on glycerol in  $1/100\text{ LD}_{50}$ . Polyols 1103K and 3003-2-60 result in decrease in dissociation constant and maximal binding sites of  $^3\text{H-WB4101}$  by  $\alpha_1$ -adrenoreceptors on the background of increase in  $^3\text{H}$ -dihydroalprenolole by  $\beta$ -adrenoreceptors maximal binding sites. The obtained results support membranotropic action of polyols which is realized via alteration of membrane-binding receptor complexes.*

Сучасні напрямки медичної науки потребують своєчасного глибокого вивчення впливу хімічних чинників навколишнього та виробничого середовища на організм [1; 2]. Поліоли на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003-2-60) належать до поширених промислових хімічних забруднювачів водоймищ, у тому числі джерел водопостачання населення, що пов'язано з їхнім широким використанням у промисловості

та побуті як мийних засобів, емульгаторів, антикорозійних і бактерицидних препаратів тощо [3]. Доведено також можливість надходження речовин даного класу до організму людини з питною водою. Регламентация вмісту поліолів в об'єктах навколишнього середовища здійснюється на базі використання тимчасових розрахункових нормативів. Проте механізми біологічної дії цих сполук вивчено недостатньо,

але саме їхнє врахування є підставою для адекватної регламентації та обґрунтування медико-біологічних і профілактичних заходів щодо захисту здоров'я населення та довкілля.

В основі цілої низки патологічних станів за умов дії чинників зовнішнього середовища та внутрішніх функціональних розладів лежать зміни властивостей клітинних мембран [4; 8]. Порушення їхнього функціонування може бути не тільки причиною, але й наслідком розвитку патологічних процесів. Враховуючи фізико-хімічні особливості поліолів (наявність гідрофобних і гідрофільних груп, здатність до хімічних перетворень з утворенням біологічно активних сполук тощо), вважаємо за необхідне вивчення їхнього впливу на деякі характеристики біологічних мембран клітин організму шурів, зокрема на рецепторні мембранозв'язані комплекси. Рецептори — це генетично детерміновані макромолекули, що опосередковують дію на організм багатьох екзогенних та ендогенних сполук, передаючи позаклітинні сигнали до клітини. Взаємодіючи з тими самими рецепторними молекулами, що й фізіологічні ефектори (гормони, медіатори), деякі ксенобіотики здатні модулювати біохімічні й фізіологічні ефекти природних регуляторів метаболізму та функцій. Серед безлічі хімічних сполук є такі, що мають властивості конкурентного зв'язування з фізіологічними ефекторами, порушуючи тим самим функції рецепторного апарата [9].

**Мета** роботи — визначення параметрів зв'язування — константи дисоціації та максимальної кількості місць зв'язування лігандів  $\alpha_1$ - і  $\beta_1$ -адренорецепторів синаптосом неокортекста шурів за умов тривалого впливу поліолів на основі гліцеролу в дозі  $1/100 LD_{50}$ .

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі використано зразки речовин із регламентованими фізико-хімічними характеристиками: поліоксипропілентріол — П-1103К і поліоксиетиленоксипропілентріол — П-3003-2-60. Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії «Вістар» масою 200–220 г. Проведення процедур з експериментальними тваринами здійснено згідно з вимогами Державного комітету з етики. Тварини утримувалися у стаціонарних умовах виварію за постійної температури та природного освітлення [5]. Їх піддавали пероральній затравці за допомогою

зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 30 діб у дозі  $1/100 LD_{50}$ , що, відповідно, складало для П-1103К — 0,012 г/кг, П-3003-2-60 — 0,032 г/кг маси. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми води. Забій тварин проводили шляхом декапітації, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію.

Визначали константу дисоціації ( $K_d$ ) і максимальну кількість місць зв'язування ( $B_{max}$ ) лігандів  $\alpha_1$ -адренорецепторів (АР) —  $^3H$ -WB4101 та  $\beta$ -АР —  $^3H$ -дигідроалprenололу. При цьому графік Скетчарда мав криволінійний характер, що могло свідчити про: 1) гетерогенність, тобто наявність декількох пулів рецепторів, що відрізняються спорідненістю до ліганду; 2) негативну кооперативність у пулі рецепторів [7]. Для оцінювання наявності кооперативності використовували координати Хілла — логарифм відношення зв'язаного ліганду до різниці між максимальним зв'язуванням та цією величиною проти логарифма кількості вільного ліганду [7]. Для досліджуваних моделей рецепторів коефіцієнт Хілла дорівнював 1, що свідчило про відсутність кооперативних ефектів. Приймавши альтернативне припущення про існування декількох пулів рецепторів, у подальшому аналізі матеріалу використовували метод Н. Е. Rosental [13], що дозволив виокремити у графіку Скетчарда дві системи — низько- та високоафінного зв'язування. Проводили визначення  $K_d$  і  $B_{max}$  ліганду  $\alpha_1$ -АР [14] із мінімальними модифікаціями, зумовленими малою кількістю біологічного матеріалу. Як мічений ліганд використовували  $^3H$ -WB4101 (0,6 або 1,58 ТБк/ммоль, «Amersham», Великобританія). Середовищем інкубації був 50 мМ трис-НСІ буфер (рН 7,4), який містив 10 мМ іпрасиду. Реакційна суміш містила мічений ліганд, середовище інкубації, синаптосоми (50 мкл). Ряд розведень міченого ліганду складав 0,4–5,6 нМ. Об'єм інкубаційної суміші доводили до 500 мкл різними об'ємами середовища інкубації. Для визначення неспецифічного зв'язування ліганду в додаткові пробірки поряд з указаними елементами реакційної суміші додавали немічений WB4101 у кількості, необхідній для створення концентрації  $10^{-4}$  М у пробірці. Вимірювання радіоактивності проводили на лічильнику «Бета-2». Для розрахунку результатів у DPM (decomposition per minute) використовували формулу:

$$X \times 5 \times (100/Y),$$

де  $X$  — результати виміру в СРМ (count per minute),  $Y$  — ефективність виміру за методом внутрішньої стандартизації, %.

Специфічне зв'язування ліганду рецепторами визначали як різницю між загальним і неспецифічним зв'язуванням. Рівень неспецифічного зв'язування складав до 35 % загального. Ефективність вимірів на аналізаторі «Бета-2» складала 60 %. Проводили визначення параметрів зв'язування ліганду  $\beta$ -АР [11]. Як селективний ліганд використовували  $^3\text{H}$ -дигідроалпренолол (1,4 або 2,1 ТБк/ммоль, «Amersham», Великобританія), ряд розведень якого складав 0,5–6,0 нМ. Середовищем інкубації був 50 мМ трис-НСІ буфер (рН 7,4); 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Для визначення неспецифічного зв'язування використовували обзидан у концентрації  $10^{-4}$  М, його рівень складав до 30 % рівня загального зв'язування. Одержували синаптосоми [12], а для контролю чистоти отриманих фракцій проводили мікроскопічний аналіз осадів синаптосом і міжфракційної межі.

Для перевірки гіпотез щодо рівності генеральних середніх двох незалежних, незв'язаних

вибірок використовували  $t$ -критерій Стьюдента з попередньою перевіркою нормальності розподілу варіант [6].

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Досліджувані поліоли в дозі  $1/100 \text{ LD}_{50}$  викликали однакову тенденцію змін функціональних властивостей  $\alpha_1$ -АР синаптосом неокортекса щурів. На 30-ту добу дії 1103К і 3003-2-60 достовірно підвищували спорідненість до ліганду  $^3\text{H}$ -WB4101 високо- й низькоафінного пулу рецепторів і знижували їхню кількість, порівняно з контрольною групою. Для поліолу 1103К зниження  $K_d$  і  $B_{\text{max}}$  складало, відповідно, для високоафінного пулу 63 і 23 %, для низькоафінного — 38 і 34 %. Для поліолу 3003-2-60 зменшення  $K_d$  і  $B_{\text{max}}$  складало 59 і 29 % та 32 і 48 %, відповідно, для високо- та низькоафінного пулів рецепторів (табл. 1).

Вплив поліолів на стан  $\beta_1$ -АР був односпрямованим: сполуки в дозі  $1/100 \text{ LD}_{50}$  на 30-ту добу спостереження не впливали на спорідненість рецепторів до ліганду  $^3\text{H}$ -дигідроалпренололу, але при цьому достовірно збільшували  $B_{\text{max}}$  як високо-, так і низькоафінного пулів. Підвищення  $B_{\text{max}}$  у випадку високоафінного пулу

Таблиця 1

Вплив поліолів у дозі  $1/100 \text{ LD}_{50}$  на параметри зв'язування  $^3\text{H}$ -WB 4101  $\alpha_1$ -адренорецепторами синаптосом неокортекса щурів (30-та доба,  $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Поліол	Високоафінний пул		Низькоафінний пул	
	Константа дисоціації, нмоль	Максимальна к-сть місць зв'язування, фмоль/мг білка	Константа дисоціації, нмоль	Максимальна к-сть місць зв'язування, фмоль/мг білка
1103К	$0,68 \pm 0,059^*$	$132,4 \pm 10,6^*$	$2,42 \pm 0,19^*$	$55,9 \pm 4,6^*$
3003-2-60	$0,76 \pm 0,064^*$	$122,2 \pm 11,7^*$	$2,63 \pm 0,18^*$	$43,8 \pm 3,5^*$
Контроль	$1,85 \pm 0,14$	$172,3 \pm 14,7$	$3,88 \pm 0,40$	$84,3 \pm 6,2$

Примітка: \* —  $p < 0,05$  відносно контролю.

Таблиця 2

Вплив поліолів у дозі  $1/100 \text{ LD}_{50}$  на параметри зв'язування  $^3\text{H}$ -дигідроалпренололу  $\beta_1$ -адренорецепторами синаптосом неокортекса щурів (30-та доба,  $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Поліол	Високоафінний пул		Низькоафінний пул	
	Константа дисоціації, нмоль	Максимальна к-сть місць зв'язування, фмоль/мг білка	Константа дисоціації, нмоль	Максимальна к-сть місць зв'язування, фмоль/мг білка
1103К	$0,33 \pm 0,03$	$14,7 \pm 1,20$	$0,81 \pm 0,08$	$11,6 \pm 0,93$
3003-2-60	$0,25 \pm 0,02$	$16,8 \pm 1,32^*$	$0,78 \pm 0,06$	$12,5 \pm 1,06^*$
Контроль	$0,27 \pm 0,02$	$11,8 \pm 0,7$	$0,84 \pm 0,06$	$8,6 \pm 0,63$

Примітка: \* —  $p < 0,05$  відносно контролю.

$\beta_1$ -адренорецепторів для 1103К і 3003-2-60, відповідно, складало 25 і 42%, а у випадку низькоафінного пулу — 35 і 45 %, порівняно з контрольною групою щурів (табл. 2).

Дію поліолів на АР можна пояснити їх мембранотропними ефектами, впливом на фосфоліпідний склад біомембран. Отримані дані свідчать також про зміну адренергічної регуляції, що виявилася в більшій активації  $\alpha_1$ -АР, ніж  $\beta_1$ -АР. Це, у свою чергу, може супроводжуватися зміною ефектів, опосередкованих даними підтипами рецепторів. Відомо, що адренергічна регуляція функцій органів змінюється не тільки за рахунок зміни кількості або співвідношення АР, але й унаслідок індукції змін будь-яких процесів спряження рецепторів із внутрішньоклітинними структурами [9; 10].

### ВИСНОВКИ

1. Тривала дія поліолів на основі гліцеролу (П-1103К, П-3003-2-60) у дозі 1/100 LD<sub>50</sub> супроводжується зниженням константи

дисоціації та максимальної кількості місць зв'язування селективного ліганду <sup>3</sup>H-WB 4101  $\alpha_1$ -адренорецепторами синапсом неокортекса щурів на тлі збільшення максимальної кількості місць зв'язування <sup>3</sup>H-дигідроалprenололу  $\beta_1$ -адренорецепторами.

2. Вплив поліолів на стан мембранозв'язаних рецепторних комплексів може бути як безпосереднім, так і опосередкованим через вплив на фосфоліпідне оточення.

3. Зміни внутрішньоклітинних процесів під впливом поліолів, з одного боку, можуть відбуватися в результаті їхніх мембранотропних ефектів в організмі, а з іншого — за рахунок реалізації їхньої токсичної дії.

У перспективі планується провести комплекс досліджень, спрямованих на обґрунтування механізмів біологічної дії поліолів, зокрема оцінку ферментних мембранозв'язаних комплексів, з метою визначення їхньої потенційної небезпеки та нормування.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Голдовская Л. Ф.* Химия окружающей среды / Л. Ф. Голдовская. — М. : Мир, 2007. — 294 с.
2. *Белозерова С. М.* Особенности формирования заболеваемости в условиях индустриального труда и новых технологий // Медицина труда и пром. экология. — 2011. — № 3. — С. 13–19.
3. Простые и макроциклические эфиры: научные основы охраны водных объектов / В. И. Жуков, Л. Д. Попова, О. В. Зайцева, Р. И. Кратенко. — Х. : Торнадо, 2000. — 438 с.
4. *Камкин А. Г.* Физиология и молекулярная биология мембран клеток / А. Г. Камкин, И. С. Киселева. — М. : Академия, 2008. — 592 с.
5. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. — К. : Авіценна, 2002. — 156 с.
6. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин — М. : Высш. шк., 1990. — 154 с.
7. Моноамінергічні механізми потенційної судомної готовності головного мозку / В. В. М'ясоєдов, В. І. Жуков, В. Г. Гопкалов, Р. І. Кратенко. — Х. : ХДМУ, 2000. — 222 с.
8. *Паніна Л. В.* Механізми мембранозалежних метаболічних змін при різних строках введення анальгетичного препарату / Л. В. Паніна // Експерим. та клінічна фізіологія і біохімія. — 2003. — Т. 1, № 21. — С. 23–29.
9. *Сергеев П. В.* Рецепторы физиологически активных веществ / П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский. — М. : Медицина, 1987. — 400 с.
10. *Хухо Ф.* Нейрохимия / Ф. Хухо — М. : Мир, 1990. — 384 с.
11. *Bylund D. B.* Beta-adrenergic receptor binding in membrane preparations from mammalian brain / D. B. Bylund, S. H. Snyder // Mol. Pharmacol. — 1979. — Vol. 12. — P. 568–580.
12. *Hajos F.* An improved method for preparation of synaptosomal fractions in high purity / F. Hajos // Brain Res. — 1975. — Vol. 93. — P. 485–489.
13. *Rosenthal H. E.* A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system / H. E. Rosenthal // Analytical Biochem. — 1967. — Vol. 20. — P. 525–532.
14. *U'Prichard D.* Binding characteristics of a radiolabeled agonist and antagonist of central nervous system alpha-noradrenergic receptors / D. U'Prichard, D. Greenberg, S. H. Snyder // Molec. Pharmacol. — 1977. — Vol. 13. — P. 454–473.