

УДК 547.258.11:612.82]615.9

ВЛИЯНИЕ БИС(Н-ТРИБУТИЛОЛОВО) ОКСИДА НА Na⁺-ЗАВИСИМОЕ ПОГЛОЩЕНИЕ L[¹⁴C]ГАМК СРЕЗАМИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

РОЗАНОВ В. А., ГЕРАСИМЯК Г. Р., ШАФРАН Л. М.

ВНИИ гигиены водного транспорта МЗ СССР. Одесса

Показано, что бис(н-трибутилолово) оксид (ТБТО) оказывает ингибирующее влияние на поглощение L[¹⁴C]ГАМК (K_m 30 мкМ, V_{max} = 330 кмоль/мг⁻¹ ткани/мин⁻¹) срезами коры головного мозга крыс в двух диапазонах концентраций: 10⁻¹⁰—10⁻⁸ и 10⁻⁵—10⁻⁴ М. При концентрации ТБТО 10⁻⁸ М степень ингибирования не зависела от экспозиции, а при концентрации 10⁻⁴ М линейно увеличивалась по мере удлинения преникубации срезов с ТБТО от 0 до 30 мин. Предполагается, что ингибирование поглощения ГАМК низкими концентрациями ТБТО обусловлено специфическими взаимодействиями ТБТО с переносчиком ГАМК, в то время как действие больших концентраций опосредовано мембранными эффектами ТБТО и его влиянием на функции Na⁺, K⁺-АТРазы и энергетику нервных клеток.

В последнее время оловоорганические соединения (ООС), широко применяемые в промышленности и обладающие нейротоксическим действием, интенсивно исследуются с позиций нейрехимии. Наиболее хорошо изучены в этом плане триметил- и триэтилолово, проявляющие выраженное нейротоксическое действие по нейроповеденческим, нейроморфологическим и нейрофизиологическим критериям [1]. Анализ данных литературы по этому вопросу свидетельствует, что, наряду с множеством других механизмов, нарушение ГАМК-ергической медиации является одним из существенных компонентов их нейротоксического действия [2]. Значительно менее изучен в этом плане бис-(н-трибутилолово)оксид (ТБТО)—наиболее широко распространенный представитель семейства трибутилпроизводных олова [3]. Согласно имеющимся данным, ТБТО, с которым имеют профессионально обусловленный контакт широкие контингенты людей, вызывает поведенческие нарушения [4], а его ближайший гомолог трибутилолово нарушает синтез нейроспецифических белков нервной ткани, имеющих отношение к синапто- и миелиногенезу, особенно у новорожденных животных, и при пренатальном воздействии [5]. В то же время, нейрехимические механизмы токсического действия ТБТО недостаточно изучены. В связи с этим, учитывая упомянутые сведения о влиянии нейротоксичных ООС на систему ГАМК-ергической медиации, мы предприняли настоящее исследование, в котором сконцентрировали внимание на влиянии ТБТО на активный транспорт ГАМК пережн-

вающими срезами мозга. Выбор этого параметра обусловлен данными о влиянии различных металлоорганических соединений на поглощение ГАМК нейроструктурами, что связывают с высокой чувствительностью белковой системы транспорта ГАМК плазматических мембран нервных клеток к тяжелым металлам и их производным [6—8] в силу первостепенной роли SH-групп в реализации транспортного процесса [9].

Материалы и методы

Объектом исследований были крысы-самцы линии *Wistar* массой 150—170 г. Животных декапитировали и дальнейшие операции производили на холоде. Мозг выделяли и бритвой отсекали участок (блокалодку) теменной коры размерами $3 \times 6 \times 1$ мм. Эту полосу помещали в заранее приготовленную агар-агаровую ванночку—фиксатор. Срезы толщиной 0,3 мм получали с помощью микротомы МНТ-84 («Микротехника», Пушкино-на-Оке), конструкции Буданцева [10]. 40—60 мг срезов помещали в капроновый мешочек, закрепленный на конце стеклянной трубки, и погружали в термостатированный (37°) инкубационный сосуд объемом 5 мл. Одновременно инкубировали до 8 сосудов. За 5 мин до инкубации и в течение всей инкубации содержимое сосуда насыщали газовой смесью (95% O_2 и 5% CO_2) путем барботажа через нижнее отверстие, снабженное измельчителем пузырьков газа. Инкубационная смесь содержала (в мМ): (NaCl—118, KCl—4,7, глюкозу—11,1, $NaHCO_3$ —25,0, $MgCl_2$ —1,2, NaH_2PO_4 —1,0, $CaCl_2$ —1,3, аскорбат—0,11, ЭДТА- Na_2 —0,04, согласно методическим рекомендациям Arbilla и соавт. [11]. После начала инкубации выдерживали срезы при стандартных условиях в течение 1,5 ч с целью адаптации к новым условиям существования. В предварительных экспериментах оценивали зависимость накопления метки от концентрации добавленной $L[^{14}C]$ ГАМК, времени и температуры инкубации. В первом случае добавляли $L[^{14}C]$ ГАМК в концентрациях 0,5—64 мкМ, во втором случае время инкубации устанавливали в пределах 3—20 мин. Для изучения влияния ТБТО в качестве рабочих параметров выбраны концентрация $L[^{14}C]$ ГАМК 2 мкМ и время инкубации 10 мин. ТБТО вносили в инкубационную среду в 0,02 мл 96%-ного этанола, конечная концентрация которого составляла 60 мМ. Для выявления зависимости «концентрация—эффект» ТБТО добавляли в концентрациях от 10^{-14} до 10^{-4} М с шагом на 1 порядок. После внесения ТБТО преинкубация составляла 10 мин; по окончании преинкубации добавляли $L[^{14}C]$ ГАМК еще на 10 мин, после чего мешочек со срезами извлекали из инкубационного сосуда, промывали холодной инкубационной средой и срезы гомогенизировали в 4 мл 0,005 н. NaOH. Гомогенаты наносили на мишени из нержавеющей стали по 0,5 мл и высушивали при 90°. Контролировали также убыль радиоактивности из инкубационной среды. Выявлена хорошая корреляция

между накоплением и убылью. Подсчет радиоактивности осуществляли на газопоточном счетчике радиоактивности 2154-1-IM («Протока»). Интенсивность накопления ГАМК рассчитывали в $\mu\text{моль}/\text{мг}^{-1}$ ткани/ мин^{-1} .

Результаты и обсуждение

Зависимость накопления метки срезами от концентрации добавленной ГАМК представлена на рис. 1. В диапазоне концентраций добавленной ГАМК 0,5—64 $\mu\text{М}$ отчетливо выявляются две системы поглощения—с высоким и низким средством. Достоверно на основании имеющихся данных можно охарактеризовать лишь первую систему: $K_m=30 \mu\text{М}$; $V_{\text{max}}=330 \mu\text{моль}/\text{мг}^{-1}$ ткани/ мин^{-1} . Исходя из данных литературы, первая система может быть отнесена к синаптической системе среднего средства, а вторая, по-видимому, к системе низкого средства [12].

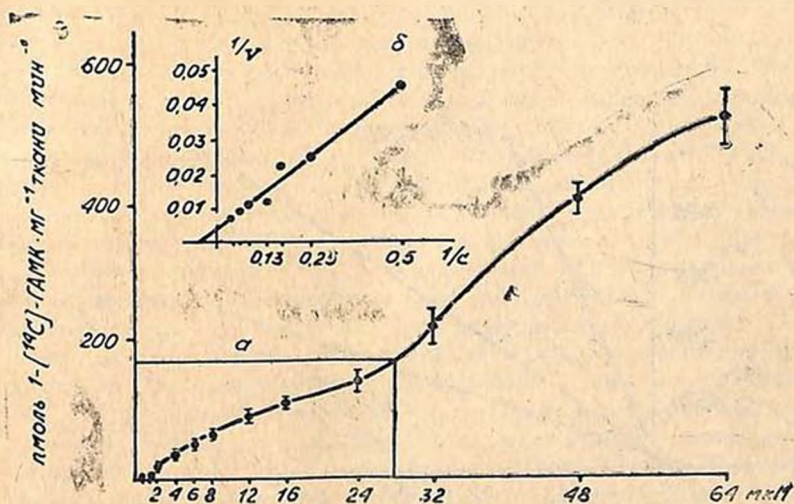


Рис. 1. Зависимость поглощения ГАМК переживающими срезами коры головного мозга крыс от концентрации добавленной ГАМК. Кинетический анализ поглощения с высоким средством.

Линейная зависимость накопления меченой ГАМК (2 $\mu\text{М}$) срезами от времени наблюдается до 10-й мин инкубации, после чего накопление ослабевает и выходит на плато к 20-й мин. Уже к 10-й мин соотношение срез/среда для ГАМК достигает 8—10. Поскольку при заданной концентрации меченой ГАМК накопление идет против градиента концентрации (внутриклеточная ГАМК в нервной ткани, по данным литературы, составляет 2—100 мМ , в зависимости от компартамента клетки [13, 14]), можно говорить об активном транспорте

ГАМК, чем, в частности, свидетельствует также абсолютная зависимость накопления от температуры среды и наличия ионов натрия.

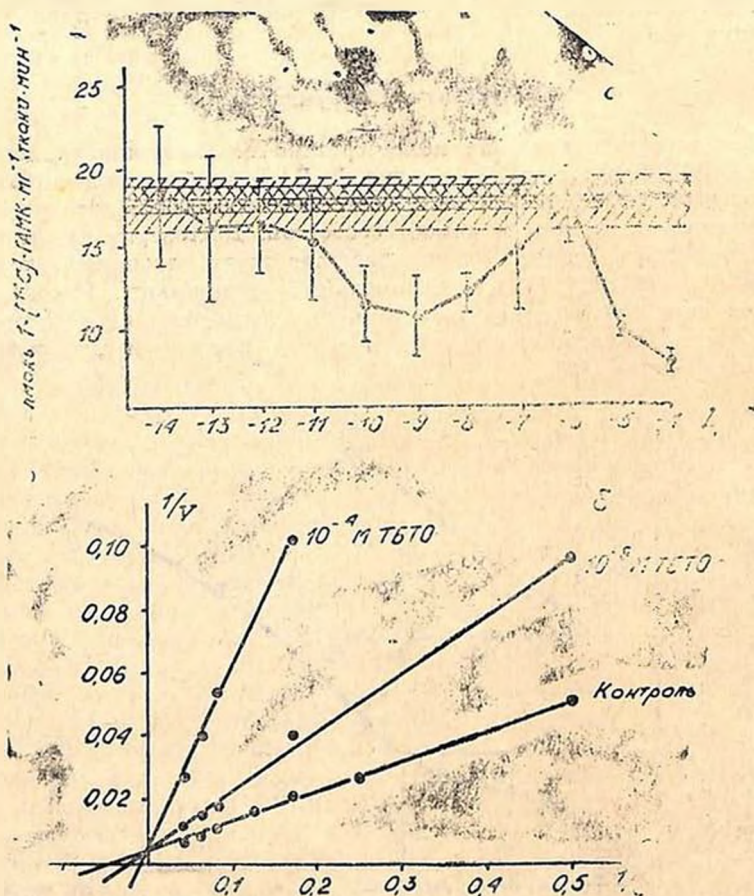


Рис. 2. Влияние различных концентраций бис(н-трибутилолово)оксида на поглощение ГАМК переживающими срезами коры головного мозга крыс. Кинетический анализ поглощения в диапазонах эффективного ингибирования.

На рис. 2 представлено влияние ТБТО в различных концентрациях на активный транспорт $L[^{14}C]ГАМК$ в срезы коры головного мозга крыс. Контролем служили срезы, инкубируемые в стандартных условиях в присутствии 60 мМ этанола. Как видно из представленных данных, этанол не оказывал достоверного влияния на поглощение ГАМК срезами. Зависимость «концентрация-эффект» для ТБТО имела нелинейный характер. Наблюдалось достоверное ингибирование

активного транспорта ГАМК в двух диапазонах концентраций ТБТО: 10^{-10} — 10^{-8} и 10^{-5} — 10^{-4} М. В концентрациях ниже 10^{-11} и в области 10^{-7} — 10^{-8} М достоверного влияния ТБТО на поглощение ГАМК не выявлено. В области эффективного ингибирования (10^{-8} и 10^{-4} М ТБТО) проверены кинетические параметры поглощения ГАМК. Выяснилось, что ТБТО в этих концентрациях мало изменяет $V_{\max}$, но дозависимо увеличивает K_m (рис. 2), что свидетельствует о конкурентном механизме ингибирования. Таким образом, полученные результаты не исключают конкурентного характера взаимодействия ТБТО и ГАМК на уровне транспортного переносчика. В то же время, наличие двух диапазонов ингибирующих концентраций ТБТО, различающихся на 4 порядка, заставляет предположить участие различных механизмов в реализации ингибирующего действия. Так, поскольку при концентрациях порядка 10^{-5} М для большинства ООС основным в механизме действия *in vitro* является угнетение дыхания и окислительного фосфорилирования [15, 16], можно полагать, что ингибирование поглощения ГАМК срезами при концентрациях ТБТО 10^{-5} М и больше связано с нарушением энергообеспечения активного транспорта. Поэтому особый интерес вызывает факт ингибирования ТБТО поглощения ГАМК при очень низких концентрациях. Можно предположить, что в основе этого ингибирования лежит специфическое взаимодействие ТБТО с переносчиком. Другая возможность развития эффекта связана с мембранотропными свойствами ТБТО, молекула которого отличается выраженной гидрофобностью.

Проведенные исследования по изучению зависимости «время—эффект» подтверждают высказанные предположения. Как видно из рис. 3), при добавлении ТБТО в концентрации 10^{-4} М увеличение экспозиции приводит к достоверному усилению эффекта, в то время как при концентрации ТБТО 10^{-8} М такая зависимость отсутствует. Таким образом, можно выделить два различных механизма действия ТБТО: при низких концентрациях он конкурентно тормозит накопление ГАМК срезами, причем эффект возникает сразу и не усиливается при увеличении контакта с токсикантом, а при высоких концентрациях ингибирование скорее всего обусловлено прогрессирующим угнетением энергопродукции вследствие дезорганизации метаболических процессов и ионного транспорта, зависящим от времени воздействия.

Обсуждая полученные результаты, следует, прежде всего, отметить, что выявленное ингибирующее действие ТБТО при малых концентрациях является новым фактом, который имеет значение для установления порога нейротоксического действия ТБТО с учетом его токсикодинамики в организме, что, в конечном итоге, может быть учтено при обосновании гигиенического регламента на это соединение. Практически все доступные работы, касающиеся влияния различных металлоорганических соединений на поглощение ГАМК срезами мозга, клетками в культуре и синапсами, свидетельствуют о том, что действующие концентрации триэтилсвинца, метилртути, триэтил-, трипропил- и трифенилолова лежат в пределах 10^{-6} — 10^{-4} М.

то есть в области влияния на энергетику клеток [6, 17—19]. В этом плане выявление эффекта значительно более низких концентраций токсиканта представляется существенным. Можно полагать, что в данном случае мы сталкиваемся со специфическим влиянием ТБТО на переносчик ГАМК, возможно, сопряженным с проникновением ТБТО в его гидрофобную часть и модификацией его ориентированных внутрь клеток сульфгидрильных групп при деалкилировании ТБТО, аналогично тому, как это показано для проникающих через мембрану мышьякоорганических соединений, в частности оксида фениларсина [7, 20]. Можно представить, что при дальнейшем повышении концентрации ТБТО на первый план выходят его мембранотропные эффекты, сопровождающиеся влиянием на N^+ , K^+ -АТФазу, как это было отмечено ранее [19], а при больших концентрациях — дезорганизацией метаболизма и снижением энергообеспечения транспортных процессов.

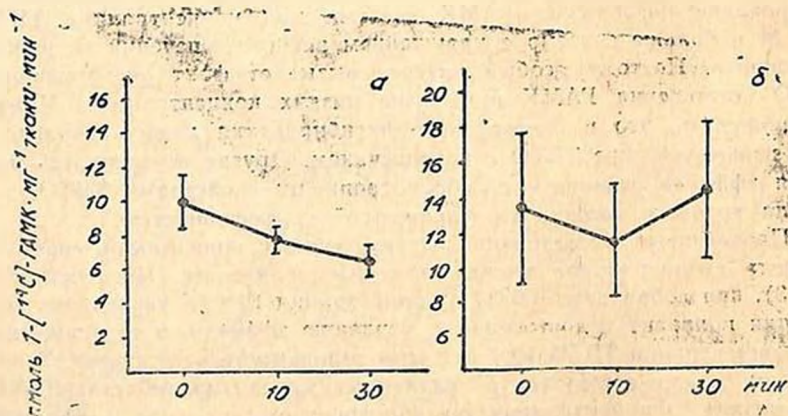


Рис. 3. Влияние длительности преинкубации срезов коры головного мозга крыс с бис(н-трибутилово)оксидом на степень его ингибирующего влияния в диапазонах эффективного ингибирования

В целом полученные данные свидетельствуют о влиянии ТБТО на процессы, связанные с ГАМК-ергической медиацией, что может быть одним из компонентов нейротоксического действия, аналогично его низшим алкильным гомологам.

THE INFLUENCE OF BIS (N-TRIBUTILOLOVO) OXYDES -- ON Na⁺-DEPENDENT ABSORPTION OF 1⁴C GABA BY THE SECTIONS OF RAT CEREBRAL CORTEX

ROSANOV V. A., GERASIMYAK G. R., SHAFRAN L. M.

ALL-Union Institute of Sci. Res. of Hygiene and Water Transport of the
USSR Ministry of Health, Odessa

It is shown that bis(n-tributylolovo) oxide (TBTO) pays an inhibiting influence on the absorption of 1—1⁴C L-GABA ($K_m=30 \mu M$, $V_{max}=330 \text{ kmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ tissue} \cdot \text{min}^{-1}$) by the sections of rat cerebral cortex in two diapasons of concentrations: 10^{-10} — 10^{-8} and 10^{-5} — 10^{-4} M. At concentration of TBTO 10^{-8} the level of inhibition does not depend on exposition and at concentration 10^{-4} M it increased lineary depending on prolonging the predincubation of the slices with TBTO from 0 to 30 min.

It is supposed that the inhibition of GABA absorption by low concentrations of TBTO depends on specific interaction of TBTO with GABA transmitters, while the effect of great concentrations depends on membrane effect of TBTO and its influence on the function of Na⁺, K⁺-ATPase and energetics of nerve cells.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. McMillan D. E., Wenger G. R. *Pharmacol. Rev.*, v. 37, № 4, p. 365—369, 1985.
2. Розанов В. А., Шафран Л. М. *Нейрохимия*, т. 10, № 1—2, с. 81—93, 1991.
3. Tributyltin compounds, *Environmental Health Criteria*, v. 116, WHO, Geneva, 1990.
4. Crofton K. M., Dean K. F., Bonček V. M., Rosen M. B., Sheets L. P., Chernoff N., Reiter L. W. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, v. 97, p. 113—123, 1989.
5. O'Callaghan J. P., Miller D. B. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 246, № 1, p. 394—402, 1988.
6. Seidman P., Verity M. A. *J. Neurochem.*, v. 48, № 4, p. 1142—1149, 1987.
7. Robillard G. T., Schaaf J. M., Teelken A. W. *FEBS Lett.*, v. 221, № 2, p. 391—395, 1987.
8. O'Kushy J. R., McGeer E. G. *J. Neurochem.*, v. 53, № 4, p. 999—1066, 1989.
9. Troeger M. B., Wilson D. F., Eredinska M. *FEBS Lett.*, v. 171, № 12, p. 303—308, 1984.
10. Буданцев А. Ю.—В кн.: Микротом МНТ-84—срезы нативной ткани—прижизненные исследования на молекулярно-клеточном уровне. Пущино, ИЦБИ АН СССР, 1985.
11. Arbilla S., Kamal L., Langer S. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 57, p. 211—217, 1979.
12. Wood J. D., Sidhu H. S. *J. Neurochem.*, v. 49, № 4, p. 1202—1208, 1987.
13. Ситинский И. А.—В кн.: Гамма-аминомасляная кислота—медиатор торможения. Л., Наука, 1977.
14. Tapia R. In: *Handb. of Neurochem.*, N. Y.—L.: Plenum Press, v. 3, p. 423—466, 1983.
15. Brody T. M., Moore K. E. *Federat. Proc.*, v. 21, p. 1103—1106, 1961.
16. Loch E. A. *J. Neurochem.*, v. 26, p. 887—892, 1976.
17. Bronkes N., Kristi D. A. *J. Neurochem.*, v. 53, № 4, p. 1228—1237, 1989.

18. *Mavfin D. A., Waniewsky R. A., Wolpaw E. W.* Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 71, № 2, p. 155—162, 1983.
19. *Costa L. G.* Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 75, № 3, p. 471—479, 1985.
20. *Schaaf J. M., Teelken G. W., Robillard G. T.* Mol. and Cell. Biochem., v. 82, № 1—2, p. 156, 1988.

Поступила 6. VII. 1991