

Активность Гексокиназы Головного Мозга Белых Крыс При Воздействии Легколетучих Фракций Нефти Месторождения «Чыраг»

С.Н. Баба-заде, Т.М. Агаев

Институт физиологии им. А.И.Гараева НАНА, ул. Шариф-заде, 2, Баку AZ 1100, Азербайджан

Исследовано влияние легколетучих фракций нефти месторождения «Чыраг» в концентрации 500, 750 и 1000 мг/м³ на активность гексокиназы различных участков головного мозга белых крыс. Установлено, что при концентрации 1000 мг/м³ эти фракции меняют активность фермента. Нахождение отравленных нефтепродуктами животных в нормальных условиях вивария в течение 30 дней не восстанавливает полностью активность гексокиназы.

Ключевые слова: Гексокиназа, головной мозг, гипоксия

ВВЕДЕНИЕ

В связи с увеличением добычи нефти в Азербайджане резко возросли объемы ее транспортировки, хранения и переработки. Эти факторы вкпе со значительным ростом числа автомобилей и автозаправочных станций неизбежно ведут к увеличению загрязненности окружающей среды нефтепродуктами. Уже в 80-тые годы прошлого столетия было показано, что летучие фракции нефти и пары бензина в человеческом организме воздействуют, в первую очередь, на головной мозг, что может привести к клинической и гистологической нейропатии (Krasavage et al., 1980). В экспериментах на животных установлено, что воздействие гексана (основного компонента бензина) приводит к атрофическим изменениям тимуса и селезенки, нарушениям лимфатических узлов (Singh, 1986). В литературе имеются данные, согласно которым гексан приводит к набуханию аксонов, к дегенеративным изменениям миелиновых оболочек, вплоть до их полного разрушения (Damestra, 1978; Jorgenson, 1981). Пары бензина действуют на половую и эндокринную систему животных (Матысяк, 1968). Продолжительное воздействие гексана на человека приводит к отказу периферийной нервной системы, в тяжелых случаях наступает атрофия мышц скелета и поражение краниального нерва, например, нарушение зрения и нечувствительность лица. Во многих случаях наблюдается денервация и дегенерация нервных окончаний (Гудман и Гилман, 2006). Метаболизм гексана происходит, в основном, в печени, в ее микросомной фракции. Сначала идет окисление при участии цитохрома P-450, цитохрома B5 и НАДФН-зависимой редуктазы. Через почки выделяются метаболиты гексана.: 2-гексанол, 2,5-гексан-дион. Считается, что нейротоксическое

действие гексан оказывает за счет его превращения в организме в нейротоксин 2,5-гександион (Iwasaki and Tsuruta, 1984). Нейротоксичность 2,5-гександиона в 38 раз выше, чем у гексана (Abou-Donia, 1990). Подавляющее большинство работ по выявлению действия нефти, бензина или гексана на организм человека и животных были выполнены в 70-80-ые годы XX века. Однако, в последующие годы внимание исследователей было направлено на изучение действия нефти на флору и фауну морей и океанов. Лишь недавно в литературе вновь появилось несколько работ ученых, посвященных изучению токсичности гексана, который является одним из основных компонентов летучих фракций нефти (Kutlu, 2009; Yang, 2006; Бекеева, 2013). Механизм действия гексана на биохимические процессы, протекающие в головном мозге животных, практически не изучен. Гексокиназа (КФ 2.7.1.1), являющаяся первым ферментом и одним из регуляторов процесса гликолиза, катализирует перенос фосфатной группы АТФ на глюкозу и превращает ее в глюкозо-6-фосфат, который в дальнейшем используется для получения энергии при гликолизе, а также в пентозофосфатном цикле и т. д.

Целью данной работы является изучение влияния легколетучих фракций нефти на активность гексокиназы некоторых участков коры и отделов головного мозга белых крыс. Данная работа может представлять определенный интерес для специалистов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на 30-ти беспородных белых крысах-самцах 6-ти месячного возраста. Животные были разделены на 5 групп по 6 голов в каждой. Опыты проводились в

герметичной камере объемом 200 л, снабженной вентилятором, искусственным освещением и регенератором кислорода (пероксид натрия) при температуре 25°C. Токсичная среда (концентрации 500, 750, 1000 мг/м³) создавалась путем испарения сырой нефти месторождения «Чыраг», содержащей 8,0-8,2% легколетучих фракций (Самедова, 2002). В экспериментах использовалась нефть этого месторождения, поскольку она менее токсична, чем нефть месторождений «Гюняшли» и «Нефть дашлары» и, следовательно, полученные при ее использовании данные с большой долей вероятности можно отнести и к более токсичным сортам нефти. После достижения нужной концентрации газообразных углеводородов в камеру помещались экспериментальные животные на время эксперимента. Контрольные животные такое же время находились в камере с чистым воздухом. По завершении эксперимента животные немедленно декапитировали, извлекали головной мозг и отделяли необходимые структуры и участки коры по атласу (Светухин, 1968). Ткани гомогенизировали в 0,25 М сахарозе в соотношении 1:9, центрифугировали 20 минут при 5000g, а затем при 20000g в течение 30 мин для осаждения митохондрий и в надосадочной жидкости определяли активность гексокиназы (Biochemica information, 1973). За единицу активности фермента принимали количество белка, катализирующее перенос 1 мкмоль фосфата с АТФ на глюкозу. Количество белка определяли по методу Брэкфорда (Филипович, 1982). Статистический анализ результатов исследования проводили с учетом общепринятого критерия Стьюдента ($p < 0,05$) (Ллойд, Ледерман, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Для проведения экспериментов требовалось определить оптимальную для наших опытов концентрацию паров нефти. В СССР ПДК бензина для человека была равна 300 мг/м³, в США ПДК гексана - 180 мг/м³. Средне-смертельная концентрация гексана для половозрелых белых крыс была определена как 150000 мг/м³. При концентрации 100000 мг/м³ животные выживали, но находились в боковом положении (Jorgenson and Cohr, 1981). В подострых экспериментах по ингаляционному влиянию гексана на крыс в течение 16–17 недель (4 месяца), по 4 часа ежедневно 5 дней в неделю применялась доза 300 мг/м³ (Бекеева, 2010). Учитывая все эти данные, было исследовано влияние летучих при температуре 25°C фракций нефти концентраций 500; 750 и 1000 мг/м³ в течение 1 часа

на активность гексокиназы. Результаты экспериментов показаны на (Рис. 1.) Как видно из (Рис. 1,) летучие фракции при концентрациях 500 и 750 мг/м³ незначительно влияют на активность гексокиназы и эти изменения статистически недостоверны ($p > 0,05$). При 1000 мг/м³ активность гексокиназы в 2–4 раза возрастает ($p < 0,001$). Из литературных источников известно, что при высоких концентрациях гексана (выше 1700 мг/м³) может развиваться жировая дегенерация эпителиальных клеток альвеол (Bolt, 2003).

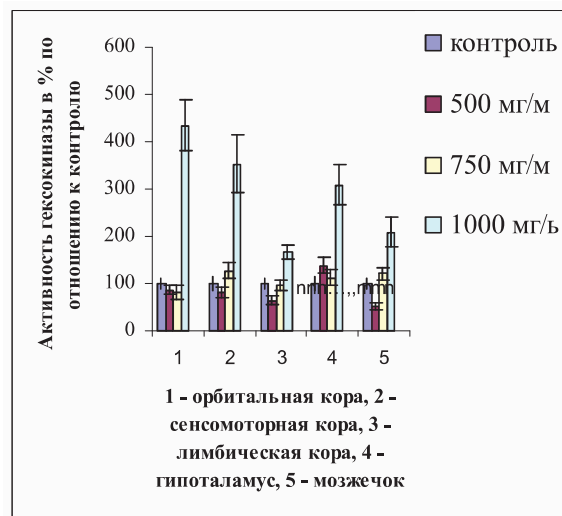


Рис. 1. Активность гексокиназы в зависимости от концентрации летучих фракций нефти.

Учитывая эти факторы, последующие эксперименты проводились при концентрации летучих фракций равной 1000 мг/м³. Из литературы известно, что насыщение гексаном крови, головного мозга, надпочечников, почек и селезенки наблюдается через 4-5 ч (Rickart and Baker, 1981). В связи с этим, была определена активность гексокиназы в головном мозге крыс, которые находились в камере с летучими фракциями нефти в течение 1; 2; 4 и 6 часов. Результаты опытов показаны на (Рис. 2). Из рис. 2 видно, что в первый час нахождения в токсичной среде наблюдается значительный подъем активности гексокиназы во всех исследованных тканях ($p < 0,001$). Во втором временном интервале во всех тканях, за исключением лимбической коры, в основном, наблюдается тенденция к снижению ферментативной активности, хотя она все еще превышает активность контроля. Интересно отметить, что в гипоталамусе активность гексокиназы снижается до уровня контроля ($p < 0,001$). Надо отметить, что изменения активности гексокиназы в сенсомоторной, лимбической коре и мозжечке статистически недостоверны ($p > 0,5$). 4-х часовое пребывание жи-

вотных в загрязненной атмосфере не изменило активность фермента в сенсомоторной, лимбической коре, гипоталамусе и мозжечке по сравнению с 2-мя часами ($p > 0,05$). Лишь в орбитальной коре снижение ферментативной активности достоверно ($p < 0,01$). 6-ти часовое пребывание животных в загрязненной атмосфере привело к заметному снижению активности фермента. В гипоталамусе активность гекокиназы ниже, а в мозжечке и лимбической коре находится на уровне контроля ($p < 0,05$).

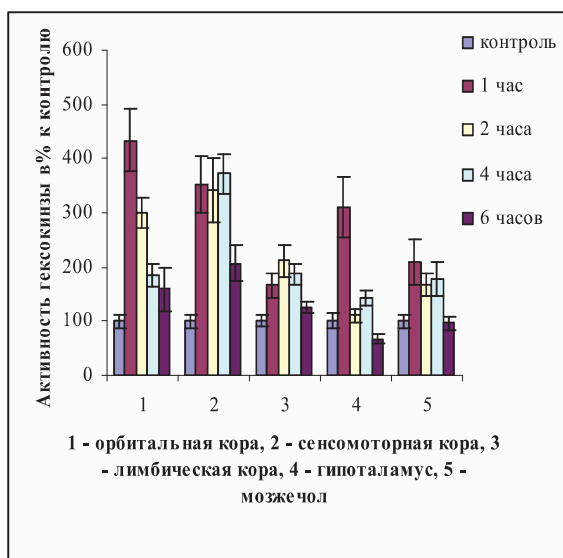


Рис.2. Активность гекокиназы в зависимости от времени пребывания в камере, содержащей летучие фракции нефти (1000 мг/м^3)

В сенсомоторной коре, хоть и наблюдается, по сравнению с предшествующими интервалами времени снижение, активность фермента все еще значительно превышает контроль ($p < 0,01$). Полученные данные показывают, что наиболее сильное влияние летучие фракции нефти оказывают в начальный период пребывания в токсичной среде, а увеличение времени воздействия этих фракций до 6-ти часов приводит, в какой-то степени, к адаптации, нормализации активности фермента. В литературе есть работы, согласно которым гексан снижает объемную долю капилляров в легочной ткани за счет значительного (на 80%) уменьшения диаметра капилляров (Бекеева, 2013), а это приводит к дефициту кислорода, т.е. к гипоксии. Пары бензина и гексана обладают наркотическим действием (Filsler, 1987) и поэтому локальный мозговой кровоток снижается, что также приводит к гипоксии. Первым ответом организма на гипоксию является синтез фактора HIF-1, который регулирует транскрипцию генов, кодирующих некоторые ферменты гликолиза, в частности, гекокиназу

(Semnza et al., 2006) и переход организма на анаэробный путь гликолиза. Увеличение активности гекокиназы при одночасовом пребывании в токсичной среде можно объяснить действием HIF-1 фактора. Однако, анаэробный гликолиз довольно быстро приводит к накоплению молочной кислоты, снижению активности ферментов гликолиза и возникновению ацидоза. Из рис. 2 видно, что участки коры и мозжечок более чувствительны к действиям летучих фракций нефти, чем гипоталамус, что подтверждается работами некоторых авторов (Боголепов и др., 1975; Andersen et al., 1990). На основании результатов этих экспериментов и данных других исследователей можно предположить, что одним из отрицательных последствий легколетучих фракций нефти является гипоксия. Необходимо отметить, что действие гексана не ограничивается только гипоксией. Известно, что 2,5-гександион, основной метаболит гексана в организме, токсичнее гексана. Это связано с тем, что он способен ковалентно связываться не с сульфгидрильными группами белков, а с их ε-амино-группами (Doyle, 1980). Было установлено, что 2,5-гександион легко реагирует с ε-аминогруппой лизина белков нейрофиламентов, вызывает их агрегацию и утолщение аксонов (De Carpio, 1987) и именно 2,5-гександион несет ответственность за развитие полинейропатии (Couri and Milks, 1982). Особенностью отравления человека гексаном является то, что вызванные им функциональные нарушения (гексауглеродная полиневропатия) прогрессируют в течение 2-3 месяцев после прекращения воздействия гексана, восстановление протекает длительно; даже через год после исключения контакта с гексаном редко происходит полное восстановление организма. Возможно, это связано с трудностью отщепления ковалентно связанного с белками 2,5-гександиона, расщеплением деградировавших белков и их новым синтезом.

Для выявления обратимости или необратимости действия летучих фракций нефти на активность гекокиназы была проведена серия опытов. Для этого 20 крыс были разделены на 5 групп: контроль вивария, контроль летучих фракций и три опытные группы. Все группы, кроме контроля вивария, подвергались воздействию летучих фракций нефти в концентрации 1000 мг/м^3 в течение 4-х часов. Контрольные животные по окончании эксперимента немедленно, а опытные крысы после содержания в нормальных условиях вивария в течение 10-ти, 20-ти и 30-ти дней декапитировали и определяли активность гекокиназы в исследуемых тканях головного мозга. Результаты опытов показаны на (Рис. 3.). Установлено, что в сенсомо-

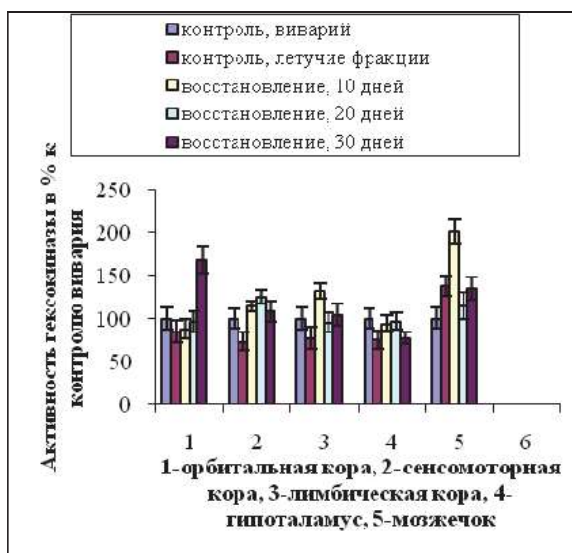


Рис. 3. Активность гексокиназы в зависимости от продолжительности от времени восстановления.

торной коре и гипоталамусе через 10 и 20 дней после действия компонентов нефти активность фермента незначительно отличается от контроля вивария, причем эти различия статистически недостоверны ($p > 0,05$). В лимбической коре ($p < 0,05$) и, особенно, в мозжечке ($p < 0,001$) активность фермента увеличивается. На 30-ый день восстановления активность гексокиназы резко возрастает в орбитальной коре ($p < 0,001$) и мозжечке ($p < 0,05$). Следовательно, можно утверждать, что нахождение в нормальных условиях вивария в течение 30 дней после контакта с летучими фракциями нефти не вернуло организм крыс к норме.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что летучие фракции нефти изменяют активность гексокиназы в исследованных участках и отделах головного мозга и эти изменения носят долговременный характер.

ЛИТЕРАТУРА

- Боголепов Н.Н., Доведова Е.Л., Жильцова А.В. (1975) Изменения объема и ультраструктуры синапсом и митохондрий коры больших полушарий под влиянием экспериментальной гипоксии. *Функционально структурные основы системной деятельности и механизмы пластичности мозга*, вып.4: 9-18.
- Бекеева С.А. (2010) Поведенческая активность крыс при ингаляционном воздействии гексана. *Хабаровск - Вестник ЕНУ им. Л.Н. Гумилева*, №4: 419-424
- Бекеева С.А., Шинетова Л.Е. (2013) Морфо-

логическая оценка дыхательной системы крыс при воздействии паров гексана. *Международная научно-практическая конференция «Валихановские Чтения – 17, 24-26 апреля*, 6: 123-134.

- Клиническая фармакология по Гудману и Гилману** (2006), Клиническая фармакология по Гудману и Гилману в четырех томах (Под общ. ред. А.Г.Гилмана). М.: Практика.
- Матысяк В.Г. (1968) Влияние паров бензина на функциональную деятельность гипофиза, надпочечников и яичников белых крыс в эксперименте. *Гигиена и санитария*, 33(2): 98.
- Самедова Ф.И. (2002) Азербайджанские нефти и их компонентный состав. Баку: Элм, 247 с.
- Светухин В.М. (1968) Цикоархетоника новой коры головного мозга в отряде грызунов. *Архив анатомии, эмбриологии и гистологии*, 42(№2): 31-45.
- Филипович Ю.Б. (1982) Практикум по общей биохимии. 2-е изд., перераб. М.: Просвещение, 311 с.
- Ллойд Э., Ледерман У. (1990) Справочник по прикладной статистике. 2-й том. М.: с. 526.
- Abou-Donia M.B., Hu Z.H., Lapadula D.M. (1991) Mechanisms of joint neurotoxicity of n-hexane, methyl isobutyl ketone and O-ethyl O-4-nitrophenyl phenylphospho-nothioate in hens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257(1): 282-289.
- Abou-Donia M.B., Bower I.H., Makkway H.A. (1990) Adsorption, distribution, excretion and metabolism of single oral dose of [^{14}C]tri-o-crexyl phosphate (ТОСР) in the male rat. *Toxicology*, 65: 65-73.
- Baker T.S., Rickert D.E. (1981) Dose-dependent uptake, distribution, and elimination of inhaled n-hexane in the Fischer-344 rat. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 61: 414-422.
- Bolt H.M., Roos P.H., Thier R. (2003) The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 76(3): 74-185.
- DeCaprio A.P., Olajos E.J., Weber P. (1982) Covalent binding of a neurotoxic n-hexane metabolite: conversion of primary amines to substituted pyrrole adducts by 2,5-hexanedione. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 65(3): 440-50.
- Couri D., Milks M. (1982) Toxicity and metabolism of the neurotoxic hexacarbons n-hexane, 2-hexanone, and 2,5-hexanedione. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22: 145-166.
- Damstra T. (1978) Specific Hexane effect in neurosis system in rats and rabbits. *Yale J. Biological & Med.*, 51(4): 457-468.
- Jorgenson H., Cohr W. (1981) n-Hexane and its

- toxicologic effects: A review. *Scand. J. Work Environ. and Health.*, **7(3)**: 129-168.
- Doyle G.G.** (1980) Hexane neuropathy proposal for pathogenesis of a hazard of occupational exposure and inhalant abuse. *Chem. -Biol. Interact.*, **32(3)**: 339-345.
- Filser J.G., Peter H., Bolt H.M., Fedtke N.** (1987) Pharmacokinetics of the neurotoxin n-hexane in rat and man. *Arch Toxicol.*, **60(1-3)**: 77-80.
- Iwasaki K., Tsuruta H.** (1984) Molecular mechanism of hexane neuropathy: signify-cant differences in pharmacokinetics between 2.3- 2.4- and 2.5-hexanedione. *Ind. Health*, **22(3)**: 177-187.
- Krasavage W.J., O.Donoghue J., Di Vincenzo G.D., Terhaar C.J.** (1980) The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites. *Toxicol. And Appl. Pharmacol.*, **52(3)**: 433-441.
- Kutlu G., Gomceli Y.B., Sonmez T., Inan L.E.** (2009) Peripheral neuropathy and visual evoked potential changes in workers exposed to n-hexane. *J. Clin. Neurosci.*, **16(10)**: 1296-1299.
- Rickart D.E., Baker T.S., Chism J.P.** (1981) Analytical approaches to the study of the disposition of metabolic agents. *Environ. Health Perspect.*, **39**: 5-10.
- Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M., Wang G.L.** (2006) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Experimental Biology*, **209**: 3851-3864.
- Singh K.P.** (1986) Hexane effect to thymus, spleen and lymphatic status in rats and mouse. *Indian J. Experimental Biology*, **35(21)**: 371-377.
- Yang Y.G., Huang Z.X., Cheng X.** (2006) Lung, liver and kidney impairment caused by inhalation of normal hexane. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. **24(5)**: 292-294.

“Çırağ” Yatağı Nefti Yünqül Uçucu Fraksiyalarının Ağ Siçovulların Baş Beyin Heksokinaza Fermentinin Fəallığına Təsiri

S.N. Baba-zadə, T.M. Ağayev

AMEA A.İ.Qarayev adına Fiziologiya İnstitutu

Ağ siçovulların baş beyinin müxtəlif nayilərinin heksokinazasına qatılığı 500, 750 və 1000 mq/m³ olan “Çırağ” yatağı neftinin yünqül uçan fraksiyalarının təsiri öyrənilmişdir. Müəyyən olmuşdur ki, bu təsir fermentin fəallığını dəyişir. Neft məhsulları ilə zəhərlənmiş heyvanları 30 gün ərzində normal vivari şəraitində saxlanması heksokinazanın fəallığını tam bərpa etmir.

Ключевые слова: *Heksokinaza, baş beyin, hipoksiya*

Hexokinase Activity Of Brain Cells Of Albino Rats Exposed To Highly Volatile Oil Fractions From Deposit "Chirag"

S.N. Baba-zadə, T.M. Ağayev

Institute of Physiology named after A.I. Garayev, ANAS

The effect of highly volatile oil fractions at concentrations of 500, 750 and 1000 mg/m³ from “Chirag” deposit on hexokinase activity in different parts of brain of white rats has been studied. It was revealed that these fractions changed the enzyme activity at the concentration of 1000 mg/m³. Hexokinase activity was not completely recovered in oil poisoned animals under normal conditions of the vivarium during 30 days.

Ключевые слова: *Hexokinase, brain (cerebrum), hypoxia*