

УДК 616.831-099-092.9:543.395:577.112.3

*Д.І. Маракушин*

*Харківський національний медичний університет*

## **ВМІСТ НЕЙРОАКТИВНИХ АМІНОКИСЛОТ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ПЕРОРАЛЬНОЇ ДІЇ ОКСИЕТИЛЬОВАНИХ НОНІЛФЕНОЛІВ І ЇХ ПОХІДНИХ**

Досліджено вплив промислових хімічних забруднювачів довкілля – оксиетильованих нонілфенолів і їх похідних у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 на вміст глутамату, аспартату, гліцину та гамма-амінобутирату в гомогенаті головного мозку. Встановлено, що тривалий вплив оксиетильованих нонілфенолів і їх похідних у дозі 1/10 ДЛ50 виснажує адаптаційні резерви через реалізацію ексайтотоксичного ефекту глутамату, накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів, порушення цілісності мембран та внутрішньоклітинного метаболізму. У дозі 1/100 ДЛ50 речовини знижують вміст глутамату, аспартату на тлі підвищення гліцину, гамма-амінобутирату, що свідчить про включення захисно-приспосувальних механізмів в організмі експериментальних тварин.

**Ключові слова:** оксиетильовані нонілфеноли, глутамат, аспартат, гліцин, гамма-амінобутират.

Характерною особливістю сучасного промислового виробництва є наявність значної кількості потенційно небезпечних хімічних сполук, що можуть створювати загрозу здоров'ю людини. При цьому тільки науково обґрунтований підхід до вивчення механізмів дії цих факторів забезпечить вирішення складних завдань у сфері профілактики порушення здоров'я людини [1–3]. До числа високоперспективних хімічних сполук відносяться оксиетильовані нонілфеноли (ОЕНФ) і їх похідні – натрієві солі карбоксиметилатів оксиетильованих ізононілфенолів (КМ-ОЕНФ), які за фізико-хімічними властивостями та особливостями будови молекул належать до іоногенних детергентів. ОЕНФ і їх похідні характеризуються доволі значними об'ємами синтезу, широким використанням у різних галузях народного господарства (як основа промислового випуску пластмас, поліуретанів, мийних засобів, емульгаторів, антикорозійних препаратів, гідравлічних і охолоджуючих речовин тощо), надходженням до джерел питного водопостачання та завдяки цьому можливим впливом на здоров'я людини [4, 5]. Згідно із сучасними даними, особливою чутливістю до ряду хімічних сполук характеризується головний мозок [6–8]. У передачі нервових імпульсів у ЦНС і на периферії

принципово важлива роль належить кільком амінокислотам, одні з яких виконують функцію збуджувальних, інші – гальмівних нейротрансмітерів. До числа перших відносяться кислоти (дикарбонові) амінокислоти глутамат і аспартат, до числа других – гамма-амінобутират і гліцин. Порушення їх вмісту є однією з причин виникнення різних патологічних процесів [9]. Нейротоксичні ефекти ОЕНФ і їх похідних, дані щодо кількісного вмісту збуджувальних і гальмівних амінокислот за умов їх тривалого впливу вивчено недостатньо, а саме їх урахування є необхідним для всебічного розкриття механізмів дії на організм і розробки засобів їх корекції.

Метою даного дослідження було визначення вмісту глутамату, аспартату, гліцину та гамма-амінобутирату в гомогенаті головного мозку щурів за умов тривалого перорального впливу ОЕНФ і їх похідних у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ50.

**Матеріал і методи.** Використано зразки речовин з регламентованими фізико-хімічними характеристиками: ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 4, 10 (ОЕНФ<sub>4,10</sub>) і КМ-ОЕНФ з числом оксиетильованих груп 5 (КМ-ОЕНФ<sub>5</sub>). Експерименти проведено на статевозрілих щурах-самцях лінії WAG масою тіла 180–220 г. Утримання і маніпуляції над тваринами виконували відповідно до основ-

© Д.І. Маракушин, 2015

них принципів у сфері біоетики. Тварин піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами речовин щоденно одноразово протягом 45 діб у дозах 1/10 та 1/100 ДЛ50. Середньолетальні дози (ДЛ50) для ОЕНФ<sub>4</sub> складала 5,8 г/кг, ОЕНФ<sub>10</sub> – 4,3 г/кг, КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> – 2,8 г/кг маси тіла. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Показники оцінювали через 45 діб від початку експерименту. В кожній групі було по 15 тварин. Щурів декапітували, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію. Для отримання гомогенату головного мозку наважку тканини подрібнювали на холоді й гомогенізували протягом 1–2 хв за допомогою скляного гомогенізатора Поттера з тефлоновим товчачиком в охолоджену середовищі виділення, що складалося з 0,32 М сахарози на 0,05 М трис-НСІ буфері, рН=7,4. Співвідношення тканина/середовище (маса/об'єм) складало 1 г/9 мл. Вміст глутамату, аспартату та гліцину в депротейнізованому гомогенаті головного мозку щурів визначали методом рідинної хроматографії на автоматичному аналізаторі типу ААА-339 (Чехія). Для проведення калібрувальних тестів, а також кількісної оцінки хроматограм використовували промислові стандартні розчини амінокислот виробництва фірми «Lachema» (Чехія), що поставляються в наборі реактивів до автоматичного аналізатора амінокислот. Вміст гамма-амінобутирату визначали спектрофлуориметрично після його виділення хроматографічним методом

[10] на колонках з катіонообмінною смолою Dowex 50Wx4, 200-400 mesh, натрієва форма, параметри колонки: d=4 мм, h=75 мм. Після екстракції хлорною кислотою та нейтралізації до рН 3,0 зразок пропускали через колонку; елюювання проводили 0,025 М натрій-цитратним буфером (рН 4,5). Для кількісного визначення гамма-амінобутирату здійснювали реакцію з нінгідрином; флюоресценцію вимірювали при довжині хвилі збудження 380 нм і флюоресценції 450 нм. Отримані дані статистично обробили. Первинне статистичне опрацювання даних починали з перевірки припущення про відповідність вибірок закону гаусівського розподілу ймовірності. Кількісні ознаки, що мали нормальний розподіл, описували параметричними характеристиками, у разі відсутності нормального розподілу – непараметричними – Ме та інтерквартильним розмахом. Застосовували t-критерій Стьюдента, критерій Манна–Уїтні. За критичний рівень значущості приймали  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Отримані дані свідчили, що тривалий вплив ОЕНФ<sub>4</sub>, ОЕНФ<sub>10</sub> та КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> у дозі 1/10 ДЛ50 супроводжувався статистично значущим ( $p < 0,026$ ) порівняно з контролем підвищення вмісту глутамату в головному мозку щурів у середньому в 1,5 раза (таблиця). Дія ОЕНФ<sub>10</sub> і КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> у дозі 1/100 ДЛ50, навпаки, призводила на 45-ту добу спостереження до достовірного зниження рівня глутамату ( $p < 0,014$ ) у середньому в 1,3 раза. Для найменш токсичного ОЕНФ<sub>4</sub> у цій дозі також ви-

*Вміст нейроактивних амінокислот у головному мозку щурів на 45-ту добу впливу оксиетильованих нонілфенолів і їх похідних (мкмоль/г тканини, n=15; Ме [25%; 75%] або M±s)*

Речовина	Доза, ДЛ50	Глутамат	Аспартат	Гліцин	Гамма-амінобутират
ОЕНФ <sub>4</sub>	1/10	11,0 [8,4; 12,0] p=0,026	7,3±1,74 p=0,1	1,8±0,36 p=0,05	0,9 [0,7; 1,2] p=0,025
	1/100	7,2±1,56 p=0,15	5,4±1,26 p=0,062	2,8±0,37 p<0,001	2,6 [2,0; 3,1] p<0,001
ОЕНФ <sub>10</sub>	1/10	12,2 [9,0; 14,5] p=0,007	8,0±1,41 p=0,005	1,9 [1,5; 2,3] p=0,205	0,95±0,28 p=0,002
	1/100	6,9 [4,8; 7,8] p=0,014	5,4 [4,9; 6,2] p=0,065	3,4 [2,9; 4,0] p<0,001	3,0 [2,2; 3,3] p<0,001
КМ-ОЕНФ <sub>5</sub>	1/10	13,2 [10,4; 15,6] p<0,001	9,0±1,61 p<0,001	1,7 [1,5; 2,0] p=0,014	0,7 [0,7; 1,3] p=0,001
	1/100	6,4±1,15 p=0,004	5,2 [4,2; 5,5] p=0,006	3,9±0,73 p<0,001	3,5 [2,8; 3,9] p<0,001
Контроль		8,2±1,71	6,0 [5,3; 7,4]	2,2 [1,7; 2,5]	1,5±0,53

*Примітка.* p – рівень значущості порівняно з контролем.

значалося зменшення концентрації цієї амінокислоти, але воно було недостовірним ( $p=0,15$ ). Що стосується аспартату, то його вміст статистично значуще порівняно з контрольною групою тварин підвищувався лише за умов дії КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> і ОЕНФ<sub>10</sub> у дозі 1/10 ДЛ50 відповідно в 1,5 і 1,3 раза. Вплив ОЕНФ<sub>4</sub> у вказаній дозі виявився недостовірним на вміст цієї нейроактивної амінокислоти ( $p=0,1$ ). Тривале пероральне введення в організм щурів КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> у дозі 1/100 ДЛ50, навпаки, призвело до незначного, але достовірного ( $p=0,006$ ) зниження вмісту цього показника в 1,2 раза. Інші речовини у цій дозі практично не впливали на рівень аспартату в головному мозку щурів.

Залежною від дози речовин була й динаміка змін гальмівних амінокислот – гліцину і гамма-амінобутирату. Так, на 45-ту добу дії КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> у дозі 1/10 ДЛ50 у головному мозку щурів визначалося статистично значуще ( $p=0,014$ ) порівняно з контролем зниження вмісту гліцину в 1,3 раза. Зниження рівня гліцину спостерігалось й за умов тривалого перорального впливу ОЕНФ<sub>4</sub> та ОЕНФ<sub>10</sub> (у середньому в 1,2 раза), але воно було недостовірним ( $p=0,05$  і  $p=0,205$ ). Вплив ОЕНФ і їх похідних у дозі 1/100 ДЛ50, навпаки, викликав статистично значуще ( $p<0,001$ ) відносно контролю зростання рівня гліцину: в 1,8; 1,5 та 1,3 раза відповідно для КМ-ОЕНФ<sub>5</sub>, ОЕНФ<sub>10</sub> та ОЕНФ<sub>4</sub>. Усі досліджувані речовини у дозі 1/10 ДЛ50 викликали зменшення концентрації гамма-амінобутирату: майже в 2 рази у випадку дії КМ-ОЕНФ<sub>5</sub> ( $p=0,001$ ), в 1,6 раза – ОЕНФ<sub>10</sub> ( $p=0,002$ ), в 1,7 раза – ОЕНФ<sub>4</sub> ( $p=0,025$ ). Протилежна динаміка змін спостерігалась для дози 1/100 ДЛ50: підвищення ( $p<0,001$ ) гамма-амінобутирату в 2,3; 2,0; 1,7 раза відповідно для КМ-ОЕНФ<sub>5</sub>, ОЕНФ<sub>10</sub> та ОЕНФ<sub>4</sub>.

Отримані результати свідчать про суттєві зсуви у системі нейроактивних амінокислот, які залежать від дози ОЕНФ і їх похідних. Тривала дія 1/10 ДЛ50 призводить до збільшення вмісту збуджувальних амінокислот на тлі зниження гальмівних. Це опосередковано свідчить про виснаження адаптаційних можливостей організму щурів з розвитком іонного дисбалансу, утворенням вільних радикалів, які сприяють вивільненню надлишкової кількості глутамату пресинаптичними нервовими закінченнями, що може призвести до реалізації його ексайтотоксичного ефекту.

### Література

1. Белозерова С.М. Особенности формирования заболеваемости в условиях индустриального труда и новых технологий / С. М. Белозерова // Медицина труда и промышленная экология. – 2011. – № 3. – С. 13–19.

Сутність останнього полягає в гіперстимуляції медіаторами збудження NMDA-рецепторів, які провокують дилатацію кальцієвих каналів, масивне надходження кальцію в клітини з подальшою активацією протеаз і фосфоліпаз. У результаті цього нейрони й глія становляться об'єктом впливу каскаду нейродеструктивних процесів, що викликають порушення їх структурно-функціональної цілісності [11]. Тривала дія ОЕНФ і їх похідних у дозі 1/100 ДЛ50, навпаки, супроводжується зменшенням вмісту збуджувальних амінокислот на тлі збільшення гальмівних, що опосередковано свідчить про активацію захисно-компенсаторних реакцій організму експериментальних тварин. Як відомо, гальмування обмежує розповсюдження збудження на іншу нервову структуру, попереджує порушення їх нормального функціонування, забезпечує захист організму від ушкоджуючої дії факторів довкілля.

### Висновки

1. Тривалий вплив оксиетильованих нонілфенолів і їх похідних у дозі 1/10 ДЛ50 супроводжується підвищенням у головному мозку щурів вмісту глутамату, аспартату на тлі зниження гліцину, гамма-амінобутирату, що свідчить про виснаження адаптаційних резервів внаслідок реалізації ексайтотоксичного ефекту глутамату, накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів, порушення цілісності мембран та внутрішньоклітинного метаболізму.

2. Тривалий вплив оксиетильованих нонілфенолів і їх похідних у дозі 1/100 ДЛ50, навпаки, супроводжується зниженням вмісту глутамату, аспартату на тлі підвищення гліцину, гамма-амінобутирату, що свідчить про включення захисно-приспосувальних механізмів в організмі експериментальних тварин.

3. Порушення балансу між збуджувальними і гальмівними амінокислотами у головному мозку є однією з патогенетичних ланок механізмів дії оксиетильованих нонілфенолів і їх похідних, що необхідно враховувати при розробці засобів їх корекції.

### Перспективи подальших досліджень.

Планується провести комплекс досліджень, спрямованих на вивчення структурно-функціонального стану клітинних мембран при тривалому впливі оксиетильованих нонілфенолів і їх похідних.

2. Оценка воздействия химического загрязнения окружающей среды как фактора риска для здоровья человека: аналитический обзор / Н.Ю. Келина, Н.В. Безручко, Г.К. Рубцов, С.Н. Чичкин // Вестник ТГПУ. – 2010. – Вып. 3 (93). – С. 156–161.

3. *Аманжол И.А.* Реакция организма на воздействие вредных производственных факторов: оценка профессионального риска / И.А. Аманжол, З.Т. Мухаметжанова, Д.С. Абитаев. – Lambert Academic Publishing, 2013. – 116 с.

4. Детергенти сучасності: технологія виробництва, екологія, економіка використання / В.А. Бурлака, Г.Б. Руденко, І.Г. Грабар, А.Д. Біба. – Житомир: ЖДТУ, 2004. – 745 с.

5. Научные основы обоснования прогноза потенциальной опасности детергентов в связи с регламентацией в воде водоемов / А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, Н.Г. Щербань и др. – Белгород, 2001. – 442 с.

6. *Тарских М.М.* Исследование нейротоксичности акрилатов в эксперименте и у рабочих акрилонитрильного производства / М.М. Тарских, Л.Г. Климацкая, С.И. Колесников // Бюл. Восточно-Сибирского научного центра. – 2012. – № 3 (85), Ч. 2. – С. 316–318.

7. *Наконечная О.А.* Влияние простых полиэфиров на ультраструктуру головного мозга крыс / О.А. Наконечная, В.И. Жуков, С.А. Стеценко // Современный научный вестник. – 2010. – № 12 (94). – С. 82–87.

8. 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. – С. 29–32.

9. *Кертис Д.Р.* Аминокислотные нейромедиаторы / Д.Р. Кертис // Фармакология и токсикология. – 1999. – Т. 52, № 6. – С. 4–18.

10. *Carmona F.* Purification of GABA on small columns of DOWEX 50W, combination with a method for separation of biogenic amines / F. Carmona, C. Gomes, G. Trolin // Acta Pharmacol. et Toxicol. – 1980. – Vol. 46. – P. 235–240.

11. *Хижняк А.А.* Участие возбуждающих аминокислотных трансмисмиттеров в механизмах нейродеструкции и перспективные методы патогенетической коррекции / А.А. Хижняк // Біль, знеболювання, інтенсивна терапія. – 2003. – № 1. – С. 43–46.

#### *Д.И. Маракушин*

#### **СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ПЕРОРАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ОКСИЭТИЛИРОВАННЫХ НОНИЛФЕНОЛОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ**

Исследовано влияние промышленных химических загрязнителей окружающей среды – оксиэтилированных нонилфенолов и их производных в дозах 1/10 и 1/100 ДЛ50 на содержание глутамата, аспартата, глицина и гамма-аминобутирата в гомогенате головного мозга. Установлено, что длительное влияние оксиэтилированных нонилфенолов и их производных в дозе 1/10 ДЛ50 истощает адаптационные резервы через реализацию эксайтотоксического эффекта глутамата, накопление продуктов перекисного окисления липидов, нарушение целостности мембран и внутриклеточного метаболизма. В дозе 1/100 ДЛ50 вещества снижают содержание глутамата, аспартата на фоне повышения глицина, гамма-аминобутирата, что свидетельствует о включении защитно-приспособительных механизмов в организме экспериментальных животных.

**Ключевые слова:** оксиэтилированные нонилфенолы, глутамат, аспарат, глицин, гамма-аминобутират.

#### *D.I. Marakushin*

#### **CONTENT OF NEUROACTIVE AMINO ACIDS IN THE BRAIN OF RATS IN CONDITIONS OF THE LONG-TERM PERORAL ACTION OF OXYETHYLIZED NONYLPHENOLS AND THEIR DERIVATIVES**

The influence of industrial chemical contaminants of environment – oxyethylized nonylphenols and their derivatives was investigated at doses of 1/10 and 1/100 DL50 on content of glutamate, aspartate, glycine and gamma-aminobutyric acid in homogenate of the brain. It was established, that long-term influence of oxyethylized nonylphenols and their derivatives at a dose of 1/10 DL50 exhausts of adaptative reserves by realization of excitotoxic effect of glutamate, accumulation of LPO products, disturbance of membrane integrity and intracellular metabolism. At a dose of 1/100 DL50 compounds decrease content of glutamate, aspartate on a background of the increase of glycine and gamma-aminobutyric acid, that testifies about the activation of protective adaptive mechanisms in the organism of experimental animals.

**Key words:** oxyethylized nonylphenols, glutamate, aspartate, glycine, gamma-aminobutyric acid.

Поступила 13.02.15