

Uticaj lipofilnih rastvarača na ponašanje i aktivnost katalaze izolovane iz mozga miša (*Mus musculus*)

Poznato je da su etil acetat, nitro razređivač i toluen široko rasprostranjeni lipofilni rastvarači, pre svega u domaćinstvima. Takođe, ranija istraživanja su ukazala na mnoge patofiziološke promene koje ovi intoksikanti mogu izazvati. Shodno tome, u našem istraživanju smo se bavili procenom oštećenja mozga miševa nakon hroničnog izlaganja etil acetatu, nitro razređivaču i toluenu. Kao parametri oštećenja mozga uzeti su poremećaji u ponašanju i oksidativni stres. Ponašanje je praćeno open field testom (test otvorenog polja), dok je za parametar oksidativnog stresa uzeta aktivnost katalaze. Dobijeni rezultati open field testa ukazuju da miševi hronično izloženi toluenu i nitro razređivaču pokazuju veću lokomotornu aktivnost, prešavši značajno veći ukupan put u odnosu na kontrolnu grupu, dok je kod grupe tretirane etil acetatom zapažena umanjena lokomotorna aktivnost. Značajno povećanje specifične aktivnosti katalaze zapaženo je u homogenatima mozga miševa tretiranih toluenom i etil acetatom, dok kod grupe tretirane nitro razređivačem nije bilo promene u odnosu na kontrolu. Sem toga, zabeležena je i razlika u aktivnosti katalaze u homogenatima desne i leve hemisfere mozga miševa tretiranih toluenom. Rezultati navode na zaključak da je hronično oštećenje izazvano ovim toksičnim inhalatima veliko, te da najteže posledice nosi upotreba toluena.

Uvod

Etil acetat, toluen i nitro razređivač spadaju u grupu nepolarnih, lako isparljivih rastvarača. Ove supstance se često zloupotrebljavaju radi postizanja efekta narkoze, sedacije, pa čak i euforije (DEA

2011). Neki od njih su lako dostupni, poput nitro-razređivača, lepka, acetona i butana itd. Laka dostupnost i izraženo fiziološko dejstvo čini ove inhalate pogodnim za zloupotrebu, posebno među mladima i ljudima u nerazvijenim zemljama (*ibid.*). Iako hemijske supstance koje se u njima nalaze mogu izazvati različite farmakološke efekte, većina ovakvih rastvarača stvara osećanje slično alkoholnoj intoksikaciji (Ferrando i Andreu-Moliner 1992). Nakon što se udahnu određene količine, gotovo svi lako isparljivi rastvarači izazivaju anesteziju, gubitak osećaja, pa čak i svesti. Izloženost velikim količinama može uzrokovati konfuziju i delirijum, koji mogu biti praćeni mučninom i povraćanjem (DEA 2011). Takođe je pokazano da trudnica koja je pod dejstvom inhalata često pobačuje ili rađa mrtvu decu (Schwetz *et al.* 1991).

Prema dosadašnjim istraživanjima inhalati dejstvo ispoljavaju na mnoge delove mozga (DEA 2011). Istraživanja sprovedena na životinjama ukazuju da najčešće zloupotrebljavani isparljivi rastvarači dovode do promena u ponašanju i pokreću mehanizme slične onima koje proizvode depresanti CNS-a (centralnog nervnog sistema), kao što su alkohol, sedativi i anestetici. Posebnu opasnost predstavlja „sindrom iznenadne udišuće smrti” (Sudden sniffing death), a može javiti i nakon samo jedne upotrebe inhalata i predstavlja srčani problem, koji se ispoljava kao jaka aritmija, nakon udisaja intoksikanta (Meadows i Verghese 1996).

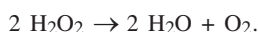
Oksidativni stres predstavlja disbalans između produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta i sposobnosti biološkog sistema da ih ili ukloni ili popravi

Vigor Arva (1993), Zrenjanin, Begejski red 23, učenik 2. razreda Gimnazije u Zrenjaninu

Karla Ilić-Đurđić (1993), Zrenjanin, Blagoje Parovića 21, učenica 2. razreda Medicinske škole u Zrenjaninu

oštećenja. Slobodni radikali su nestabilna jedinjenja koja imaju nespareni elektron što ih čini vrlo reaktivnim. Kako svako jedinjenje teži da postane stabilno slobodni radikali veoma često uzimaju elektron od drugih molekula čime započinju lančanu reakciju. Postoji značajna korelacija između nekih bolesti i stepena oksidativnog stresa. U organizmu slobodni radikali se najčešće pojavljuju kao ROS (Reactive Oxygen Species – reaktivne kiseonične vrste) a to mogu biti H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ (peroksidni anjon), kao i mnogi organski peroksidi.

Katalaza je enzim zajednički za skoro sva živa bića u kojim razlaže toksični vodonik-peroksid na kiseonik i vodu. Razlaganje se vrši ping pong mehanizmom, preko hem grupe:



Prema oksidativnom stresu su najosetljiviji lipidi. Neki radovi pokazuju da je koncentracija toluena je do 80 puta veća u mastima nego u krvi (Kroeger *et al.* 1980). Utvđena je zavisnost između inhalata i lipofilnosti molekula, koja pokazuje da što se molekul bolje rastvara u lipidima, to više raste njegova moć anestezije i sedacije. Veoma je značajnija činjenica, da se inhalati dobro rastvaraju u lipidima, jer veliki udeo u građi mozga imaju upravo lipidi (Meyer 1937).

Hronične zloupotrebe inhalata dovode do oštećenja različitih delova mozga, što se manifestuje na ponašanje jedinke (DEA 2011). Ove posledice mogu biti prouzrokovane oksidativnim stresom ali i drugi faktorima. Manifestacije na ponašanje mogu biti različite i direktno zavise od delova mozga koji su oštećeni, kao i od intenziteta oštećenja

Cilj rada je procena uticaja toluena, etil-acetata i nitro-razađivača na ponašanje i aktivnost katalaze u mozgu miša koji je prethodno hronično izlagan ovim lakoisparljivim rastvaračima.

Materijal i metode

Formiranje grupa miševa i njihova intoksikacija

U eksperimentu su koriscena 24 miša (*Mus musculus*), koja su podeljeni u četiri grupe od po 6 jedinke. Hroničan stres je izazvan tako što su 3 od 4 grupe izlagane vazduhu koji je bio zasiceen parama etil-acetata, toluena ili nitro-razađivača, 15 minuta

dnevno, tokom 20 dana. Kontrolna grupa miševa nije izlagana ovim inhalatima.

Tokom dvadeset dana hronično su izlagani vazduhu koji je bio zasiceen parama etil-acetata, toluena i nitro-razađivača u toku 15 minuta. Kontrolna grupa miševa je bila izolovana od svih inhalata. Hrana i voda su davani ad libitum i imali su prirodnu smenu dana i noći. U toku tretmana nije bilo većih varijacija temperature vazduha.

Za eksperiment su izabrani baš ovi rastvarači zbog svoje lake dostupnosti, čak i u radnjama široke potrošnje. Etil acetat i toluen su čiste supstance, dok je nitro razeđivač koji smo koristili smeša: toluena 10-20%, etilacetata 30-40% i acetona 30-45%

Određivanje lokomotorne aktivnosti i ponašanja miševa

Lokomotorna aktivnost određena open-field testom (testom otvorenog polja), tako što je miš stavljen u drvenu kutiju bez poklopca, prečnika 25 cm, visine 1 m, crnog dna i pušten da se u njoj slobodno kreće u toku 30 minuta u potpunoj svetlosnoj i zvučnoj izolaciji. Sistem je sniman kamerom postavljenom iznad kutije (Crawley 1985).

Distanca koju je svaki miš prešao u toku od 30 minuta određena je uz pomoć funkcija u matematičkom programu MatLab.

Žrtvovanje i priprema uzoraka

Mozgovi su oslobođeni lobanje, odstranjen im je cerebellum i podeljeni su na hemisfere. Izolacija je vrshena na ledu. Hemisfere su stavljanje u saharozni medijum (21.39 g saharoze i 0.0931 g EDTA u 0.2 M fosfatnom puferu, pH 7) u kom su homogenizovane.

Homogenizacija je vrshena povlačenjem tkiva kroz iglu (21 G). Za svaku hemisferu je urađeno 20 aspiracija.

Potom je izolovana sinaptosomalna frakcija, diferencijalnim centrifugiranjem. Prvo centrifugiranje homogenata je 15 minuta na 4000 rpm. Supernatant je zadržan, a talogu je dodato 750 uL saharoznog medijuma, i centrifugirano takođe 15 minuta na 4000 rpm. Supernatanti iz dva centrifugiranja su pomešani i centrifugirani na 13400 rpm, 2 sata na temperaturi od 4°C.

Merenje koncentracije proteina u sinaptozomima

Koncentracija proteina u mozgu miševa određena je Lowryevom metodom. Napravljeni su sledeći reagensi:

Reagens I

- 0.2 g K-Na-tartarata $C_4H_4O_6KNa \times 4H_2O$
- 20g Na_2CO_3
- 20 mL 5M NaOH

rastvorenih do 1000 mL, destilovanom vodom.

Reagens II

- 5 g/L $CuSO_4 \times 5H_2O$
- 0.5 g $CuSO_4$ rastvorog u 100 mL vode

Reagens III

reagens I + reagens II u odnosu 50 : 1 (50 mL reag. I + 1 mL reag. II)

Reagens IV

razblažen Folinov reagens 1 : 1 (mešavina fosfotungstenske kiseline - $H_3PW_{12}O_{40}$ i fosfomolibdenske kiseline - $H_3PMo_{12}O_{40}$)

Pred početak određivanja nepoznate koncentracije proteina u uzorcima, napravljena je standardna kriva proteina (standard BSA 1 mg/mL)

U epruvetu je sipano 10 μ L uzorka i 1 mL reagens III. Epruvete su inkubirane 10 minuta. Potom je u epruvete dodat 0.1 mL Folinovog reagens. Inkubacija traje 20 minuta.

Apsorbanca se očitava na 540 nm.

Određivanje aktivnosti katalaze

Korišćenja je metoda po Goth-u. Reagensi su sledeći:

1. 60 mmol/L natrijum fosfatnog pufera pH 7.4
2. 32.4 mmol/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ - amonijum molibdat
3. 65 mmol/L H_2O_2 - vodonik peroksida

Za uzorak se koristi 1 mL reagens 2 i po 0.2 mL tkiva, što se zatim inkubira na 37°C, jedan minut, i potom se pomeša sa 1 mL reagens 3.

Jedinica aktivnosti katalaze (U) je definisana kao količina enzima koja katališe reakciju u kojoj se razlaže jedan mikromol vodonik peroksida u jedinici vremena (min).

A proračunava se prema sledećoj formuli:

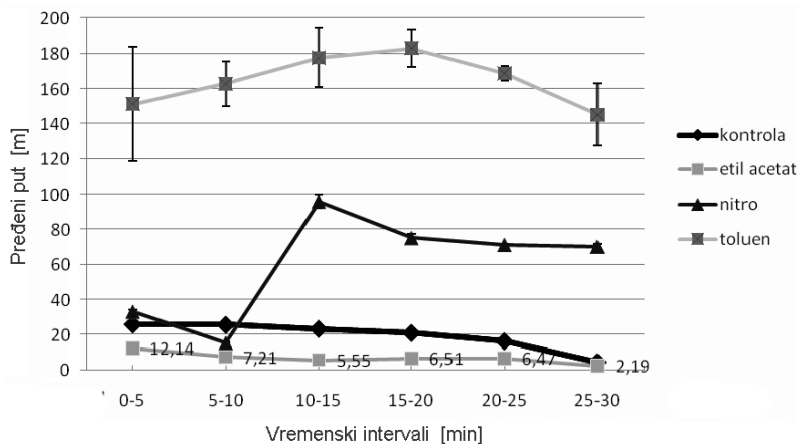
$$kUL^{-1} = \frac{E_{uzorka}}{E_{standarda}} \times \left[C_{H_2O_2} \frac{5000}{1000} \right]$$

gde je E ekstinkcija, C je koncentracija vodonik peroksida, a 5000 je faktor za pretvaranje na litar, a 1000 za prevođenje aktivnosti u kU.

Rezultati i diskusija

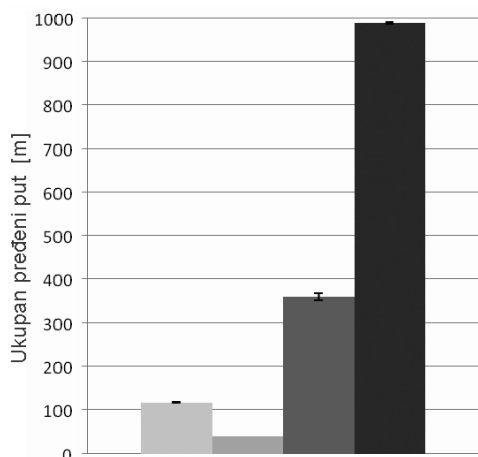
Aktivnost katalaze

Prilikom tretmana prvo su primećeni simptomi akutnog trovanja, koji su se ispoljili posle prve nedelje tretmana. Miševi su bili ataksični sa tremorom ekstremiteta, ali nakon što su odneti na svež vazduh, ovi simptomi su nestajali. U toku eksperimenta došlo je do uginuća miševa i to dva u etil acetatu i po jedan u nitro i toluen, verovatno kao rezultat hroničnog trovanja. Svi članovi kontrole su preživeli do žrtovanja.



Slika 1. Praćeni put u vremenskim intervalima od 5 minuta po tretiranim grupama

Figure 1. Monitored path in 5 minute intervals: (from top marking) control, ethyl acetate, nitro and toluene



Slika 2.
Ukupan praćeni put po tretiranim grupama

Figure 2.
Total monitored way: (from top marking) control, ethyl acetate, nitro and toluene

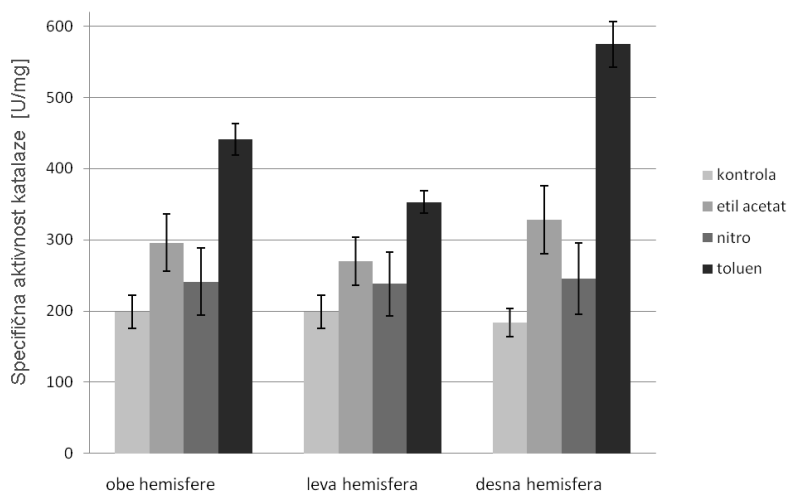
■ kontrola
■ Etil Acetat
■ Nitro
■ Toluen

Rezultatima prikazanim na slici 1 potvrđena je pretpostavka da se hronično izlaganje miševa toluenu, nitro-razađivaču i etil-acetatu odražava na lokomotorne aktivnosti miševa. Kontrolna grupa je za 30 minuta, koliko je trajao open-field test, prešla 116.4 m. U istoj grupi primećeno je periodično opadanje dužine pređenog puta u zavisnosti od vremena koje je miš proveo u open-field-u, što se objašnjava na sledeći način: kad se zdrav miš ubaci u njemu potpuno nepoznatu sredinu prva osobina koju će ispoljiti jeste radoznalost, odnosno želja da se upozna i istraži nova sredina. Što više vremena provede u njoj to će je bolje upoznati i njegova radoznalost će se postepeno smanjivati, a samim tim i put koji će miš preći u jedinici vremena. Etil-acetat grupa je za vreme trajanja testa prešla svega 40.1 m, što je 2.9 puta manje od kontrole iz čega se zaključuje da hronično izlaganje ovom inhalatu izaziva hipoaktivnost. Mehanizam koji se nalazi u osnovi hipoaktivnosti izazvane ovim rastvaračem nije poznat, a dobijenim rezultatima ga nije moguće precizno okarakterisati. Ovakvo ponašanje može se tumačiti i kao depresija, ali da bi se to potvrdilo neophodno je uraditi još nekoliko različitih behaviour testova. Iako je distance koju miševi tretirani etil acetatom prešli mnogo manja u odnosu na kontrolnu grupu njegova vrednost takođe opada u funkciji od vremena, što se ne može reći za grupu tretiranu nitro-razađivačem. U ovom slučaju dolazi do naglog smenjivanja hipo i hiperaktivnosti miša. Drastican porast lokomotorne aktivnosti u periodu od 10og do 15og minuta, ne može se sa sigurnošću objasniti. Postoji mogućnost da je nastao kao rezultat anksioznosti miševa. Tako nešto je primećeno i pri istraživanju kod Crawleyja (1985). Ovakvo ponašanje

ne može se sa sigurnošću objasniti dok se ne izvrše dodatne analize. Pretpostavlja se da je hronično izlaganje miševa nitro-razađivaču izazvalo oštećenja nekih specifičnih centara u mozgu, o čemu se može više govoriti tek nakon sprovođenja novih testova koji bi ovu pretpostavku mogli potvrditi ili opovrgnuti. Ako se računa celokupan pređen put (slika 2) koji iznosi 361 m (3.1 puta više od kontrolne grupe) lako se može zaključiti da dolazi do efekta ekscitacije ili ti hiperaktivnosti. Isti taj efekat je više izražen kod miševa tretiranih toluenom. Pređeni put u ovoj grupi iznosi 987.7 m, što je 8.5 puta više od kontrolne grupe. Iako su miševi hiperaktivni iz grafika 1. se može zaključiti da se put koji pređu postepeno povećava do dvadesetog minuta, posle kog postepeno opada. To bi moglo da znači da uzrujanost raste, i da je najveća u intervalu od 15 do 20 minuta. Do ovakvog ponašanja moglo je doći oštećenjem specifičnih moždanih struktura i to oštećenja jakog intenziteta.

Najmanja aktivnost katalaze je nađena u kontrolnoj grupi (199 U/mg), kod koje je aktivnost malo veća u levoj hemisferi. Generalno su vrednosti specifične aktivnosti veće, i za razliku od kontrolne grupe u desnoj hemisferi više od leve. Najveća je kod toluen grupe, koja je 2.5 puta veća od kontrolne grupe, potom sledi etil acetat, dok kod nitro grupe nije pokazana značajna razlika u aktivnosti katalaze u odnosu na kontrolu. Povećanje aktivnosti katalaze, ukazuje na postojanje oksidativnog stresa.

Prikazano je da je u desnoj moždanoj hemisferi nivo oksidativnog stresa viši (slika 3), što po nekim dosadašnjim ispitivanjima može implicirati da se



Slika 3.
Specifična aktivnost katalaze

Figure 3.
Specific activity of catalase in the right (right), left (center) and both (left) hemispheres: (from top marking) control, ethyl acetate, nitro and toluene

miševi ne bi snašli u situaciji sa predatorom ili u fight or flight prilici (Vallortigara i Rogers 2005).

Pređeni put miševa iz nitro grupe je značajno duži od onog koji je prešla kontrola, dok je aktivnost katalaze u granicama normale, zbog čega se pretpostavlja da je došlo do oštećenja specifičnih moždanih struktura koja bi mogla prouzrokovati ovakvu situaciju.

Iz dobijenih rezultata zaključeno je da toluen izražava najdrastičnije promene u ponašanju miševa iz kog razloga se smatra najopasnijim od istraživanjem obuhvaćenih inhalata.

Ovo istraživanje ilustruje uticaj ispitivanih rastvarača na lokomotornu aktivnost miševa, ali takođe otvara mnoga pitanja, prevashodno ona koja se odnose na utvrđivanje moždanih centara na koje ovi inhalati deluju, kao i na mehanizam samog dejstva.

Zaključak

Iz dobijenih rezultata zaključuje se da hronično izlaganje etil-acetatu i toluenu izaziva oksidativni stres u mozgu miševa, dok je nivo istog približno jednak u kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj nitro-razađivačem. Takođe se primećuje da korišćeni rastvarači utiču na lokomotorne aktivnosti i ponašanje tretiranih jedinki gde etil-acetat izaziva hipoaktivnost, a toluen i nitro-razađivač ekscitaciju, koja je značajno izraženija kod miševa hronično izlaganim toluenu. Zbog razlike u ponašanju nitro grupe ono se ne može dovesti u direktnu vezu sa oksidativnim stresom, pretpostavlja da je došlo do oštećenja određenih

specifičnih moždanih struktura. Da bi se ova pretpostavka potvrdila potrebno je izvršiti dodatna ispitivanja. Postavlja se pitanje iz kog razloga je došlo do razlika u aktivnosti katalaze između leve i desne hemisfere mozga, koja je najviše izražena u toluen grupi.

Ovim eksperimentom je potvrđena opasnost navedenih inhalata, koji su dostupni čak i u radnjama široke potrošnje, po zdravlje čoveka.

Zahvalnost. Ovaj rad je nastao uz potporu zanimljive mreže ljudi, koji su svojom pomoći, doprineli mnogo. Posebno se zahvaljujem velikodušnoj pomoći od Pasterovog zvoda u Novom Sadu, i profesoru Dušanu Laloševiću, za miševe, ali i veoma dragocene savete. Takođe se zahvaljujemo asistentima u zavodu.

Uz njih, treba se zahvaliti dragom prijatelju Milošu Rokiću, na svim uputima i konstruktivnim idejama, kao i Neveni Radonjić, koja je Vigoru bila mentor najvećim delom tokom praktičnog rada. Ivanu Razumeniću na pomoći oko obrade rezultata dobijenih snimanjem miševa u otvorenom polju. I još jedna osoba vredna spominjanja je Ana Parabucki, koju mnogo volimo i čija nam je pomoć bila neophodna tokom tumačenja dobijenih rezultata.

Literatura

Crawley J. 1985. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience & Biobehavioral reviews*, **9**: 37.

DEA 2011. Inhalants. U *Drugs of Abuse*. Washington: Drug Enforcement Administration, U.S. Department of Justice, str. 72.

Ferrando M. D., Andreu-Moliner E. 1992. Acutetoxicity of toluene, hexane, xylene and benzene to the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus plicatilis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 49: 266.

Han B., Gfroerer J., Colliver J. 2010. Associations Between Duration Of Illicit Drug Use And Health Conditions: Results From The 2005-2007 National Surveys On Drug Use And Health. *Ann. Epidemiol.*, 20 (4): 289.

Kroeger R., Moore R., Lehman T. 1980. Recurrent Urinary Calculi Association With Toluene Snuffing. *J. Urology*, 123 (1) : 89.

Meadows R., Verghese A. 1996. Medical Complications Of Glue Sniffing. *Southern Med. J.*, 89: 455.

Meyer K. 1937. Contributions To The Theory Of Narcosis. *Trans Faraday Soc.*, 33: 1062.

Schwetz B., Mast T., Weigel R., Dill J., Morrissey R. 1991. Developmental Toxicity Of Inhaled Methyl Ethyl Ketone In Swiss Mice. *Toxicol. Sci.*, 16 (4): 742.

Vallortigara G., Rogers L. 2005. Survival With an asymmetrical brain: Advantages and disadvantages of cerebral lateralization. *Behavioral and brain sciences*, 28, 575.

Vigor Arva and Karla Ilić-Đurđić

Effect of Lipophilic Solvents on Behavior and Catalase Activity in *Mus musculus* Brain

It is well known that ethyl acetate, nitro solvent and toluene are widely used lipophilic solvents, especially in households. Previous researches had pointed out many pathophysiological changes that these inhalants could induce. In this research we have assessed damage to the mice brain which was the result of chronic exposure to these solvents. Monitored parameters were locomotor activity and oxidative stress. Animal Behavior was monitored by the open field test, while the oxidative stress was monitored by specific catalase activity.

Results obtained after the open field test indicate that mice chronically exposed to nitro solvent and toluene showed elevated locomotor activity, compared to the control group. On the other hand, the ethyl acetate treated group showed a decrease in locomotor activity in comparison to the control group.

A significant increase in specific catalase activity was noticed in brain homogenates of animals treated with intoxicants, although the nitro solvent group had not shown significant alteration in activity compared to the control. Moreover, we observed that there was a difference in catalase activity among the right and left hemisphere of the brain, particularly in the toluene treated group.

The obtained results can lead to the conclusion that the chronic damage from these toxic solvents is extensive, and it is most extreme in chronic toluene exposure.

