

НЕЙРОАКТИВНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В СРЕДНЕМ МОЗГЕ КРЫСЯТ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ДИНИЛОМ И СВИНЦОМ

В.М. Шейбак, И.В. Лях, Е.М. Дорошенко

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Установлено, что как раздельное, так и совместное хроническое введение крысятам динила и ацетата свинца в дозах 5 и 30 мг/кг массы, соответственно, ежедневно в течение 1 месяца, вызывает изменения концентраций свободных аминокислот в среднем мозге. Дисбаланс аминокислотного фонда в большей степени выражен у крысят, получавших ацетат свинца, по сравнению с получавшими динил. Совместное поступление этих соединений приводит к гораздо более выраженным изменениям структуры аминокислотного фонда и изменяет соотношения между возбуждающими и тормозными нейроактивными аминокислотами в среднем мозге крысят.

Ключевые слова: динил, свинец, аминокислоты, средний мозг, крысята.

Введение

Негативное действие ароматических углеводородов на организм не вызывает сомнений. В то же время степень опасности для здоровья такого широко распространенного в промышленности углеводорода, как динил (смесь 25% дифенила и 75% дифенилоксида), недостаточно изучена [8,13]. Динил представляет собой светлоричную жидкость с резким характерным запахом, нерастворимую в воде [1], основным применением которой является использование в производственных установках при производстве химических волокон в качестве теплопереносящей жидкости. Вдыхание паров динила приводит к раздражению верхних дыхательных путей [2]. Особенно опасным считается попадание динила на кожные покровы [5] или в глаза [6]. Массовые отравления динилом происходят при выбросах его в атмосферу, особенно при авариях. Информации о воздействии динила на растущий организм в доступной литературе не обнаружено.

Около 90% свинца, присутствующего в атмосфере, — это свинец антропогенного происхождения [14]. Рост автомобильного и интенсивность применения антидетонаторов, содержащих тетраэтилсвинец или тетраметилсвинец, достигли такой степени, что в настоящее время автомобильный транспорт стал основным источником загрязнения окружающей среды свинцом [2]. Наиболее чувствительными к повышенному поступлению свинца в организм являются растущие организмы. Наиболее активно свинец аккумулируется в организме детей, попадая из воздуха, воды или пыли [7].

Ранее нами было установлено, что при длительном поступлении в организм динила в дозе 5 мг/кг массы в течение 2-х недель у крыс формируется адаптация, что проявляется постепенной нормализацией уровней биогенных аминов в мозге по сравнению с существенными изменениями через 24 ч после его однократного введения в дозах 5 и 500 мг/кг [11]. Также было показано, что совместное введение динила и свинца (5 и 30 мг/кг массы, соответственно), вызывает изменения концентраций производных тирозина и триптофана в среднем мозге и в стриатуме, тогда как гипоталамус оказался более устойчивым [10,12]. Вероятно, к данным ксенобиотикам особую чувствительность должна проявлять нервная ткань растущего организма, в которой преобладают процессы формирования нейрохимических механизмов регуляции, связанных с адаптацией к воздействиям неблагоприятных факторов.

Поскольку, помимо биогенных аминов, ряд аминокислот в головном мозге обладает нейротрансмиссивными функциями, целью данной работы явился анализ

аминокислотного спектра в среднем мозге крысят, подвергавшихся воздействию динила и свинца.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на 37 самцах крыс в возрасте 1 месяц массой 50-65 г. Животных разделили на 4 группы. 1-й группе животных (n=9) внутривенно вводили масляную эмульсию динила в дозе 5 мг/кг массы в сутки. Животным 2-й группы (n=9) вводили внутривенно свинец в дозе 30 мг/кг массы, в виде водного раствора ацетата свинца (54 мг/л). Крысы 3-й группы (n=10) получали свинец и динил в аналогичных концентрациях. Контрольным крысам (n=9) вводили эквивалентное количество воды. Через 24 ч после последнего введения крысы декапитировали и выделяли средний мозг. Его фиксировали в жидком азоте и хранили до исследования. Определение уровней свободных аминокислот и их производных проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [9]. При проведении эксперимента соблюдались правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. Статистическую обработку полученного материала проводили с помощью t-критерия Стьюдента в пакете прикладных программ Statistica 7.0, и полученные данные выражали как $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

Данные о структуре аминокислотного фонда в среднем мозге представлены в таблице 1. Хроническое поступление в организм крысят динила несколько снижает содержание заменимых аминокислот, которое обусловлено как уменьшением суммарного уровня заменимых аминокислот, так и их относительного количества. Напротив, в среднем мозге крысят, получавших ацетат свинца, изменений аминокислотного фонда не выявлено. Комбинированное введение животным этих соединений вызвало выраженный дисбаланс аминокислотного фонда в среднем мозге, характеризующийся изменением практически всех расчетных показателей (табл.1). Особенно существенно снизилось абсолютное и относительное содержание заменимых аминокислот. Повышение содержания тормозных нейроактивных аминокислот привело к снижению коэффициента возбуждающие/тормозные аминокислоты (ВАК/ТАК).

Анализ индивидуальных концентраций свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов показал, что в среднем мозге крысят, получавших динил, снижены концентрации аспартата и амидов ВАК — аспарагина и глутамина. Содержание триптофана повысилось (табл. 2). В среднем мозге крысят, получавших свинец, ниже

контрольных значений, регистрировались концентрации глицина, изолейцина, гистидина и триптофана (табл. 2). Пропорционально снились уровни этаноламина и фосфоэтанололамина, в то время как коэффициент их соотношения не изменился.

Таблица 1 – Изменения показателей и структуры аминокислотного фонда в среднем мозге крысят при раздельном и совместном введении внутривенно в течение 30 дней динила и свинца в дозах 5 и 30 мг/кг массы, соответственно.

Показатели	Контроль	Динил	Свинец	Динил+Сви
Заменимые аминокислоты, нмоль/г	24109±80	22204±46	22660±96	22059±471*
Заменимые аминокислоты (%)	73±0,4	71±0,7*	73±0,7	67±0,9***
Заменимые/незаменимые	17±1	14±0,7*	16±1,3	15±0,6
Ароматические аминокислоты, нмоль/г	358±33	381±18	374±12	259±13**
Ароматические аминокислоты (%)	1,1±0,1	1,2±0,06	1,2±0,04	0,8±0,04**
Ароматические (%) от общего количества незаменимых аминокислот	26±3	24±1	27±2	18±1*
Протеиногенные аминокислоты, нмоль/г	25546±82	23765±44	24084±94	23536±470*
Протеиногенные аминокислоты (%)	77,2±0,4	76±0,6	78±0,6	72±0,9***
Непротеиногенные аминокислоты, нмоль/г	7525±230	7487±245	6986±339	9204±466**
Непротеиногенные аминокислоты (%)	23±0,4	24±0,6	22±0,6	28±0,9***
Протеиногенные/непротеиногенные	3,4±0,07	3,2±0,11	3,5±0,12	2,6±0,11***
АРУЦ/ААК	0,9±0,08	0,8±0,05	0,7±0,04	1,1±0,08*
Фенилаланин/тирозин	1,3±0,12	1,4±0,07	1,1±0,07	0,9±0,07*
Глутамин+глутамат	17264±67	15680±43	16453±70	14927±386*
Тормозные аминокислоты (ТАК), нмоль/г	6308±166	6269±132	5865±286	7064±203*
Возбуждающие аминокислоты (ВАК), нмоль/г	9965±250	9329±194	9428±451	8850±458
ВАК/ТАК	1,6±0,03	1,5±0,05	1,6±0,1	1,3±0,09**

Примечание: в этой и других таблицах * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой животных

Таблица 2 – Изменения концентраций свободных аминокислот в среднем мозге крысят (нмоль/г ткани) при раздельном и совместном введении внутривенно в течение 30 дней динила и свинца в дозах 5 и 30 мг/кг массы, соответственно.

Показатели	Контроль	Динил	Свинец	Динил+Свинец
Аспаргат	3397±109	3031±61**	2914±276	3393±259
Глутамат	6568±165	6299±204	6513±257	5457±405*
Аспарагин	108±8	88±4*	121±26	67±2***
Глутамин	10696±544	9381±314*	9940±467	9470±211*
Гистидин	51±3,6	55±4,7	120±8,3***	114,4±12,8***
Глицин	1842±43	1942±59	1657±63*	2270±123**
Фосфоэтанололамин	348±6	335±12	224±18***	202±22***
Этанололамин	353±37	525±84	237±36*	329±11
Цистатионин	47±6,4	45±3,6	31±5,4	66±4,4**
Триптофан	67±5	80±3,1*	20±8,5***	7,9±0,9***
Изолейцин	82±4,2	86±2,9	51±6,3**	59±6,3*
Лейцин	92±6,3	94±5,4	102±5,1	124±5,2**
Гидроксипролин	193±23	230±13	156±40	1475±382**
Лизин	521±37	580±44	454±26	660±31*

Наибольшие сдвиги в аминокислотном спектре среднего мозга выявлены у крысят, получающих комбинацию динила и ацетата свинца. Аминокислотный дисбаланс проявлялся снижением уровней глутамата, аспарагина, глутамина, триптофана и изолейцина, а также увеличением концентраций гистидина, глицина, лейцина и лизина. Необходимо отметить, что глутамат является основной возбуждающей нейроактивной аминокислотой в ткани мозга, тогда как глицин обладает свойствами тормозного нейромедиатора. Таким образом, количественный анализ изменений нейроактивных аминокислот показывает, что комбинированное введение динила и свинца приводит к более выраженным нарушениям, чем их раздельное поступление (двенадцать показателей при комбинированном применении против трех при введении динила и пяти - свинца) (табл. 2). Уменьшение количества аспарагина и глутамина было особенно выраженным при введении динила совместно с ацетатом свинца. Это может указывать на уменьшение связывания аммиака в мозге [4]. Уровень триптофана, возраставший при введении динила, был существенно ниже контрольных значений во 2-й группе и еще более уменьшался при совместном введении крысятам ацетата свинца и динила. Интересно, что в этой опытной группе концентрация гидроксипролина гораздо выше, чем в других группах животных. Известно, что повышенное содержание этого

соединения считается маркером повреждения соединительной ткани [6] (табл. 2).

После анализа корреляционных связей, указывающих на вклад отдельных аминокислот в процессы возбуждения и торможения в ЦНС, очевидно, что введение динила, отдельно, и при его комбинации с ацетатом свинца снижало вклад глицина в тормозную нейромедиацию. Введение только ацетата свинца не вызывало подобных изменений. Аналогичная метаболическая ситуация регистрируется и в отношении аспартата. При совместном введении динила и ацетата свинца появляется отрицательная корреляционная взаимосвязь между суммарным количеством возбуждающих аминокислот и глицином. Кроме того, значения индекса ВАК/ТАК положительно коррелируют с уровнями глутамата у животных, получавших динил или динил в комбинации со свинцом, и отрицательно - с уровнем ГАМК в группе животных, получавших только динил (табл. 3).

Таблица 3 - Коэффициенты корреляции уровней отдельных нейротрансмиттерных аминокислот с их суммарными показателями в среднем мозге крысят при раздельном и совместном введении внутривенно в течение 30 дней динила и свинца в дозах 5 и 30 мг/кг массы, соответственно.

Группы	ТАК				ВАК				ВАК/ТАК			
	Асп	Глу	Гли	ГАМК	Асп	Глу	Гли	ГАМК	Асп	Глу	Гли	ГАМК
Контроль	0,7	0,58	0,75*	0,98*	0,86*	0,94*	0,58	0,66	0,13	0,41	-0,27	-0,47
Динил	0,34	-0,14	0,52	0,9*	-0,005	0,95*	0,46	-0,29	-0,21	0,74*	-0,05	-0,83*
Свинец	0,39	-0,004	0,91*	0,99*	0,86*	0,83*	0,32	0,2	0,36	0,71	-0,48	-0,63
Динил+Свинец	-0,12	-0,45	0,56	0,80*	0,48	0,83*	-0,8*	0,01	0,38	0,8*	-0,84*	-0,32

Корреляции отдельных аминокислот в среднем мозге крысят, получавших динил, характеризуются исчезновением ранее существующих и появлением новых связей, что свидетельствует об изменении общего метаболического фона. Еще в большей степени регистрируется метаболический дисбаланс в среднем мозге крысят, получавших свинец. В группе животных, получавших оба соединения, наряду с исчезновением положительных корреляционных индексов, наблюдается возникновение новых как положительных, так и отрицательных корреляционных взаимосвязей, причем большинство исчезнувших положительных связей затрагивают две аминокислоты – глицин и глутамин (аспаргат-глицин, глутамат-глутамин, глутамин-ГАМК, глутамин-фенилаланин, глицин-этанололамин, глицин-фенилаланин), появившиеся же связи включали в себя глицин и глутамат (глутамат-глицин, серин-глицин, глицин-фосфоэтанололамин, глутамат-фосфоэтанололамин, глутамат-серин) (табл. 4).

Таблица 4 - Коэффициенты корреляции уровней отдельных нейротрансмиттерных аминокислот и их производных в среднем мозге крысят (представлены только достоверные данные).

Показатели	Контроль	Динил	Свинец	Динил+Свинец
Аспаргат-глутамин	0,71*	0,2	0,53	0,65*
Аспаргат-глицин	0,81*	-0,16	0,5	-0,03
Глутамат-серин	0,2	0,1	0,88*	0,72*
Глутамат-глутамин	0,75*	0,36	0,89*	-0,35
Глутамат-глицин	0,34	0,48	0,03	-0,89*
Глутамат-фосфоэтанололамин	0,67	0,58	0,25	0,88*
Глутамат-таурин	0,57	0,5	0,87*	-0,16
Серин-глутамин	0,25	0,31	0,86*	0,15
Серин-глицин	0,69	0,47	0,38	-0,69*
Серин-таурин	0,06	0,41	0,81*	0,13
Серин-этанололамин	0,35	0,72*	0,34	0,39
Глутамин-треонин	0,42	-0,68*	-0,12	0,29
Глутамин-таурин	0,32	-0,18	0,81*	0,2
Глутамин-ГАМК	0,78*	0,16	0,25	0,14
Глутамин-тирозин	0,69	0,75*	0,51	0,59
Глутамин-фенилаланин	0,86*	0,37	0,15	0,3
Глицин-фосфоэтанололамин	-0,12	0,15	0,89*	-0,87*
Глицин-таурин	0,11	0,88*	-0,05	0,36
Глицин-ГАМК	0,6	0,09	0,86*	-0,06
Глицин-этанололамин	0,79*	0,41	0,79*	-0,23
Глицин-фенилаланин	0,83*	0,15	0,76*	0,08
Фосфоэтанололамин-ГАМК	0,23	0,1	0,76*	0,06
Фосфоэтанололамин-этанололамин	-0,47	0,46	0,83*	0,31
Треонин-тирозин	-0,18	-0,78*	-0,38	-0,12
Тирозин-этанололамин	-0,14	0,43	0,81*	0,58
Тирозин-фенилаланин	0,5	0,81*	0,65	0,57
Этанололамин-фенилаланин	0,6	0,47	0,85*	0,5

Заключение

Как раздельное, так и комбинированное внутрижелудочное введение ежедневно в течение 30 дней динила и ацетата свинца в дозах 5 и 30 мг/кг массы, соответственно, вызывает изменения спектра аминокислот в среднем мозге крысят. Ацетат свинца вызывает более выраженный дисбаланс аминокислотного фонда, чем динил. В то же время совместное поступление этих соединений в организм крысят приводит к гораздо более выраженным изменениям, чем их раздельное введение, как в отношении структуры аминокислотного фонда, так и дисбаланса концентраций индивидуальных аминокислот. Учитывая функции, выполняемые средним мозгом, как одним из отделов ЦНС, выявленные нами изменения аминокислотного баланса могут иметь неблагоприятные последствия для контролируемых средним мозгом физиологических функций организма.

Список использованной литературы

1. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). Phenyl ether va por. In: TLVs® and other occupational exposure values - 1999. Cincinnati OH, USA: ACGIH®, 1999.
2. Duzgoren-Aydin, N.S. Sources and characteristics of lead pollution in the urban environment of Guangzhou / Sci Total Environ. - 2007. - Vol. 385(1-3) - P. 182-195.
3. Hefner, R.E. Repeated inhalation toxicity of diphenyl oxide in experimental animals / RE Jr Hefner, BKJ Leong, RJ Kociba, et al. / Toxicol Appl Pharmacol. - 1975. - Vol. 33, - P. 78-86.
4. Kanamatsu, T. Effects of ammonia on the anaplerotic pathway and amino acid metabolism in the brain: an ex vivo ¹³C NMR spectroscopic study of rats after administering [2-¹³C] / T. Kanamatsu, Y. Tsukada / Brain Research. - 1999. - Vol. 841(1-2), - P. 11-19.
5. Opdyke, DLJ. Fragrance raw materials. Diphenyl oxide / DLJ Opdyke // Food Cosmet Toxicol. - 1974. - Vol. 12, - P. 707.
6. Riggs, B.L., Melton L.J. eds. Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management / B.L. Riggs, L.J. Melton, 2000; P. - 345-362.
7. Wang, C. Impact of lead pollution in environment on children's health in Shenyang City / C Wang, H Ouyang, J Wang, J Liu, X Zhang, Y Wang, / Academic journal of the first medical collage of PLA. - 2003. - Vol. 24(5), - P. 17-22.
8. Артамонова, В.Г. Интоксикация ароматическими углеводородами / В.Г. Артамонова, Н.А. Мухин // Профессиональные болезни: учебник / В.Г. Артамонова, Н.А. Мухин. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2004. - Гл. 3 - С. 279-292
9. Дорошенко, Е.М. Методологические аспекты и трудности анализа свободных (физиологических) аминокислот и родственных соединений в биологических жидкостях и тканях / Е.М. Дорошенко // Сборник тезисов Республиканской научной конференции по аналитической химии с международным участием «Аналитика РБ-2010». - 2010. - С. 126.
10. Лях, И.В. Влияние совместного и раздельного хронического введения свинца и динила на уровень катехоламинов в мозге крыс: возможность коррекции нарушений препаратом «тауцинк» / И. В. Лях // тезисы докладов конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора И. П. Протасевича. - 2010. - С.264.
11. Лях, И.В. Влияние хронического и острого воздействия динилом на уровень биогенных аминов в мозге крыс / И. В. Лях // сборник научных статей в двух частях «Наука -2010». - 2010. ч. 2, - С.17-19
12. Лях, И.В. Изменение уровней индоламинов в мозге крыс при совместном и раздельном введении свинца и динила: возможность коррекции нарушений препаратом «тауцинк» / И. В. Лях // тезисы докладов конференции студентов и молодых ученых, посвященной памяти профессора И. П. Протасевича. - 2010. - С.265.
13. Нарушения липидного обмена у работников нефтеперерабатывающих предприятий / В.А. Чепурнов [и др.]. // Медицинский академический журнал. - 2005. - Т. 5, № 1. - С. 105-119
14. Нищий, Р.А. Некоторые методологические аспекты гигиенической оценки окружающей среды / Р.А. Нищий, З.К. Султанбеков // Здравоохран. Казахстана. -1996. -№1.

NEUROACTIVE AMINOACIDS IN THE MIDBRAIN OF INFANT RATS IN CHRONIC INTOXICATION WITH DINIL AND LEAD

V.M. Sheibak, I.V. Lyakh, Ye.M. Doroshenko

Educational Establishment «Grodno State Medical University»

It has been found that both separate and combined chronic one-month's daily administration of dinil and lead acetate in the doses of 5 and 30 mg / kg respectively, to infant rats cause changes in the concentrations of free amino acids in the midbrain. Amino acid fund imbalance is the more pronounced in rats treated with lead acetate, than in dinil administration. Combined intake of these compounds leads to much more pronounced changes in the structure of amino acid fund in the midbrain of infant rats and alters the balance between excitatory and inhibitory neuroactive amino acids.

Key words: dinil, lead, amino acids, midbrain, infant rats.

Поступила 02.12.2011