

УДК 615.099.02, 57.044

КРЫСА (*Rattus norvegicus*) КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ В МОДЕЛИ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ. 4. M₁-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ И ЭСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ГОМОГЕНАТАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2019 г. В. Е. Соболев¹, В. И. Шмурак¹, Н. В. Гончаров^{1,2,*}

¹ НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, ФМБА России,
Ленинградская обл., г.п. Кузмоловский, ст. Капитолово, Россия

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: ngoncharov@gmail.com

Поступила в редакцию 18.04.2018 г.

После доработки 19.10.2018 г.

Принята к публикации 04.02.2019 г.

DOI: 10.1134/S004445291903015X

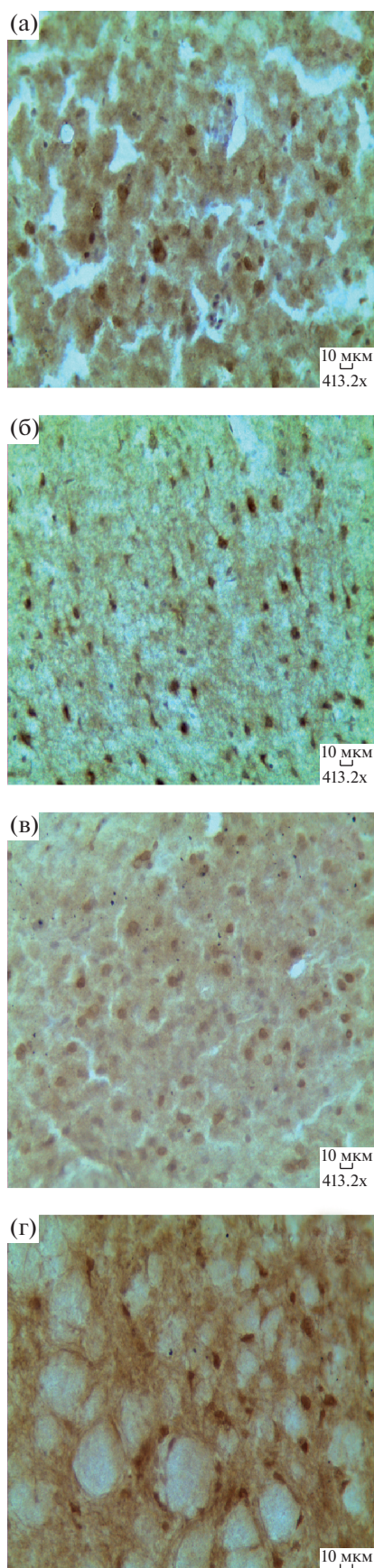
После острого отравления фосфорорганическими соединениями (ФОС) в организме происходит развитие ряда признаков, являющихся следствием “холинэргического криза”, в том числе повреждение ЦНС и периферической нервной системы, эндотелия, других тканей и органов [1–3]. Поскольку значительная часть токсикологических исследований проводится на грызунах, необходимо учитывать наличие в крови грызунов карбоксилэстеразы (КЭ), которая, будучи сериновой эстеразой, стехиометрически связывает ФОС, модулируя тем самым состояние интоксикации и развитие отставленной патологии. Для подавления КЭ используют различные ингибиторы КЭ, наиболее известным из которых является 2-(*o*-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиафосфорин-2-оксид (СВDP). Другой, более простой способ моделирования острого отравления ФОС на грызунах состоит в том, что ФОС вводят двукратно с интервалом 1 ч, при этом первая доза идет преимущественно на подавление активности КЭ [4]. Вторым вариантом является, однако, менее специфическим, но сравнительный анализ динамики развития оставленной патологии после острого отравления ФОС на фоне подавления активности КЭ ранее не проводился.

Цель настоящего исследования – иммуногистохимическая идентификация мускариновых рецепторов M₁ в нейронах неокортекса, гиппокампа и стриатума и определение эстеразной активности гомогенатов головного мозга крыс в разные сроки после острого отравления параоксоном после предварительного ингибирования КЭ параоксоном и СВDP.

В работе применяли следующие реактивы: параоксон (О,О-диэтил-О-*n*-нитрофенилфосфат,

РОХ, Sigma); 2-(*o*-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиафосфорин-2-оксид (2-(*O*-cresyl)-4Н-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide, СВDP), синтезирован в НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России. Буфер для ИГХ TBS INC Wash Buffer+Tween, 20× (Cell Marcue). Первичные антитела Abcam (ab180636). Система детекции REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience).

Токсикологические исследования проводили на крысах-самцах *Rattus norvegicus* аутбредной линии Вистар массой 200–240 г в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике и положениями “Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ”. Токсикологическая модель подробно описана в первой публикации по результатам серии исследований [4]. Эксперимент включал три группы сравнения: 1 – интактный контроль; 2 – интоксикация параоксоном в дозе 0.6ЛД₅₀ через час после введения параоксона в дозе 0.45ЛД₅₀ (РОХ2х); 3 – интоксикация параоксоном в дозе 0.6ЛД₅₀ через час после введения СВDP в дозе 3.3 мг/кг в/б (СВРОХ). Наблюдения за животными продолжались в течение 6 нед после отравления. Через 1, 3 сут, 1, 2, 4 и 6 нед после отравления проводили выборочную эвтаназию животных в каждой группе и отбор материала для иммуногистохимического исследования (ИГХ). После декапитации головной мозг животных извлекали и вырезали тканевые образцы сегментальной плоскости левого полушария в стереотаксических координатах: –1.13 до –2.07 mmant. Bregma. Срезы толщиной 7 мкм фиксировали в ацетоне 5 мин, после чего



←
Рис. 1. M₁-позитивные нейроны в различных отделах мозга крыс. Иммуногистохимическое исследование. Хромоген: 3,3'-диаминобензидин (DAB). (а) Неокортекс крыс контрольной группы; (б) неокортекс крыс 2-й группы (РОХ2х) через 2 нед после отравления; (в) гиппокамп крыс 2-й группы (РОХ2х) через 24 ч после отравления; (г) стриатум крыс контрольной группы.

промывали 0.01 М буфером TBS/HC Wash Buffer + Tween, 20× (Cell Marque). Для окрашивания срезов использовали мультимерную безбиотиновую систему детекции REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB (SpringBio). Окрашенные срезы просматривали под микроскопом при увеличении 103×; 247× и 413×. Методом случайного отбора фотографировали области неокортекса, гиппокампа и стриатума и в программе Videotest Size 5.0 определяли плотность распределения позитивных клеток на площади среза (количество клеток на мм², N/мм²).

Ацетилхолинэстеразную, бутирилхолинэстеразную и карбоксилэстеразную активность гомогенатов головного мозга определяли в супернатанте при помощи методик, адаптированных для 96-луночных микропланшетов, с последующим измерением на микропланшетном спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Fischer Scientific) [5].

Статистическую и математическую обработку данных выполняли в программе GraphPad Prism 5.0 методом One-Way Anova, с использованием критерия Краскела-Уоллиса. Статистически обработанные данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

На разных сроках после отравления параоксоном установлены изменения плотности распределения нейронов, позитивных для M₁-холинорецепторов в неокортексе, гиппокампе и стриатуме крыс (рис. 1). Через 24 ч после отравления наблюдается увеличение плотности M₁-позитивных клеток на 40% в гиппокампе крыс 2-й группы ($4.27 \pm 0.11^{*1}$) и на 10% в гиппокампе крыс 3-й группы (3.38 ± 0.12) по сравнению с контролем (3.04 ± 0.15) (рис. 1а, в). Через трое суток после отравления наблюдается уменьшение M₁-позитивных клеток в неокортексе крыс 2-й и 3-й групп на 25 и 30% (3.24 ± 0.11 и $3.04 \pm 0.18^{*}$ соответственно) по сравнению с контролем (4.28 ± 0.42), но еще более повышается (до 35%) разница в плотности M₁-позитивных клеток в гиппокампе крыс 3-й группы относительно контроля. Через 1 нед после отравления выявлено увеличение плотности M₁-позитивных клеток на 45% в гиппокампе ($3.24 \pm 0.11^{*2}$) и почти

¹ * – Различия статистически значимы по сравнению с данными контрольной группы.

² # – Различия статистически значимы при сравнении данных 2 и 3 групп.

на 60% в стриатуме ($2.43 \pm 0.11^{\#}$) крыс 3-й группы (СВРОХ) по сравнению с показателями животных группы 2 (РОХ2х) (2.24 ± 0.20 и 1.54 ± 0.08 соответственно). Спустя 2 нед после отравления отмечена увеличенная плотность M_1 -позитивных клеток в неокортексе крыс 2-й группы на 60% ($273 \pm 0.25^*$) (рис. 1б) и 3-й группы на 75% ($3.01 \pm 0.21^*$) по сравнению с показателями контрольной группы (1.7 ± 0.16), а также их уменьшение на 24% в стриатуме у животных 3-й группы ($1.43 \pm 0.08^{\#}$) по сравнению с крысами 2-й группы (1.87 ± 0.07). Через 4 нед после отравления у крыс 2-й группы наблюдается снижение на 20% ($2.77 \pm 0.1^*$) плотности M_1 -позитивных клеток в неокортексе по сравнению с контролем (3.5 ± 0.22), тогда как у животных 3-й группы в гиппокампе отмечено увеличение на 40% количества синаптически активных по M_1 -холинорецептору клеток ($2.52 \pm 0.21^{\#}$) по сравнению с группой 2 (1.8 ± 0.08). Через 6 нед после интоксикации во всех изучаемых отделах мозга крыс статистически значимых отличий плотности распределения M_1 -позитивных нейронов в сравнении с показателями контроля не выявлено.

Резюмируя результаты оценки плотности распределения M_1 -позитивных клеток в отделах головного мозга крыс после отравления параоксоном по двум схемам – РОХ2х (группа 2) и СВРОХ (группа 3) – следует отметить, что наибольшие изменения выявлены в гиппокампе крыс 3-й группы в период от первых суток до 4 нед после отравления. В неокортексе отравленных крыс через 3 сут отмечено уменьшение плотности M_1 -позитивных клеток, с последующим их увеличением через 2 нед после отравления. Стриатум крыс оказался наименее подвержен изменениям плотности M_1 -позитивных клеток вследствие отравления параоксоном в обеих экспериментальных группах (рис. 1г). Незначительное увеличение плотности клеток в стриатуме отмечено только через 1 нед после отравления.

Наиболее выраженное снижение активности АХЭ в гомогенатах головного мозга крыс выявлено через 1 сут после отравления у крыс 2-й группы (на 30%) и через 3 сут – у крыс 3-й группы (на 55%) (рис. 2а). Снижение активности БХЭ на 10-15% отмечено у крыс 3-й группы через 1 и 3 сут после отравления (рис. 2б). Статистически значимых отличий в активности карбоксилэстеразы у животных групп 2 и 3 не выявлено, хотя следует отметить тенденцию к уменьшению активности у крыс 3-й группы через сутки и 2 недели после отравления (рис. 2в).

Известно, что параоксон способен вызывать развитие нейродегенеративных изменений в нейронах как при непосредственном введении в различные отделы головного мозга (гиппокамп), так и при парентеральном поступлении в организм. Кас-

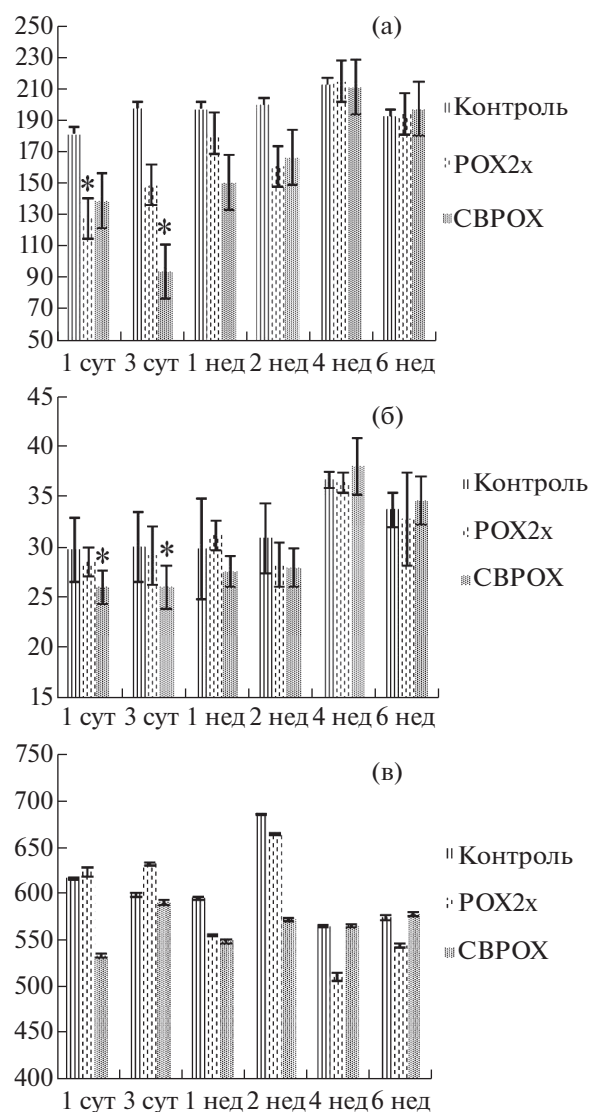


Рис. 2. а) Ацетилхолинэстеразная активность ($\text{мкмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{л}^{-1}$) в гомогенатах головного мозга крыс в разные сроки после отравления параоксоном. * – $p \leq 0.05$ по сравнению с контрольной группой. По оси абсцисс: группа, по оси ординат: (а) активность АХЭ в гомогенатах головного мозга ($\text{мкмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{л}^{-1}$). (б) Бутирилхолинэстеразная активность ($\text{мкмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{л}^{-1}$) в гомогенатах головного мозга крыс в разные сроки после отравления параоксоном. * – $p \leq 0.05$ по сравнению с контрольной группой. По оси абсцисс: группа, по оси ординат: активность БХЭ в гомогенатах головного мозга ($\text{мкмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{л}^{-1}$). (в) Карбоксилэстеразная активность ($\text{мкмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{л}^{-1}$) в гомогенатах головного мозга крыс в разные сроки после отравления параоксоном. По оси абсцисс: группа, по оси ординат: активность КЭ в гомогенатах головного мозга ($\text{мкмоль} \times \text{мин}^{-1} \times \text{л}^{-1}$).

кад патологических изменений в тканях мозга включает в себя развитие клеточного отека, повышение уровня цитоплазматического кальция, индукцию апоптоза, аксональную дегенерацию и ги-

бель нейронов [6]. Параоксон, как и другие высокотоксичные ФОС, увеличивает концентрацию ацетилхолина в головном мозге с последующей активацией мускариновых и никотиновых рецепторов в гиппокампе [7]. Увеличение плотности M_1 -позитивных нейронов наблюдается преимущественно в группе СВРОХ, что свидетельствует о существенной роли карбоксилэстераз в модуляции токсикодинамического ответа при острой интоксикации параоксоном и, вероятно, других ФОС. В литературе описана down-регуляция субтипов M_1 и M_2 -холинорецепторов в головном мозге крыс при воздействии ФОС: понижение их плотности в коре на 21.7%, гиппокампе на 11% и стриатуме на 30.2% [8]. Мы также наблюдали уменьшение плотности M_1 -позитивных клеток в неокортексе крыс через 3 сут и 4 нед после отравления. В то же время в гиппокампе мы выявили повышение плотности M_1 -позитивных клеток через 1, 3 и 7 сут, а в неокортексе — через 2 нед после отравления параоксоном. Степень отклонений от контроля отличается в двух предложенных нами моделях интоксикации с применением специфического (СВДР) и неспецифического (малая доза параоксона) ингибиторов карбоксилэстераз, но направленность изменений совпадает. Возможная взаимосвязь карбоксилэстеразной активности и экспрессии M_1 -рецепторов требует дальнейшего изучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №16-15-00199).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончаров Н.В., Прокофьева Д.С., Войтенко Н.Г., Бабак В.Н., Глашкина Л.М. Молекулярные механизмы холинергической регуляции и дисрегуляции. Токсикол. Вестник. 2: 5-10. 2010. [Goncharov N.V., Prokofieva D.S., Voitenko N.G., Babakov V.N., Glashkina L.M. Molecular mechanism of cholinergic regulation and dysregulation. Toksikologicheskii vestnik. 2: 5–10. 2010. (In Russ)].
2. Goncharov N.V., Nadeev A.D., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. Oxid. Med. Cell. Longev. V. 2017 (2017). 27 p. <https://doi.org/10.1155/2017/9759735>
3. Sobolev V.E., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Sulfated glycosaminoglycans in bladder tissue and urine of rats after acute exposure to paraoxon and cyclophosphamide. Exp. Toxicol. Pathol. 69 (6): 339–347. 2017.
4. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Шмурак В.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В. Крыса (*Rattus norvegicus*) как объект исследования в модели острого отравления фосфорорганическими соединениями. 1. Биохимические аспекты. ЖЭБФ. 55 (2): 28–38. 2019. [Goncharov N.V., Terpilovskii M.A., Shmurak V.I., Belinskaya D.A., Avdonin P.V. The Rat (*Rattus norvegicus*) as a Model Object for Acute Organophosphate Poisoning. 1. Biochemical aspects. J. Evol. Biochem. Physiol. 2. 2019. In print. (In Russ)].
5. Prokofieva D.S., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Microplate biochemical determination of Russian VX: Influence of admixtures and avoidance of false negative results. Anal. Biochem. 424 (2): 108–113. 2012.
6. Chen Y. Organophosphate-induced brain damage: mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. Neurotoxicology, 33:391-400. 2012.
7. Harrison P.K., Sheridan R.D., Green A.C., Scott I.R., Tattersal J.E.H. A guinea pig hippocampal slice model of organophosphate-induced seizure activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 310: 678–686. 2004.
8. Fitzgerald B.B., Costa, L.G. Modulation of M_1 and M_2 muscarinic receptor subtypes following repeated organophosphate exposure in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 117: 122–125. 1992.

The Rat (*Rattus Norvegicus*) as a Model Object for Acute Organophosphate Poisoning. 4. M_1 Cholinergic Receptors and Esterase Activity in Brain Homogenates

V. E. Sobolev^a, V. I. Shmurak^a, and N. V. Goncharov^{a,b,#}

^a Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical and Biological Agency of Russia, St. Petersburg, Russia

^b Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: ngoncharov@gmail.com