Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXVIII, knj. 25.

Rezaković, Džemal

1991

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/3bff7ae5-1a58-4336-9010-7be80dd2e58a

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082) YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

TOKSIKOLOŠKE METODE ISPITIVANJA NA IZOLOVANIM ORGANIMA PREPARIRANIM IZ USNE ŠUPLJINE

ELVEDINA KAPIĆ
Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.9:616.31

Apstrakt. Jedan od najčešćih puteva ulaska ekotoksina u organizam su usta, pa je pokušano da se nađe pogodan model-sistem iz usta i ždrijela da bi se ustanovio neposredan uticaj ekotoksina. Opisani su model-sistemi, izolirani inervirani organi, i to mišići jezika sa pripadajućim nervima i mišićni dio ždrijela sa ograncima motornih nerava, i korišteni su za ispitivanje djelovanja organskih otapala i soli teških metala. Pokazano je da je djelovanje navedenih ksenobiotika dvofazno. U manjim koncentracijama u početku povećavaju efekt stimulacije, a zatim dolazi do smanjenja efekta stimulacije pripadajućih nerava. Opisani izolirani inervirani organi mogu poslužiti u analizi djelovanja i otrovnosti pomenutih materijala.

Ključne riječi: izolirani organi, stomatologija, organska otapala, teški metali.

UVOD

U okruženju čovjeka se nalazi veliki broj ksenobiotika i ekotoksina, čiji je glavni put unošenje u organizam ustima ili udisanjem. Djelovanje i kinetika ksenobiotika je drugačija ovisno o putu unošenja (Bielsen and Anderson, 1989). Ksenobiotici mogu imati akutan direktan toksičan efekt na sluznici usta ili na mišićnim strukturama jezika i farinksa, ali je na neuromišićnu transmisiju vjerovatniji njihov efekat nakon resorpcije, tj. djelovati iz krvi na mišiće jezika i farinksa.

Lokalni — direktni toksički efekt, odnosno indirektni efekt na strukture usta se rijetko ispituju u laboratoriju na životinjama, a pogotovu na izolovanim strukturama iz usta. U toksikološkim ispitivanjima dolaze u obzir farmakološki metodi ispitivanja kao poseban metod toksikoloških ispitivanja jer se tako mogu ustanoviti djelovanja otrova a dijelom i kinetika, odnosno kretanje toksina. Inače, opisane su brojne uspješne farmakološke metode u toksikologiji (Zbinden and Gross, 1979).

Ovaj rad je potpomognut sredstvima Saveznog sekretarijata za razvoj, Beograd.

Konvencionalne toksikološke analize uglavnom otkrivaju biohe mijske promjene parametara i promjene struktura, a manje promjen funkcija, odnosno djelovanja toksina. Kod trovanja, međutim, dolaze u obzir klinički simptomi i znaci kao što su slabost, glavobolja, tremor simptomi sa strane gastrointestinalnog trakta, palpitacije, pa sve d težih disfunkcija kardiovaskularnog trakta, CNS, endokrinog sistema.

Stomatolog može doći u kontakt sa više ksenobiotika, kao što s na pr. živa, fenolski spojevi i sl. Scarlett i sar. (1988) su našli u kosi stomatologa dva puta više žive nego kod kontrola (3± 0,6 ppm).

Simptomi trovanja metalima mogu ukazati na poremećaj neuro mišićne transmisije. Isto tako, u akutnim trovanjima sa organskim ota palima dolazi do poremećaja koji ukazuju na poremećaje nervnog i mo tornog sistema.

Cilj ovog rada je da opiše promjene reakcije mišića farinksa jezika pod uticajem organskih otapala i teških metala. Organska ota pala su benzen, ksilen i trihloretilen, a soli metala su živin hlorid olovni acetat.

METODE

Eksperimenti su se vršili na izoliranim organima sa njima pripa dajućim nervima. Ksenobiotik je bio injiciran u posudu za izolovan organe koji su u isto vrijeme bili električki stimulirani preko pripada jućih motornih nerava. Prati se promjena izazvanih kontrakcija i pro mjena bazalne linije.

Eksperimentalne životinje su bili bijeli domaći miševi prosječn težine od 20 g i Wistar štakori težine 200 g. Životinje su nabavljene iz vivarija Vinča i iz domaćeg legla. Nakon dekapitacije prepariraju s slijedeći organi: izolovani jezik sa pripadajućim motornim nervom farinks sa pripadajućim motornim nervom. U prvom slučaju se iz jezi ka preparira tanak longitudinalni nerv sa vidljivim motornim nervom koji se golim okom može primijetiti kako ulazi u mišić. U slučaju kad se preparira farinks, onda se preparira počevši od granice usta do gor njeg dijela ezofagusa. Nervi za farinks se prepariraju tako da se u tra heju koja je usko priljubljena uz ezofagus uvede elektroda i transmu ralno stimulira traheja. Kao rezultat pomenute stimulacije, kontrahira ju se mišići farinksa.

Nakon preparacije organ se stavi u posudu za izolovane organe koja sadrži 20 ml Tyrodeove otopine. Tyrodeova otopina se zagrijava na 32°C, aerira sa kiseonikom. Pripadajući motorni nerv se uvlači u bipolar nu elektrodu. Kod preparacije izolovanog farinksa se motorni nervi sti muliraju tako da se transmuralno stimulira kranijalni dio traheje, a iz među nerava traheje i mišića farinksa postoji veza i dolazi do kontrak cije mišića farinksa na takvu stimulaciju.

Stimulacija pripadajućih nerava se vrši na dva načina. Prvi način je tetanička stimulacija svake minute u trajanju od jedne sekunde. Pa rametri takve tetaničke stimulacije su 10 Hz, 10 mA, 1 mSek. Drugi na

čin stimulacije je samo jednim kvadratičnim impulsom slijedećih parametara: 10 mA, 1 Hz, 1 mSek, a impuls se ponavlja svakih deset sekundi. Posuda u kojoj se nalazi organ se ispire svakih deset minuta ukoliko se ne ispire učestalije nakon davanja ksenobiotika.

Mišićni dio organa je spojen izometrijskim transducerom. Mjeri se sila mišića. Visina izazvanih kontrakcija se mijenja pod uticajem ksenobiotika ovisno od vrste i koncentracije. Kontrola se vrši prije i poslije dodavanja ksenobiotika, i vrši se upoređivanje. Ksenobiotici koji su injicirani su bili: otapala benzen, ksilol, trihloretilen i soli metala: živin hlorid i olovni acetat.

REZULTATI

Rezultati se mogu podijeliti u opis svojstava nove preparacije i opis djelovanja ksenobiotika.

1. Efekt stimulacije pripadajućih motornih nerava

Efekt stimulacije pripadajućih motornih nerava je kontrakcija izoliranih poprečno prugastih mišića farinksa i jezika. Konstantni električni podražaji u konstantnim intervalima izazivaju podjednake kontrakcije. Kontrakcije su brze i jednofazne. Mogu se ponavljati a da se ne smanji visina izazvanih kontrakcija, ukoliko se stimulacija ponavlja u propisanim intervalima, te ukoliko je oksigenacija obilna. Tetaničke izazvane kontrakcije sa stimulusima od 10 Hz su veće, dulje traju i mogu imati dvofazni karakter, tj. prvo će doći do brze kontrakcije, iza čega slijedi sporija, ali manja kontrakcija. Ukoliko oksigenacija nije dovoljna, relativno brzo će opadati visina izazvanih kontrakcija mišića jezika. Izolovani mišići farinksa su manje osjetljivi na hipoksiju.

2. Uticaj ksenobiotika otapala

Od ksenobiotika otapala su primijenjeni benzen, ksilen i trihloretilen. Benzen će ovisno od koncentracije dovesti prvo do povećanja visine izazvanih kontrakcija oba tipa mišića. Pražna koncentracija kod koje još može da se registruje efekt benzena je 10^{-4} mola. Sa većom koncentracijom benzena se registruju veći efekti. U dvostruko većoj koncentraciji od pražne koncentracije će doći ne samo do povećanja visine izazvanih kontrakcija nego se povećava bazalna linija — tonus. Nakon ispiranja benzena visina izazvanih kontrakcija i bazalna linija se postepeno vraćaju na kontrolne vrijednosti. Ukoliko benzen ostane dulje vremena u posudi za izolirane organe, onda se visina kontrakcija polako vraća na kontrolne vrijednosti, a zatim i ispod kontrolnih vrijednosti. Drugo otapalo upotrijebljeno u ovom radu je bio ksilen, odnosno dimetilbenzen. Za razliku od benzena, ksilen će smanjivati efekt stimulacije pripadajućih nerava. Registrovane su slične promjene bez obzira na oblik stimulacije, tj. nakon tetaničke ili nakon pojedinačne stimulacije. Trihloretilen kao organsko otapalo ima povećavajući uticaj na efekt

stimulacije pripadajućih nerava. Efekt stimulacije motornih nerava farinksa će biti pojačan pod uticajem trihloretilena u koncentraciji 10^{-4} mola. Ukoliko je koncentracija veća, reakcija je dvofazna, tj. poslije početnog povećanja, dolazi do smanjenja efekta stimulacije, tj. do smanjenja visine izazvanih kontrakcija. Djelovanje je isto i sa tetaničkom ili pojedinačnom stimulacijom.

3. Uticaj ksenobiotika metala

Ispitivani su efekti živinih i olovnih soli. Živin hlorid u koncentraciji 10^{-5} mola će povećati visinu izazvanih kontrakcija mišića farinksa i jezika. Uz povećanje visine izazvanih kontrakcija, doći će do povećanja bazalne linije. Ovisno od koncentracije živinih iona, povećanje će biti veće do određene koncentracije od 10^{-3} mola, kad će doći do dvofazne reakcije, tj. kad će od početnog povećanja dolaziti do smanjenja visine izazvanih kontrakcija. Nakon ispiranja, ovisno od koncentracije, će ostati povećana visina kontrakcija ako se radilo o manjim dozama, dok će nakon većih koncentracija (10^{-3} mola), nakon ispiranja doći do paralize efekta nervne stimulacije.

Drugi ispitivani metalni ksenobiotik je bio olovni acetat. Olovo, ovisno od doze, povećava efekt stimulacije motornih nerava. Početna doza, kad se može registrovati efekt olova, je 10^{-5} mola. U većim koncentracijama se registruje dvofazan efekt, tj. prvo će doći do povećanja iza čega slijedi smanjenje efekta stimulacije. Nakon ispiranja efekt stimulacije se sporo vraća na kontrolne vrijednosti.

DISKUSIJA

Opisane su dvije preparacije izolovanih organa iz usne šupljine, i to izolovani mišić jezika i izolovani mišić farinksa koji se sa pripadajućim nervima stavljaju u uslove in vitro, te se na njima vrše ispitivanja ksenobiotika. Radi se o poprečno-prugastim mišićima, čija je neurotransmisija farmakološki nikotinskog tipa i veoma slična neurotransmisiji skeletnih mišića. Nervi su holinergični po tipu somatski nervi. Stimulacijom motornih nerava će se dobiti kontrakcije tetaničkog ili pojedinačnog tipa. Farmaci, toksini i ksenobiotici, ovisno od doze, će povećavati ili smanjivati visinu izazvanih kontrakcija i bazalnu liniju sa koje polaze kontrakcije.

Ksenobiotici, toksini koji se nalaze u okolini, prostoru radne sredine, između ostalih su organska otapala i teški metali. Otapala ispitivana u ovom radu su benzen, ksilen i trihloretilen, a teški metali su soli žive i olova. Pomenuta otpala, posebno benzen i derivati, su poznati kao supstance koje u uslovima in vitro mogu inhibirati enzime, a za metale je poznato da, osim inhibicije enzima, dovode do oslobađanja autakoida i neurotransmitora (R u i s et al., 1988; M c I n t o s h et al., 1989; O u d a r et al., 1989). Povećanje efekta stimulacije pripadajućih nerava u akutnom eksperimentu sa benzenom je vjerovatno rezultat aktivacije protein kinaze C; protein kinaza C je enzim potreban za transdukciju

signala (Da Silva et al., 1989). Benzen je poznati multipotencijalni kancerogen koji u organizam ulazi inhalacijom i oralno (Maltoni et al., 1989).

Što se tiče trihloretilena i sličnih spojeva i njegovog efekta na organe i tkiva, razlikuju se slabometabolizirajući i dobrometabolizirajući solventi. Trihloretilen spada u dobrometabolizirajuće. Za ispitivanje njihovog djelovanja razrađene su posebne metode i modeli (Droz et al., 1989, Opdam and Smolder, 1989). U ovom eksperimentu trihloretilen je djelovao stimulantno na efekt stimulacije pripadajućih nerava. Trihloretilen je hepatokancerogen u mišijoj jetri (Crebelli and Carera, 1989).

Ovisno od doze, soli žive i olova djeluju dvofazno. U manjim koncentracijama će povećati efekt stimulacije nerava, dok će u većim koncentracijama djelovati dvofazno, i to prvo će povećati efekt stimulacije nerava da kasnije dođe do smanjenja. Živa je ksenobiotik i toksin sa kojom stomatolozi imaju čest kontakt. U kosi stomatologa je dva puta više žive nego kod kontrola (Scarlett et al., 1988). Pare žive oštećuju fetuse stomatološkinja (Gelbier and Ingram, 1989). Akutni biološki efekt žive na izoliranim mišićima jezika i farinksa je vjerovatno posljedica inhibicije holinesteraze i ujedno oslobađanja neurotransmitora (Hare et al., 1989).

Danas se mnogo piše o djelovanju olova, toksina koji djeluje na više organa. Posebno se diskutuje da li male doze olova mogu dovesti do zaostalosti djece i starijih (Cory-Slechta et. al., 1989). Drugi tvrde da male doze olova nemaju dokazane veze sa zaostalošću djece (Cooney et al., 1989). Olovni ioni u ovom akutnom eksperimentu su doveli do povećanja efekta stimulacije nerava. Vjerovatno je efekt olova u ovom eksperimentu dijelom bio preko Ca^{++} (Rius et al., 1988).

Izolirani mišići farinksa i jezika su pogodni modeli iz usne šupljine da se na njima može ispitivati djelovanje ksenobiotika. Derivati petroleumske industrije, benzen i slični spojevi se očituju u ovim eksperimentima sa povećanjem efekta stimulacije motornih nerava. Ioni metala također povećavaju efekt stimulacije motornih nerava. Pomenuti model-sistemi mogu dakle poslužiti u analizi toksičnih efekata raznih ksenobiotika.

PHARMACOLOGICAL METHODS IN TOXICOLOGY ON THE ISOLATED INNERVATED ORGANS FROM THE MOUTH

Summary

Isolated and innervated organs from the mouth were prepared. They were strited muscles from the tongue and from the farinx. They were prepared with the motore nerve and set up in an isolated organ bath. The induced contractions were recorded and the xenobiotics-ecotoxins were injected. The toxins were benzen and derivatives, trichlorethilen, mercury and lead. It was found that they increase the effect of nerve stimulation, they increased the height of induced conctractions, depending on concentration. The explanation of the effect was that they inhibit enzymes and they free the neurotransmittors.

LITERATURA

Bielsen, J. B. and Andersen, O.: *Effects of Dose on Intestinal Absorption and Relative Organ Distribution.* Toxicology, 59, 1—10, 1989.

Cooney, G. H., Bell, A., McBride, W., and Carter, C.: *Low-Level Exposures to Lead: The Sydney Lead Study.* Dev. Med. Child Neurol. 31, 640—649, 1989.

Cory-Slechta, D. A., Weiss, B. and Cox, C.: *Tissue Distribution of Pb in Adult vs. Old Rats: A Pilot Study.* Toxicology, 59, 139—150, 1989.

Crebelli, R. and Carera, A.: *Genetic Toxicology of I, I, 2, — trichloroethylene.* Mutat. Res. 221, II—37, 1989.

Da Silva, C., Fan, X. and Castagna, M.: *Benzene-Mediated Protein Kinase C Activation.* Environ. Health Perspect. 82, 91—95, 1989.

Droz, P. O., Wu, M. M. and Cumberland, W. G.: *Variability in Biological Monitoring of Organic Solvent Exposure. II. Application of a Population Physiological Model.* Br. J. Ind. Med., 46, 547—558, 1989.

Gelbier, S. and Ingram, J.: *Possible Foetotoxic Effects of Mercury Vapour: A Case Report.* Public Health, 103, 35—40, 1989.

Hare, M. F., Minnema, D. J., Cooper, G. P. and Michaelson, I. A.: *Effects of Mercuric Chloride on (^3H) dopamine Release From Rat Brain Striatal Synaptosomes.* Toxicol. Appl. Pharmacol. 99, 266—275, 1989.

McIntosh, M. J., Meredith, P. A., Moore, M. R. and Goldberg, A.: *Action of Lead on Neurotransmission in Rats.* Xenobiotica, 19, 101—113, 1989.

Maltoni, C., Ciliberti, A., Cotti, G. et al.: *Benzene, an Experimental Multipotential Carcinogen: Results of the Long-Term Bioassays Performed at the Bologna Institute of Oncology.* Environ. Health Perspect, 82, 109—124, 1989.

Opdam, J. J. G. and Smolders, J. F. J.: *A Method for the Retrospective Estimation of the Individual Respiratory Intake of a Highly and a Poorly Metabolising Solvent During Rest and Physical Exercise.* Br. J. Ind. Med., 46, 250—260, 1989.

Oudar, P., Caillard, L. and Fillion, G.: *The Effects of Inorganic Lead on the Spontaneous and Potassium-Evoked Release of ^3H-5-HT from Rat Cortical Synaptosome Interaction with Calcium.* Pharmacol. Toxicol. 64, 459—463, 1989.

Rius, R. A., Govoni, S., Bergamaschi, S. et al.: *Mechanisms of the Effect of Lead on Brain Neurotransmission: A Calcium Mediated Action.* Sci. Total Environ. 71, 441—448, 1988.

Scarlett, J. M., Gutenmann, W. H. and Lisk, D. J.: *A Study of Mercury in the Hair of Dentists and Dental — Related Professionals in 1985 and Subcohort Comparasion of 1972 and 1985 Mercury Hair Levels.* Toxicol. Environ Health 25, 373—381, 1988.

Zbinden, G. and Gross, F.: *Pharmacological Methods in Toxicology,* Pergamon Press, Oxford, 1979.