

В. Г. МХИТАРЯН

ВЛИЯНИЕ ХЛОРОПРЕНА НА ХОЛИНЭСТЕРАЗНУЮ
АКТИВНОСТЬ МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС

Сообщение 10

У рабочих на производстве хлоропрена помимо изменений со стороны желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, сердечно-сосудистой системы, состава крови и кожных покровов наблюдается весьма выраженная ваготония, а также значительное нарушение нервной деятельности [1, 2, 3]. Головная боль, тяжесть в голове, головокружение, раздражительность, нарушение сна, ослабление памяти, рассеянность и т. п. являются частыми признаками хлоропреновой интоксикации.

У обследованных больных, занятых на производстве хлоропренового каучука, в большинстве случаев было обнаружено расстройство со стороны центральной нервной системы, в том числе выраженная неврастения и вегетативный невроз.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что хлоропрен является далеко не безвредным промышленным ядом для организма и особенно для центральной нервной системы, и поэтому всестороннее изучение его действия на организм приобретает исключительно важное значение как для выработки эффективных мер профилактики, так и для лечения хлоропренового токсикоза.

Наши многочисленные исследования [4, 5, 6] показали, что при хлоропреновой интоксикации нарушаются также многие процессы обмена веществ. В дальнейшем нами было установлено, что хлоропрен действует угнетающе на активность некоторых ферментов, причем особенно сильно понижается активность тиоловых ферментов.

Согласно литературным данным и нашим наблюдениям, одним из первых характерных признаков интоксикации рабочих на производстве хлоропренового каучука является низкое кровяное давление—гипотония. Подобное явление у подопытных животных под действием хлоропрена наблюдали Эттинген и сотрудники [17], а также и другие. По мнению Эттингена и сотрудников, наблюдаемое понижение кровяного давления обусловлено в основном расширением (возможно пассивным) сосудов живота.

Однако, нам кажется, что подобное объяснение далеко полностью раскрывает причины гипотонии у рабочих при хлоропреновой интоксикации. На основании многочисленных исследований, мы нашли возможным причиной гипотонии считать нарушение метаболизма некоторых нейрогуморов, в частности адреналина и ацетилхолина. Наши исследования показали, что длительное воздействие хлоропре-

на на организм человека и животных приводит к резкому снижению количества аскорбиновой кислоты как в органах животных, так и в крови у рабочих. Количество восстановленного глутатиона также снижается за счет повышения содержания его окисленной формы. Резкое снижение в организме естественных стабилизаторов адреналина не могло не отразиться и на его окислении.

Поставленные в этом направлении опыты показали, что длительное отравление животных хлоропреном приводит к заметному снижению содержания катехоламинов в крови, при этом повышается количество их дегидроформы. Не исключается также возможность образования и некоторых необратимо окисленных форм, которые, как известно, имеют сосудорасширяющее действие. Полученные данные позволяют заключить, что одним из возможных механизмов гипотонии при хлоропреновой интоксикации является недостаточность в катехоламинах. У подопытных животных надпочечники увеличиваются в объеме и вес их повышается. Подобные изменения в надпочечниках у подопытных животных под действием хлоропрена наблюдал и Роубал [8], который установил дегенеративные изменения как корковой, так и мозговой части надпочечников. Эти изменения в надпочечниках приводят к нарушению его функции, что сказывается на симпатической нервной системе и снижает ее тонус.

Известно, что симпатическая нервная система играет важную роль в регуляции активности холинэстеразы и тем самым в количестве ацетилхолина. Ацетилхолин играет важную роль в процессах торможения центральной нервной системы. Действия ряда веществ, угнетающих функцию центральной нервной системы, связывают с их тормозящим действием на активность холинэстеразы.

В 1928 г. Платтнер и Галлер [9] и затем Бернгейм и Бернгейм [10], Михельсон [11] и др. установили, что наркотики угнетают холинэстеразную активность. В дальнейшем этот вопрос весьма подробно изучал Михельсон [12] и установил параллелизм между действием различных наркотиков и их способностью угнетать холинэстеразу.

По данным В. З. Закусова [13], хлоропрен обладает наркотическим действием. Поэтому не без основания можно было предполагать о возможном влиянии хлоропрена на некоторые звенья ацетилхолинового метаболизма. С целью выяснения этого вопроса мы сочли целесообразным изучить активность холинэстеразы. Это диктовалось не только тем, что хлоропрен обладает наркотическим действием и может ингибировать активность холинэстеразы, но еще и тем, что хлоропрен согласно нашим данным [14, 15, 16], а также Флеш и Гольдстон [17], угнетает тиоловые ферменты, к которым ряд авторов причисляет и холинэстеразу.

Впервые в 1939 году Нахманзон и Ледерер [18] высказали предположение, что для холинэстеразной активности сульфгидрильные группы имеют существенное значение. Они показали, что холинэстеразная активность тормозится малеиновой кислотой и окисленным

глутатионом, способным превращать SH группы в S—S группу. Было установлено, что реактивы, способные более или менее специфично реагировать с сульфгидрильными группами, также тормозят ферментативную активность холинэстеразы. В дальнейшем тиоловая природа холинэстеразы была подтверждена Барроном и Зингером [19], Томпсоном [20] и др.

Одновременно с ингибиторами были найдены также активаторы холинэстеразы. Кизер [21] установил, что холинэстераза крови активируется глутатионом, симпатолом. Нахманзон и Ледерер показали, что холинэстераза активируется восстановленным глутатионом, а также цистеином.

Гранцнер [22], Рубино [23], Фроммел, Гершберг и Пикуст [24] и др. нашли, что аскорбиновая кислота *in vitro* активирует холинэстеразу крови. В дальнейшем это положение рядом авторов отвергалось. Однако сравнительно недавние исследования Партени, Корняку и Попеску [25] вновь подтвердили активирующее действие аскорбиновой кислоты на холинэстеразную активность.

Со временем число как активаторов, так и особенно ингибиторов холинэстеразы исключительно возросло. Среди ингибиторов оказались вещества, принадлежащие к различным классам органических соединений [26, 27 и др.]. С другой стороны, наличие таких сильных ингибиторов холинэстеразы, как эзерин, проэзерин, стрихнин, диизопрропилфторфосфат, а также целый ряд других веществ, являющихся неспецифическими реагентами на сульфгидрильную группу, вызывало сомнения в отношении тиоловой природы холинэстеразы. Поэтому ряд авторов считает, что для холинэстеразной активности имеют значение и другие функциональные активные группы.

На основании своих исследований Маунтер и Уайттекер [29], Марквардт [28,30], Харгривс [31] пришли к выводу, что холинэстеразная активность не находится в тесной зависимости от сульфгидрильных групп.

Следовательно, о природе активных центров холинэстеразы, в том числе и роли сульфгидрильных групп, имеются противоречивые данные. Тем не менее для нас представлял интерес вопрос выяснения изменения активности холинэстеразы под действием хлоропрена, который, согласно нашим данным, заметно сильно угнетает целый ряд тиоловых ферментов. Следует также отметить, что изменения в активности холинэстеразы представляют несомненный интерес в интерпретации определенных нервных нарушений, возникающих под действием хлоропрена.

Методика. Постановка опытов в основном такая же, как в предыдущих исследованиях [14, 15]. Затравка крыс хлоропреном производилась ингаляционным методом, при расчетной концентрации 8 мг на литр с экспозицией 2 ч. Одна группа крыс отравлялась в течение 90 дней, другая — 180 дней. Холинэстеразная активность определялась манометрическим способом в аппарате Варбурга по методу Дюбуа и Мангун [33].

После обезглавливания крыс, быстро извлекался мозг из черепной коробки, освобождался от оболочек и сосудов и на торсионных весах бралось 500 мг ткани. Затем навеска по частям помещалась в гомогенизатор, содержащий 1 мл кребс-рингербикарбонатного буфера (без CaCl_2) и на холоду гомогенизировалась до получения однородной массы. Полученный гомогенат переливался в цилиндр (объем 20 мл) и после гомогенизации всей навески его объем буфером доводился до 17 мл.

После энергичного перемешивания гомогената из него брался 1,7 мл (50 мг ткани) и вносился в главное пространство сосудиков Варбурга, а в боковой резервуар отмеривалось по 0,3 мл 0,1 мл раствора ацетилхолин хлорида и по 1 мл кребс-рингербикарбонатного буфера.

Таким образом, конечный объем реакционной смеси в сосудиках составлял 3 мл. Для каждого опыта одновременно бралось 5—6 сосудиков, через них в течение 5 мин. пропускалась газовая смесь (5% CO_2 и 95% N_2), затем краны манометров закрывались и помещались в термостат при 37°. После выравнивания температуры и давления во внутри сосудиков, субстрат из бокового резервуара переливался в главное пространство сосудика, содержащего гомогенат и в течение 30 мин. с пятиминутным интервалом регистрировалось количество выделившегося углекислого газа.

Данные, приведенные в соответствующих таблицах, являются средними данными 5—6 сосудиков. Активность холинэстеразы выражалась количеством выделившегося CO_2 в мкл в течение первых 10 мин. для 50 мг ткани. Согласно данным Дюбуа и Мангун, холинэстеразная активность мозга у нормальных крыс составляет в среднем 102 мкл CO_2 .

В наших исследованиях, как видно из данных табл. 1, активность холинэстеразы мозга у контрольных крыс колеблется от 95,3 до 123 мкл в среднем составляет 109 мкл, что хорошо совпадает с литературными данными. Активность холинэстеразы мозга у подопытных крыс под действием хлоропрена понижается. Как видно из данных табл. 2, активность холинэстеразы мозга у крыс, находившихся 90 дней в атмосфере 8 мг/л хлоропрена при двухчасовой экспозиции, колеблется в пределах 83,3—93,4 мкл CO_2 и в среднем составляет 88,6 мкл CO_2 . По сравнению с контрольными крысами у этой группы крыс холинэстеразная активность мозга понижена на 19,3%.

Удлинение сроков отравления крыс с 90 дней до 180 приводит к еще большему снижению холинэстеразной активности. Однако снижение и у этой группы крыс выражено сравнительно слабо.

Так, например, из данных табл. 3 видно, что холинэстеразная активность понижается в отдельных случаях до 67,8 мкл CO_2 . Она колеблется большей частью в пределах 75—85 мкл и достигает в отдельных случаях до 90,4 мкл CO_2 . У этой группы крыс холинэстеразная активность мозга составляет в среднем 80,4 мкл CO_2 , а по сравнению с контрольной группой крыс понижена на 26,8%. Таким обра-

Таблица 1

Активность холинэстеразы мозга у контрольных крыс

Дата опытов	Пол	Вес живот- ных	Kh ¹⁰ ₅₀ мкл СО ₂
2.IV.54	♂ ♂	170	123,2
3.IV.54		200	108,09
5.IV.54		185	101,00
7.IV.54		175	111,72
8.IV.54		195	101,02
10.IV.54		200	105,03
12.IV.54		185	108,8
10.V.54		150	95,3
12.V.54		135	100,3
14.V.54		170	106,9
15.V.54		210	104,7
17.V.54		120	103,6
18.V.54		180	111,2
20.X.54		150	115,7
21.X.54		156	108,8
22.X.54		150	112,6
23.X.54		170	113,9
25.X.54		160	117,7
26.X.54		150	116,3
27.X.54		155	107,5
28.X.54	180	118,4	
29.X.54	130	121,8	
5.XI.54	160	112,9	

M ± m 109,8 ± 1,46

Пределы колебания 95,3—123,2

σ 7,03

Таблица 2

Действие хлоропрена на активность холинэстеразы мозга у крыс, находившихся 90 дней в атмосфере 8 мг/л хлоропрена при 2-часовой экспозиции

Дата опытов	Пол	Вес живот- ных	Kh ¹⁰ ₅₀ мкл СО ₂
19.XI.54	♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂	185	93,4
20.XI.54		220	83,3
23.XI.54		250	90,5
25.XI.54		200	91,8
27.XI.54		195	84,3
28.XI.54		215	88,2

M ± m 88,6 ± 1,5

Пределы колебания 83,3—93,4

σ ± 3,75

зом, тормозящее действие хлоропрена на холинэстеразную активность выражено значительно слабее, чем в отношении тиоловых ферментов.

Нашими исследованиями было установлено, что значительная часть тиоловых ферментов (сукциндегидраза, ксантиноксидаза, АТФ-аза, кислая и щелочная фосфатазы) является весьма чувствительной к хлоропрену и, что их активность снижается от 40 до 75%, между тем как холинэстеразная активность угнетается от 19 до 26%. По-видимому, это обусловлено тем, что для холинэстеразной активности сульфгидрильные группы не имеют столь существенного значения; ее тиоловая природа в настоящее время отвергается рядом авторов.

Таблица 3

Действие хлоропрена на активность холинэстеразы мозга у крыс, находившихся 180 дней в атмосфере 8 мг/л хлоропрена при 2-часовой экспозиции

Дата опыта	Пол	Вес животных	Kh ₁₀ 50 мкл СО ₂
14.IV.54	♂♂	210	87,3
15.IV.54		230	82,2
17.IV.54		210	69,8
19.IV.54		200	90,4
21.IV.54		205	77,3
22.IV.54		180	76,8
23.IV.54		200	80,4
24.IV.54		220	67,8
26.IV.54		200	73,8
28.IV.54		215	82,1
29.IV.54		200	87,1
4.V.54		185	82,1
6.V.54		180	89,0

$M \pm m$ 80.4 ± 1.9

Пределы колебания 67.8—90.4

σ 6.09

Несмотря на то, что при хлоропреновой интоксикации холинэстеразная активность мозга угнетена не особенно сильно, тем не менее наблюдаемое снижение холинэстеразы отражается на обмене ацетилхолина, приводит к повышению его количества в организме. Сравнительно недавно, при обследовании рабочих хлоропреновых цехов, Е. И. Гаспарян обнаружила у них в крови резкое снижение холинэстеразной активности и значительное увеличение количества ацетилхолина. Эти данные частично расходятся с нашими. Возможно объясняется это тем, что, как известно из литературы, холинэстераза сыворотки человека инактивируется вообще значительно легче, чем холинэстераза мозга. По-видимому, снижение холинэстеразной активности большей частью обусловлено не прямым действием хлоропрена на фермент, как это имеет место в отношении тиоловых ферментов, а косвенным. Возможно при этом имеет значение и гиповитаминоз С, который, как установлено нами, наблюдается в организме животных,

а также у рабочих при хлоропреновой интоксикации. Такая интерпретация обоснована литературными данными, согласно которым холинэстераза активируется аскорбиновой кислотой и, наоборот, тормозится продуктами ее окисления.

В связи со снижением холинэстеразной активности количество ацетилхолина в организме увеличивается, что сказывается как на центральной, так и особенно на вегетативной нервной системе. Учитывая литературные данные о том, что у лиц, страдающих ваготонией, холинэстеразная активность понижена, мы допускаем, что одной из возможных причин ваготонии, наблюдаемой при хлоропреновой интоксикации, является низкая холинэстеразная активность. Однако кроме изменений в содержании ацетилхолина, мы придаем значение и катехоламинам, уровень которых в крови, как показали наши дальнейшие исследования, понижается при хлоропреновой интоксикации.

В ы в о д ы

1. Холинэстеразная активность мозга белых крыс угнетается значительно слабее, чем другие тиоловые ферменты.
2. У крыс, находившихся в атмосфере 8 мг/л хлоропрена при двухчасовой экспозиции в течение 90 дней, наблюдается снижение активности холинэстеразы мозга на 19,3%.
3. У крыс, находившихся в атмосфере 8 мг/л хлоропрена при двухчасовой экспозиции в течение 180 дней, холинэстеразная активность мозга подавляется на 26,8%.
4. Одной из причин ваготонии, наблюдаемой при хлоропреновой интоксикации, является снижение холинэстеразной активности.

Кафедра биохимии
Ереванского медицинского института

Поступило 6.XII 1960 г.

Վ. Կ. ՄԵԻՔԱՐՅԱՆ

ՔԼՈՐՈՊՐԵՆԻ ԱԶԻՆՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱԻՆԵՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂԻ ԽՈՒՆԷՍԻԵՐԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Աշխատության նպատակն է պարզել քլորոպրենի ազդեցությունը ուղեղի խորինէսթերազային ակտիվության վրա:

Փորձերը դրվել են երկու խումբ առնետների վրա, որոնցից մեկ խումբը 90, իսկ մյուսը 180 օր, օրական երկու ժամ պահվել են հատուկ կամերայում, որտեղ քլորոպրենի խտությունը օդում եղել է 8 մգ/լ:

Ստացված արդյունքը ցույց են տալիս, որ քլորոպրենի ազդեցության տակ առնետների ուղեղի խորինէսթերազային ակտիվությունը թիուլային ֆերմենտների համեմատությամբ իջնում է ավելի քիչ:

Փորձի պարմաններում գտնվող առնետների մոտ (90 օր) ուղեղի խորինէսթերազային ակտիվությունն իջնում է 19,3%-ով:

Թունալորման տեղութիւնը մինչև 180 օրվա հասնելու դեպքում նրա ակտիվութիւնն ավելի է իջնում, հասնելով $26,8^{\circ}/\text{օ}^{\circ}\text{ր}$:

Վիրոպրենի կաուչուկի արդյունաբերութիւնում աշխատող բանվորների մոտ նկատուող վաղատոնիալի պատճառներից մեկը ցածր խոլինէսթերազալին ակտիվութիւնն է:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nyström A. E. Acta Medica Scand. Supp. 219, 1948.
2. Велькович Б. Г. Сб. клинико-гигиенические исследования по токсическим веществам, применяемым в новых производствах. Вып. 2, 114, 1940.
3. Авакян В. М., Гаспарян Е. И. и Аветисян Н. О. и Григорян Э. М. Материалы XVI выезд. науч. сессии Ермединститута, 1958.
4. Мхитарян В. Г. Тезисы докладов Второго Закавказского съезда физиологов, биохимиков и фармакологов, Тбилиси, 1956.
5. Мхитарян В. Г. Известия АН АрмССР (биолог. науки), том XIII, 2, 27, 1960.
6. Мхитарян В. Г. Изв. АН АрмССР (биолог. науки), том XIII, 10, 1960.
7. Oettingen W., Hueper W., Deichmann and oth. J. Industr. Hyg. and Toxicol. 18, 240, 1936.
8. Roubal S. Sbornik lekarsky 44, 63, 1942.
9. Plattner F. and O. Dalehr. Arch. f. d. Ges. Physiol. 220, 606, 1928.
10. Bernheim F. and Bernheim M. J. Pharmacol. 57, 427, 1936.
11. Михельсон М. Я. Фармакология и токсикология 6, (5), 49, 1943.
12. Михельсон М. Я. Действие наркотиков на холинэстеразу. Л., 1948.
13. Закусов В. З. Экспер. исслед. по промышленным ядам, в. 25, 114, 1936.
14. Мхитарян В. Г. Есаян Н. А. Изв. АН АрмССР (биол. науки), т. XI, 6, 1958.
15. Мхитарян В. Г. Аствацатурян С. А. Изв. АН АрмССР (биолог. науки), т. XII, в. 5, 13, 1959.
16. Мхитарян В. Г. Труды Ермединститута, том XV, 1960.
17. Flesh and Goldston. Science 113, 126, 1951.
18. Nachmansohn D. and Lederer E. Bull. Soc. chem. biol. 21, 797, 1939.
19. Barron E. S. G. E. Singer T. P. Science 97, 356, 1943.
20. Thompson R. H. S. Biochem. Soc. Symp. 2, 28, 1948.
21. Keeser E. Klin. Wschr. 17, 1811, 1938.
22. Dranzner O. Folia haematol. 63, 217 (цитир. по Augustinsson), 1939.
23. Rubino A. Ormoni 2, 595 (цитир. по Augustinsson), 1940.
24. Frommel E., Herschberg A. D. and Piquet J. Helv. physiol. pharmacol. Acta 1, 229, 1943.
25. Parteni L., Corneanu M., Popescu C. Commun. Acad. R. P. Române 1954, 4, 3—4, 161, РефХимБх реф. 4007, 1956.
26. Klas-Bertil Augustinsson. Cholinesterases A Study in Comparative Enzymology Stockholm. Acta physiologica Scandinavica vol. 15, 1948.
27. Adams D. H. and Thompson R. H. S. Biochem. J. 42, 170, 1948.
28. Markwardt F., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 295, 264, 1953.
29. Mounter L. A. and Whittaker V. P. Biochem. J. 53, 167, 1953.
30. Markwardt F. Naturwissenschaften 40, 12, 341, 1953.
31. Hargleaves A. B. Archiv of Biochem. and Biophys. 57, XI, 41, 1955.
32. Dubois K. P. and Mangun G. H. Proc. Soc. Expil. Biol. a. Med. 64, 137, 1947.