

ВМІСТ ДОФАМІНУ, НОРАДРЕНАЛІНУ ТА ЇХ ПОПЕРЕДНИКА ДІОКСИФЕНІЛАЛАНІНУ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ ВПЛИВІ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ НОНІЛФЕНОЛІВ ТА ЇХ ПОХІДНИХ

Д.І. Маракушин

*Харківський національний медичний університет, м. Харків
Кафедра біологічної хімії (зав. - проф. В.І. Жуков)*

Реферат

Мета. Оцінка тривалого перорального впливу оксигетильованих нонілфенолів та їх похідних у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ50 на вміст у головному мозку щурів моноамінів - дофаміну, норадреналіну та їх попередника - діоксифенілаланіну.

Матеріал та методи. У роботі за допомогою хроматографічного та спектрофлуориметричного методів визначений вміст діоксифенілаланіну, дофаміну та норадреналіну у гомогенаті головного мозку щурів на 45-ту добу впливу промислових хімічних забруднювачів довкілля - оксигетильованих нонілфенолів та їх похідних у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ50, що є необхідним для розкриття патофізіологічних механізмів їх дії.

Результати й обговорення. Нонілфеноли з числом оксигетильованих груп 6 і 12 та їх похідні - натрієві солі карбоксиметилатів ізононілфенолів з числом оксигетильованих груп 4, 6 у дозі 1/10 ДЛ50 знижують вміст діоксифенілаланіну, норадреналіну на тлі підвищення дофаміну у головному мозку щурів. Речовини у дозі 1/100 ДЛ50 підвищують рівень дофаміну, норадреналіну на тлі незмінного вмісту діоксифенілаланіну. Доза речовин 1/1000 ДЛ50 не впливає на досліджувані показники.

Висновки. Отримані результати свідчать, що тривалий вплив речовин у дозі 1/10 ДЛ50 призводить до зниження моноамінергічної активності головного мозку щурів. Тривалий вплив речовин у дозі 1/100 ДЛ50, навпаки, викликає її посилення, що дозволяє розглядати це як захисно-компенсаторну реакцію організму.

Ключові слова: оксигетильовані нонілфеноли, щури, головний мозок, діоксифенілаланін, дофамін, норадреналін

Abstract

CONTENT OF DOPAMINE, NORADRENALINE AND THEIR PRECURSOR DIHYDROXYPHENYLALANINE IN THE BRAIN OF RATS UNDER THE LONG-TERM INFLUENCE OF OXYETHYLIZED NONYLPHENOLS AND THEIR DERIVATIVES

D.I. MARAKUSHIN

National Medical University in Kharkov

Aim. The purpose of the study was an estimation of the long-term influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives in doses 1/10, 1/100 and 1/1000 DL50 on the content in the brain of rats of monoamines - dopamine, noradrenaline and their precursor dihydroxyphenylalanine.

Material and Methods. The content of dihydroxyphenylala-

nine, dopamine, noradrenaline in the homogenate of the brain of rats was determined by chromatographic and spectrofluorometric methods on 45th day of the influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives in doses 1/10, 1/100 and 1/1000 DL50, which is necessary for discovery of pathophysiological mechanisms of their action.

Results and Discussion. Nonylphenols with 6 and 12 oxyethylized groups and their derivatives - sodium salts of carboxymethylates of oxyethylized isononylphenols with 4 and 6 oxyethylized groups in a dose 1/10 DL50 decrease the content of dihydroxyphenylalanine, noradrenaline against the rise of dopamine in the brain of rats. The substances in a dose 1/100 DL50 increase the level of dopamine, noradrenaline against the unchanged content of dihydroxyphenylalanine. The dose of substances 1/1000 DL50 does not affect the examined indexes.

Conclusions. The results suggest that the long-term influence of substances in a dose 1/10 DL50 leads to a decrease of monoaminergic activity of the brain of rats. The long-term influence of substances in a dose 1/100 DL50, inversely, causes its strengthening, that allows considering it as a protective and compensatory reaction of the body.

Key words: oxyethylized nonylphenols, rats, brain, dihydroxyphenylalanine, dopamine, noradrenaline

Вступ

У зв'язку з розвитком нових виробничих технологій та значним забрудненням навколишнього середовища останнім часом зростає кількість мало вивчених хімічних впливів на організм, що відрізняються за характером, механізмами, ступенем шкідливої дії з непередбачуваними віддаленими наслідками [1, 2]. Існуючий підхід до оцінки техногенних впливів, як правило, базується на вивченні захворюваності, наданні лікувально-профілактичної допомоги за наявності вже виразної форми патології, що стає недостатнім для збереження здоров'я та попередження несприятливих впливів довкілля [3]. У зв'язку з цим актуальним є з'ясування загальних і специфічних закономірностей найбільш ранніх механізмів пошкоджуючої дії різних екотоксикантів, зокрема ксенобіотиків, виявлення порушень гомеостатичних і захисно-приспосувальних реакцій організму, що призводять до розвитку різних патологічних про-

цесів [4]. Важливу роль у підтримці сталості внутрішнього середовища та формуванні адаптаційних процесів в організмі відіграють моноамінергічні нейромедіаторні системи головного мозку [5].

До розповсюджених забруднювачів довкілля відносяться оксиетильовані нонілфеноли (ОЕНФ) та їх похідні - натрієві солі карбоксиметилатів оксиетильованих ізонілфенолів (КМ-ОЕНФ), які за фізико-хімічними властивостями та особливостями будови молекул належать до іоногенних детергентів. Ці сполуки характеризуються досить значними об'ємами синтезу, широким використанням у різних галузях народного господарства (як основа промислового випуску пластмас, поліуретанів, миючих засобів, емульгаторів, антикорозійних препаратів, гідравлічних та охолоджуючих речовин тощо), надходженням до джерел питного водопостачання та завдяки цьому можливим впливом на організм людини [6, 7].

Метою цього дослідження була оцінка тривалого перорального впливу оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ50 на вміст у головному мозку щурів моноамінів - дофаміну, норадреналіну та їх попередника - діоксифенілаланіну.

Робота виконана у рамках науково-дослідної роботи Харківського національного медичного університету "Вивчення механізмів біологічної дії простих поліефірів у зв'язку з проблемою охорони навколишнього середовища" (номер держреєстрації 0110U001812).

Матеріал і методи

У роботі використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 6, 12 (ОЕНФ_{6,12}) та КМ-ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 4, 6 (КМ-ОЕНФ_{4,6}). Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії WAG, масою (180-220) г. Утримання та маніпуляції над тваринами виконувались відповідно до основних принципів у сфері біоетики. Їх піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 45 діб у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ50. Середньолетальні дози (ДЛ50) складали для ОЕНФ₆ - 4,2 г/кг; ОЕНФ₁₂ - 3,4 г/кг; КМ-ОЕНФ₄ - 6,1 г/кг; КМ-ОЕНФ₆ - 2,2 г/кг маси тіла. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. До-

слідження вмісту моноамінів та їх попередника діоксифенілаланіну (ДОФА) проводили через 45 діб після початку експерименту. У кожній групі було по 15 тварин. Забій проводили шляхом декапітації, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Рівень ДОФА, дофаміну (ДА) та норадреналіну (НА) в головному мозку щурів визначали після виділення хроматографічним методом на колонках з катіонобмінною смолою (Dowex 50Wx4, 200-400 mesh, натрієва форма, параметри колонки d=4 мм, h=75 мм) [8]. Швидкість протікання розчинів через колонки не перевищувала 1 мл/хв. До наважки тканини додавали не менш п'яти об'ємів 0,2 М НСІО₄ з 0,5% ЕДТА, гомогенізували. Гомогенат залишали на 20-30 хв. на холоді, а потім центрифугували. Центрифугат зливали, осад промивали 0,2 М НСІО₄ з 0,5% ЕДТА і знов центрифугували. Центрифугати об'єднували, нейтралізували насиченим розчином Na₂CO₃ до рН 6,0-6,5, пропускали через колонки з наступною послідовною промивкою водою. ДОФА елюїрували 0,1 М натрій-цитратно-фосфатним буфером з 0,2 моль/л NaCl (рН 2,5), далі елюцію проводили цим буфером з рН 4,5. Для елюїрування НА використовували 1 н водну соляну кислоту, а ДА - соляну кислоту в етанолі. Вміст ДОФА визначали на спектрофлюориметрі "Hitachi MPF-4A" при довжині хвилі збудження 330 нм та довжині хвилі люмінесценції 375 нм, ДА - 330/375 нм, НА - 395/485 нм.

Статистичний аналіз даних проводили з використанням комп'ютерного пакета прикладних програм для обробки статистичної інформації Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США). Первинне статистичне опрацювання даних починали з перевірки припущення про відповідність вибірок закону гаусівського розподілу, застосовуючи критерій Шапіро-Вілка. Додатково правильність позитивного висновку щодо нормальності розподілу вибірок контролювали за допомогою коефіцієнтів асиметрії та ексцесу. Кількісні ознаки, що мали нормальний розподіл, описували параметричними характеристиками - середнім значенням показника (M) та середнім квадратичним відхиленням (s); у разі відсутності нормального розподілу непараметричними - медіаною (Me) та інтерквартильним розмахом. Для порівняння двох нормальних розподілів застосовували t-критерій Стьюдента. Якщо принаймні один з розподілів не був нормальним, то для порівняння не-

залежних вибірок застосовували критерій Манна-Уїтні. За критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали $p < 0,05$.

Результати й обговорення

Результати свідчили про статистично значуще ($p < 0,001$), порівняно з контролем, зниження в 1,7 раза рівня ДОФА лише за дії КМ-ОЕНФ₆ у дозі 1/10 ДЛ50 (табл.). Усі інші досліджувані сполуки у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 практично не впливали на рівень цього показника. Вплив ОЕНФ₆, ОЕНФ₁₂ та КМ-ОЕНФ₄ у дозі 1/10 ДЛ50 супроводжувався достовірним ($p < 0,001$), по відношенню до контролю, підвищенням вмісту ДА у головному мозку щурів у середньому в 2 рази. При цьому дія найбільш токсичного серед досліджуваних речовин КМ-ОЕНФ₆, навпаки, призводила до зменшення ($p = 0,002$) рівня ДА майже в 1,4 раза. Тривалий вплив дозою 1/100 ДЛ50 характеризувався статистично значущим ($p < 0,001$), порівняно з контролем, збільшенням рівня ДА у головному мозку експериментальних тварин: найбільш виразним це було для КМ-ОЕНФ₆ (майже в 3 рази), а найменш - для КМ-ОЕНФ₄ (майже в 2 рази).

Залежною від дози речовин була й дина-

міка НА. Так, доза 1/10 ДЛ50 призводила до зменшення ($p < 0,001$) його вмісту: в 4; 2,1; 1,5 і 1,4 раза відповідно за умов дії КМ-ОЕНФ₆, ОЕНФ₁₂, ОЕНФ₆ і КМ-ОЕНФ₄. Вплив ОЕНФ та їх похідних у дозі 1/100 ДЛ50, навпаки, викликав статистично значуще ($p < 0,001$), відносно контролю, зростання у головному мозку щурів рівня НА, найбільш виразне для КМ-ОЕНФ₆ (майже в 3 рази).

Слід підкреслити, що доза 1/1000 ДЛ50 в усіх випадках не виявила будь-яких статистично достовірних змін з боку рівня ДОФА, ДА та НА, тому її можна вважати недіючою.

У цілому отримані результати свідчать, що тривалий вплив ОЕНФ та їх похідних у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 пов'язаний з катехоламінергічними процесами. У випадку дії речовин у дозі 1/10 ДЛ50 у головному мозку щурів виникає відносний дефіцит НА та превалювання ДА, що може бути наслідком зміни активності ферментів їх синтезу та метаболізму, наприклад, зростання активності ДОФА-декарбоксилази та зниження активності дофамін-бета-оксидази. Крім того, проведеними раніше експериментами виявлено формування в організмі щурів тривожно-депресивних станів при інтоксикації ОЕНФ [7]. Їх розви-

Таблиця

Вміст діоксифенілаланіну, дофаміну, норадреналіну у головному мозку щурів на 45-добу впливу оксидетильованих нонілфенолів та їх похідних (нмоль/г тканини; $n = 15$; Ме [25%; 75%] або $M \pm s$)

Показник	Доза, ДЛ50	ОЕНФ ₆	ОЕНФ ₁₂	КМ-ОЕНФ ₆	КМ-ОЕНФ ₄	Контроль
ДОФА	1/10	11,3±3,35 $p = 0,58$	9,5 [7,9; 11,3] $p = 0,15$	7,2±2,04 $p < 0,001$	14,6±3,62 $p = 0,2$	12,5 [8,8; 15,3]
	1/100	14,0±4,15 $p = 0,43$	12,3±4,12 $p = 0,97$	12,9±3,91 $p = 0,69$	12,9 [9,0; 14,2] $p = 0,92$	
	1/1000	13,5±2,34 $p = 0,32$	11,8 [10,0; 14,6] $p = 0,87$	12,5±2,91 $p = 0,66$	13,1±3,04 $p = 0,62$	
Дофамін	1/10	12,3±4,46 $p = 0,001$	13,9 [11,9; 19,0] $p < 0,001$	4,5±1,57 $p = 0,002$	11,3±3,01 $p < 0,001$	6,3 [5,3; 9,8]
	1/100	14,6 [11,9; 18,4] $p < 0,001$	16,9±5,02 $p < 0,001$	18,2±5,25 $p < 0,001$	11,8 [9,4; 12,9] $p < 0,001$	
	1/1000	7,0 [5,3; 9,3] $p = 0,59$	6,2±1,57 $p = 0,263$	5,6±1,27 $p = 0,115$	7,0±1,81 $p = 0,95$	
Норадреналін	1/10	3,1±1,02 $p < 0,001$	2,2±0,73 $p < 0,001$	1,1 [0,5; 1,7] $p < 0,001$	3,3±1,01 $p = 0,001$	4,7 [3,9; 6,8]
	1/100	9,2 [7,0; 14,8] $p < 0,001$	11,0 [8,4; 14,8] $p < 0,001$	14,2 [11,5; 21,0] $p < 0,001$	8,1±1,95 $p < 0,001$	
	1/1000	5,2±1,14 $p = 0,62$	4,2±0,69 $p = 0,1$	5,2±1,02 $p = 0,3$	4,4±1,30 $p = 0,32$	

p - рівень значущості порівняно з контролем

ток, можливо, пов'язаний з виявленими змінами вмісту катехоламінів. Одна з теорій тривожно-депресивних станів, у тому числі й на тлі інтоксикацій, ґрунтується на участі катехоламінінергічних систем головного мозку. Доведено, що саме зниження концентрації норадреналіну та підвищення концентрації дофаміну при стимуляції D₂-рецепторів призводить до дезорганізації ЦНС, розвитку тривожно-депресивних станів [10]. У випадку дії речовин у дозі 1/100 ДЛ50, навпаки, відбувається стимулювання активності клітин, що синтезують НА. При цьому зростання концентрації ДА може відбуватися через активацію α- і β-адренорецепторів. Такий вплив звичайно пов'язують не тільки з безпосередньою стимуляцією цих рецепторів, а також зі здатністю ДА вивільняти НА з гранулярних пресинаптичних депо, тобто оказувати опосередковану адреноміметичну дію [9]. Окремо слід зазначити, що тривалу інтоксикацію організму щурів ОЕНФ та їх похідними слід розглядати як стресову ситуацію, у відповідь на яку формуються адаптивні реакції, провідна роль в яких належить ДА та НА.

Висновки

1. У механізмі тривалої дії оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних - натрієвих солей карбоксиметилатів оксиетильованих ізононілфенолів у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 на організм щурів істотною ланкою є негативний вплив на процеси нейрогуморальної регуляції, що підтверджується розбалансуванням моноамінергічних нейромедіаторних систем головного мозку.
2. Досліджувані речовини на 45-ту добу дії у дозі 1/10 ДЛ50 викликають зниження моноамінергічної активності головного мозку щурів, що підтверджується зменшенням рівня норадреналіну на тлі зростання вмісту дофаміну. За умов тривалого впливу речовин у дозі 1/100 ДЛ50, навпаки, відбувається посилення синтезу дофаміну та норадреналіну, що дозволяє розглядати це як захисно-компенсаторну реакцію організму щурів.
3. Тривалий вплив оксиетильованих нонілфенолів та їх похідних у дозі 1/1000 ДЛ50 не викликає у головному мозку щурів змін вмісту дофаміну, норадреналіну та їх попередника діоксифенілаланіну.

Література

1. Belozeroва S.M. Features of morbidity forming in the conditions of industrial labour and new technologies. *Medicine of labour and industrial ecology* 2011; 3: 13-19. Russian. (Белозерова С.М. Особенности формирования заболеваемости в условиях индустриального труда и новых технологий. *Медицина труда и промышленная экология* 2011; 3: 13-19).
2. Kapranov S.V. Principle chart of the influence of environmental factors on human organism. *Environment and health* 2011; 2: 23-26. Russian. (Капранов С.В. Принципиальная схема влияния факторов среды жизнедеятельности на организм человека. *Довкілля та здоров'я* 2011; 2: 23-26).
3. Gnateyko O.Z., Luk'yanenko N.S. Ecogenetic aspects of human pathology, caused influence of harmful factors of external environment. *Health of child* 2007; 6(9): 15-24. Ukrainian. (Гнатейко О.З., Лук'яненко Н.С. Екогенетичні аспекти патології людини, спричиненої впливом шкідливих факторів зовнішнього середовища. *Здоров'я ребенка* 2007; 6(9): 15-24).
4. Tsudzevich B.O., Stolyar O.B., Kalinina I.V., Yukalo V.G. Xenobiotics: an accumulation, detoxication and elimination from living organisms. Ternopil: Publishing house Ternopil National Ivan Pul'ui Technical University, 2012. - 384 p. Ukrainian. (Цудзевич Б.О., Столяр О.Б., Калініна І.В., Юкало В.Г. Ксенобіотики: накопичення, детоксикація та виведення з живих організмів. Тернопіль: Видавництво ТНТУ ім. І. Пулюя, 2012. - 384 с.).
5. Ismaylova Kh. Yu., Agaev T.M., Semenova T.P. Individual features of behavior: (monoaminergic mechanisms). Baku: Nurlan, 2007. - 228 p. Russian. (Исмайлова Х.Ю., Агаев Т.М., Семенова Т.П. Индивидуальные особенности поведения: (моноаминергические механизмы). Баку: Нурлан, 2007. - 228 с.).
6. Burlaka V.A., Rudenko G.B., Grabar I.G., Biba A.D. Detergents of modernity: technology of production, ecology, economy of the use. Zh.: ZHDTU, 2004. - 745 p. Ukrainian. (Бурлака В.А., Руденко Г.Б., Грабар І.Г., Біба А.Д. Детергенти сучасності: технологія виробництва, екологія, економіка використання. Ж.: ЖДТУ, 2004. - 745 с.).
7. Tsyganenko A. Ya., Zhukov V.I., Scherban' N.G. Scientific bases of ground of prognosis of detergents potential danger in connection with regulation in water of reservoirs. Belgorod, 2001. - 442 p. Russian. (Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Щербань Н.Г. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов. Белгород, 2001. - 442 с.).
8. Atack C, Magnusson T: A procedure for the isolation of noradrenaline (together with adrenaline), dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from the same tissue sample using a single column of strongly acidic cation exchange resin. *Acta pharmacologica et toxicologica* 1978, 42, 35-57.
9. Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. Catecholamins: biochemistry, pharmacology, physiology, clinic. *Questions of medical chemistry* 2002; 48(1): 45-67. Russian. (Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Катехоламины: биохимия, фармакология, физиология, клиника. *Вопросы медицинской химии* 2002; 48(1): 45-67.).
10. Marien M.R., Colpaert F.C., Rosenquist A.C. Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res. Rev.* 2004; 45(1): 38-78.