

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХЛОРИДА ТРИМЕТИЛОЛОВА

© *Е. В. Першина*^{1,2,*}, *И. Б. Михеева*¹, *Э. Р. Камалтдинова*¹, *В. И. Архипов*^{1,2}

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, 142290, и*

² *Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пущино, 142290; * электронный адрес: pershina-ev@mail.ru*

Нейротоксикант хлорид триметиллола (ТМТ) вызывает повреждения мозга у человека и животных, наиболее выраженные в гиппокампе. В работе изучали гиппокамп крыс Вистар через 1 нед после введения ТМТ (7.5 мг/кг, подкожно). Гистологические исследования показали, что нейротоксикант вызвал наиболее значительные повреждения в полях СА3—СА4 гиппокампа. В этой области на 25 % снизилось число нейронов, в оставшихся клетках выявлены нарушения в морфологии отростков. Оценка экспрессии генов, имеющих отношение к глутаматной эксайтотоксичности, показала увеличение уровня мРНК метаботропных рецепторов глутамата подтипа 4 в гиппокампе крыс после ТМТ-интоксикации. Высказано предположение о том, что этот подтип рецепторов может служить мишенью для фармакологического воздействия, направленного на снижение нейродегенеративных изменений в мозге.

Ключевые слова: гиппокамп, хлорид триметиллола, экспрессия генов, метаботропные рецепторы глутамата

Принятые сокращения: мГлуР — метаботропные рецепторы глутамата, ТМТ — хлорид триметиллола.

Водорастворимое соединение хлорид триметиллола (ТМТ) нашло широкое применение в производстве пластмасс, в сельском хозяйстве для борьбы с насекомыми, бактериями и грибами (Johnson et al., 2014). Экспериментальное исследование с помощью магнитно-резонансной томографии у крыс показало, что под влиянием ТМТ происходят расширение боковых желудочков, изменение в проницаемости гематоэнцефалического барьера и отек мозга (Cecariglia et al., 2014). Свойство ТМТ вызывать повреждения мозга у человека и животных, наиболее выраженные в гиппокампе, нашло применение для экспериментального моделирования нейродегенеративных явлений на мышах и крысах (Geloso et al., 2011; Corvino et al., 2013; Tang et al., 2013). Точные механизмы, с помощью которых ТМТ индуцирует нейродегенерацию, пока неясны, но предполагается, что основной начальной мишенью является митохондриальный мембранно-связанный белок станнин (Billingsley et al., 2006). ТМТ-модель является важным инструментом для изучения межклеточных взаимодействий и сигнальных путей при нейродегенерации, а также для поиска нейропротекторов (Huong et al., 2011; Corvino et al., 2013). Создание терапевтических средств, способствующих выживанию нейронов при повреждающих воздействиях, является актуальной и важной нейробиологической задачей. В последние годы значительно пополнился арсенал лигандов к метаботропным

рецепторам глутамата (мГлуР), обладающих нейропротективными свойствами (Pomierny-Chamiolo et al., 2014; Bruno et al., 2017). Настоящая работа посвящена выяснению роли мГлуР в механизмах повреждения гиппокампа, вызванного ТМТ, чтобы оценить, какие подтипы мГлуР могут служить мишенями для терапевтических воздействий. Для этого исследовали экспрессию генов мГлуР в гиппокампе крыс через 1 нед после инъекции нейротоксиканта.

Материал и методика

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар (n = 18) массой 180—200 г. Животных содержали и использовали в соответствии с правилами Совета Европейского сообщества (директива от 1986 г.) и положения, разработанного комиссией ИТЭБ РАН. ТМТ (Sigma) растворяли в изотоническом растворе NaCl и вводили животным в дозе 7.5 мг/кг подкожно. Для предотвращения развития судорожной активности животным через 24 и 48 ч после ТМТ делали инъекции нембутала в дозе 20 мг/кг внутривенно. Контрольным животным делали инъекции изотонического раствора NaCl в том же объеме. После этого животных отсаживали в клетки и ежедневно взвешивали; воду и корм давали без ограничений.

Гистологические исследования. Через 1 нед после инъекции ТМТ крыс контрольной и экспериментальной групп декапитировали, выделяли гиппокамп, рассекали на фронтальные срезы и фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере 2 ч, затем дофиксировали в 2%-ном растворе четырехоксида осмия на том же буфере. Обезживание проводили в спиртах возрастающей концентрации и в 100%-ном ацетоне. Обезвоженные кусочки пропитывали смесью ацетон—эпон, после этого образцы заключали в эпон-812. Полученные эпоновые блоки резали фронтально на пирамитома LKB для гистологического изучения. На полутонких срезах (9 мкм) определяли линейную плотность нейронов поля СА3—СА4 гиппокампа (100 полей зрения на группу с использованием объектива 20× и окуляра 10×).

Определение экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли из гиппокампа согласно протоколу RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Концентрацию выделенной РНК измеряли спектрофотометрически, качество полученной РНК оценивали электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Праймеры, используемые в работе, были подобраны с использованием базы данных NCBI GenBank:

Actb (бета-актин) F ATGGTGGGTATGGGTCAGAA
R CTTTTCACGGTTGGCCTTAG — референсный ген;
Grm2 (мГлу2) F STATGCCACCCACAGT
GATG R CACAGTGCAGCAAAGTAATC;
Grm3 (мГлу3) F AGGAGTGAAGCTGGGT
GTTC R CACCAATGACTCCTGCAATG;
Grm4 (мГлу4) F AAGGTGCAGTTCGTGAT
TGA R TGAGAAGTTGACGTTCCCTGA;
Grm5 (мГлу5) F GTTCTGAGCAATATGG
GATT R GATCCATCTACACAGCGTACCA;
Grm7 (мГлу7) F CAGATCGCAAATGCACA
GGAC R GGGTCCAGCACTACCATTGAA;
GABRA1 (альфа-1 субъединица ГАМК А рецептора) F
CCGTGTCAGACCACGATATG R
TACAGCAGTGTGCCATCCTC;
Snn (станнин) F CCACGACTGGGGTAGTCACA R
ATGGCCCTTGGCAGAATAC.

Реакцию обратной транскрипции проводили по стандартному протоколу, разработанному производителем обратной транскриптазы (Fermentas, Литва). Количественную ПЦР в реальном времени проводили в детектирующем амплификаторе ДТ-Lite (ДНК-Технология, Россия), используя готовую смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) с предварительно синтезированными праймерами. Качество и размер продуктов ПЦР оценивали электрофоретически в 3%-ном агарозном геле. Количество мРНК в гиппокампе определяли по пороговому циклу, зарегистрированному в qRT-PCR, с последующим расчетом ампликонов по методу $2^{-\Delta\Delta t}$ (Schmittgen, Livak, 2008).

Статистическая обработка. Достоверность различий полученных результатов между группами оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением, применяя тест Даннета с помощью компьютерной программы Prizm 5.0 для Windows (GraphPad Software, США). Различия между группами считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

После инъекции ТМТ в течение нескольких дней у животных снижалась масса тела. Через 1 нед после инъекции состояние животных улучшилось, хотя масса тела оставалась ниже, чем у животных контрольной группы, что подтвердило результаты, полученные нами ранее (Першина, Архипов, 2016). Гистологические исследования показали, что ТМТ вызвал изменение морфологии гиппокампа, особенно выраженные в полях СА3—СА4 (рис. 1). В гиппокампе контрольных животных большинство нейронов поля СА3 имело светлую цитоплазму и содержало светлые округлые или слегка овальные ядра, в которых наблюдали относительно небольшое количество гетерохроматина. У крыс, подвергшихся действию ТМТ, количество нейронов в полях СА3—СА4 гиппокампа заметно снизилось. В оставшихся нейронах форма ядра существенно не изменилась, но форма нейронов отличалась от нормальной: произошли изменения структуры перикарионов и их отростков. Были выявлены нейроны с наличием дегенеративных изменений: они имели признаки набухания, клеточная мембрана имела нечеткий контур. Среди светлых нейронов были видны гиперхромные клетки, апикальные дендриты плохо различимы. При подсчете удельного количества клеток в полях гиппокампа СА3—СА4 было выявлено снижение их количества после воздействия ТМТ примерно на 25 % по сравнению с контрольными животными (14.4 ± 2.3 и 19.3 ± 2.7 на $10\,000\text{ мкм}^2$; $P < 0.05$). Эти изменения подтверждают нейротоксические свойства ТМТ, избирательно затрагивающие гиппокампальные пирамидные нейроны. Известно, что у крыс основные области гиппокампа, повреждаемые ТМТ, — это поля СА1—СА4, а у мышей — зубчатая фасция (Lattanzi et al., 2013; Lee et al., 2016). Какие именно поля повреждаются в первую очередь зависит от дозы нейротоксиканта, в нашей работе особую чувствительность проявили нейроны полей СА3 и СА4, что мы наблюдали также при действии экаситотоксина каиновой кислоты (Arkhipov et al., 2014).

Уровень экспрессии генов глутаматных рецепторов в гиппокампе после воздействия ТМТ существенно изменился лишь для одного гена, кодирующего мГлу4 (рис. 2). Уровень экспрессии генов, кодирующих другие пресинаптические мГлуР — мГлу2/3 и мГлу7, а также постсинаптические мГлу5 рецепторы, не изменился. Кроме того, содержание мРНК альфа-1 субъединицы ГАМК-А рецептора, кодируемого геном *GABRA1*, также оставалось на уровне контроля. В некоторых работах предполагалось, что первичной мишенью действия ТМТ является мембранно-связанный белок станнин (Billingsley et al., 2006). Его экспрессия в гиппокампе после инъекции нейротоксиканта не изменялась. Можно полагать, что станнин действительно является лишь первичной мишенью действия ТМТ, а через 1 нед после действия ТМТ реализуются иные клеточные процессы, приводящие к нейродегенеративным явлениям, таким как экаситотоксичность и нейровоспаление. Повышенное содержание мРНК для мГлу4 позволяет предположить потребность в увеличении этого подтипа мГлуР для компенсации гиппокампальных повреждений. Рецепторы этого подтипа располагаются на пресинаптических терминалах в активной зоне и опосредуют свое действие через белок Gi/o; их активация ингибирует высвобождение глутамата (Mouanovova et al., 2011; Nicoletti et al., 2011). Отметим, что в нашей работе была поставлена задача определения содер-

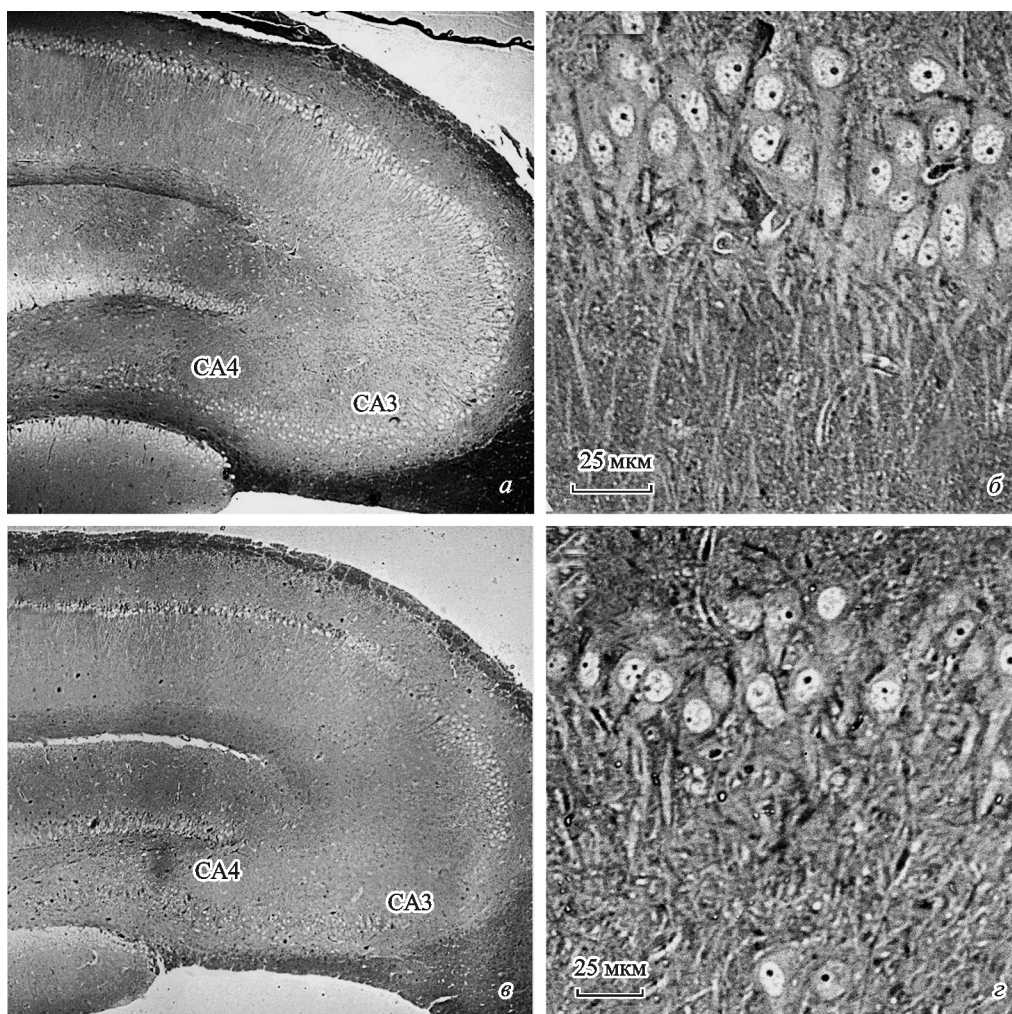
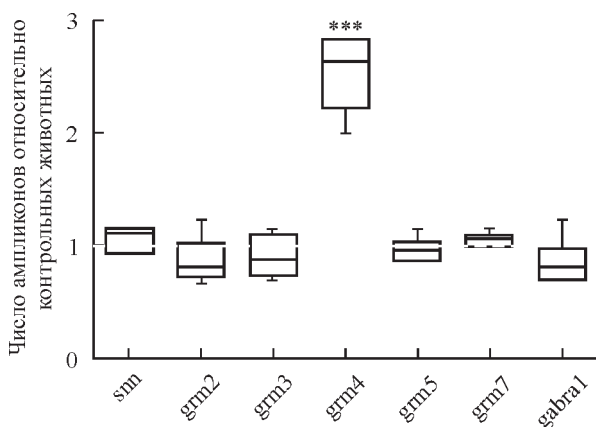


Рис. 1. Гистологические препараты гиппокампа контрольных крыс (а, б) и крыс после введения ТМТ (в, г). а, б — панорамные срезы гиппокампа, об. 20×; в, г — фрагменты области CA3 при большем увеличении, об. 100×. После воздействия ТМТ отмечают-ся деградация слоя CA3—CA4 (в), а также изменения структуры тел пирамидных нейронов и их отростков (г).

жания мРНК в целом гиппокампе, а не в его отдельных частях, так как предполагается, что интегральный показатель уровня экспрессии генов послужит основой для разработки новых фармакологических подходов, направленных на усиление компенсаторных механизмов. Если мГлу4 рецепторы рассматривать в качестве мишени для терапевтического вмешательства, следует применять их



агонисты, чтобы нормализовать уровень экспрессии их генов. Реципрокное взаимоотношение активности мГлу4 рецепторов и уровня экспрессии их генов показано нами в предыдущей работе, в которой фармакологическая активация мГлу4 рецепторов с помощью позитивного аллостерического модулятора TCN 238 приводила к снижению уровня экспрессии генов для этих рецепторов в гиппокампе (Pershina, Arkhipov, 2016). Агонисты мГлу4 рецепторов обладают нейропротекторными свойствами в экспериментальных моделях эксайтотоксичности и бета-амилоидной токсичности (Bruno et al., 2000), а также при ишемии (Moynova et al., 2011). Наличие взаимосвя-

Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов в гиппокампе крыс (n = 10) через 1 нед после инъекции ТМТ (уровень экспрессии в гиппокампе контрольных животных принят за единицу, горизонтальная штриховая линия).

Количество мРНК в гиппокампе оценивали по пороговому циклу, с последующим расчетом ампликонов по методу $2^{-\Delta\Delta t}$ (Schmittgen, Livak, 2008). Число ампликонов отображено в виде диаграммы, границами которой служат первый и третий квартили, линия внутри бокса — медиана, концы вертикальных отрезков — крайние значения статистически значимой выборки. *** $P = 0.0007$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением, тест Даннета).

зи активности рецепторов и уровня экспрессии их генов дает возможность рассматривать данные об экспрессии генов как важный источник информации о клеточных процессах, происходящих в мозге.

Таким образом, изменения гиппокампа, вызванные действием нейротоксиканта ТМТ, характеризуются преимущественной гибелью пирамидных клеток в полях СА3—СА4 и последующей реорганизацией их связей, о чем можно судить по изменению направленности их дендритов. Через 1 нед после инъекции ТМТ экспрессия гена мембранно-связанного белка станнина не отличается от контрольного уровня, и можно предположить, что он играет ключевую роль лишь на самых начальных этапах клеточных повреждений. Можно полагать, что важную роль в механизмах действия ТМТ на гиппокамп играют мГлу4 рецепторы, которые участвуют в пластических перестройках, направленных на снижение глутаматной эксцитотоксичности в гиппокампе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект мол_а 16-34-01167).

Список литературы

- Першина Е. В., Архипов В. И. 2016. Когнитивные нарушения у крыс при моделировании нейродегенерации в гиппокампе с помощью нейротоксиканта хлорида триметиллола. Современные проблемы науки и образования. 4 : 225. (Pershina E. V., Arkhipov V. I. 2016. Cognitive impairment in rats in modeling of neurodegeneration in the hippocampus with the help of neurotoxicant trimethyltin chloride. Modern Problems of Science and Education. 4 : 225.)
- Arkhipov V., Kapralova M., Pershina E., Gordon R. 2014. Delayed treatments with pharmacological modulators of pre- and postsynaptic mGlu receptors rescue the hippocampus from kainate-induced neurodegeneration. Neurosci. Lett. 570 : 5—9.
- Billingsley M. L., Yun J., Reese B. E., Davidson C. E., Buck-Koehntop B. A., Veglia G. 2006. Functional and structural properties of stannin: roles in cellular growth, selective toxicity, and mitochondrial responses to injury. J. Cell. Biochem. 98 : 243—250.
- Bruno V., Caraci F., Copani A., Matrisciano F., Nicoletti F., Battaglia G. 2017. The impact of metabotropic glutamate receptors into active neurodegenerative processes: a «dark side» in the development of new symptomatic treatments for neurologic and psychiatric disorders. Neuropharmacology. 115 : 180—192.
- Ceccariglia S., D'altocolle A., Del Fa' A., Silvestrini A., Barba M., Pizzolante F., Repele A., Michetti F., Gangitano C. 2014. Increased expression of Aquaporin 4 in the rat hippocampus and cortex during trimethyltin-induced neurodegeneration. Neurosci. 274 : 273—288.
- Corvino V., Marchese E., Michetti F., Geloso M. C. 2013. Neuroprotective strategies in hippocampal neurodegeneration induced by the neurotoxicant trimethyltin. Neurochem. Res. 38 : 240—253.
- Geloso M. C., Corvino V., Michetti F. 2011. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes. Neurochem. Int. 58 : 729—738.
- Huong N. Q., Nakamura Y., Kuramoto N., Yoneyama M., Nagashima R., Shiba T., Yamaguchi T., Hasebe S., Ogita K. 2011. Indomethacin ameliorates trimethyltin-induced neuronal damage *in vivo* by attenuating oxidative stress in the dentate gyrus of mice. Biol. Pharm. Bull. 34 : 1856—1863.
- Johnson G. A., Calabrese E., Little P. B., Hedlund L., Qi Y., Badaea A. 2014. Quantitative mapping of trimethyltin injury in the rat brain using magnetic resonance histology. Neurotoxicology. 42 : 12—23.
- Lattanzi W., Corvino V., Di Maria V., Michetti F., Geloso M. C. 2013. Gene expression profiling as a tool to investigate the molecular machinery activated during hippocampal neurodegeneration induced by trimethyltin (TMT) administration. Int. J. Mol. Sci. 14 : 16 817—16 835.
- Lee S., Yang M., Kim J., Kang S., Kim J. C., Jung C., Shin T., Kim S. H., Moon C. 2016. Trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration: a mechanism-based review. Brain Res. Bull. 125 : 187—199.
- Moyanova S. G., Mastroiacovo F., Kortenska L. V., Mitreva R. G., Fardone E., Santolini I., Sobrado M., Battaglia G., Bruno V., Nicoletti F., Ngomba R. T. 2011. Protective role for type 4 metabotropic glutamate receptors against ischemic brain damage. J. Cereb. Blood Flow Metab. 31 : 1107—1118.
- Nicoletti F., Bockaert J., Collingridge G. L., Conn P. J., Ferraguti F., Schoepp D. D., Wroblewski J. T., Pin J. P. 2011. Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. Neuropharmacology. 60 : 1017—1041.
- Pershina E. V., Arkhipov V. I. 2016. Subacute activation of mGlu4 receptors causes the feedback inhibition of its gene expression in rat brain. Life Sci. 153 : 50—54.
- Pomierny-Chamiolo L., Rup K., Pomierny B., Niedzielska E., Kalivas P. W., Filip M. 2014. Metabotropic glutamatergic receptors and their ligands in drug addiction. Pharmacol. Therapeutics. 142 : 281—305.
- Schmittgen T. D., Livak K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat. Protoc. 3 : 1101—1108.
- Tang X., Wu X., Dubois A. M., Sui G., Wu B., Lai G., Gong Z., Gao H., Liu S., Zhong Z., Lin Z., Olson J., Ren X. 2013. Toxicity of trimethyltin and dimethyltin in rats and mice. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 90 : 626—633.

Поступила 7 III 2018

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN THE HIPPOCAMPUS AFTER EXPOUSER TRIMETHYLTIN CHLORIDE IN RATS

E. V. Pershina,^{1,2,*} I. B. Mikheeva,¹ E. R. Kamaltdinova,¹ V. I. Arkhipov^{1,2}

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, 142290, and

² Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, 142290;

* e-mail: pershina-ev@mail.ru

Neurotoxicant trimethyltin chloride (TMT) causes brain damage in humans and animals that is, most pronounced in the hippocampus. The hippocampus of Wistar rats was studied one week after treatment with TMT (7.5 mg/kg, subcutaneously). Histological studies showed that the neurotoxicant caused the most significant neuronal lesions in the CA3—CA4 fields of the hippocampus. In this area, the number of neurons decreased by

25 %, and the remaining cells showed abnormalities in the morphology of outgrowths. Evaluation of gene expression related to glutamate excitotoxicity showed an increase in mRNA level of metabotropic glutamate receptors of subtype 4 in the rat hippocampus after TMT intoxication. It has been suggested that this receptor subtype can serve as a target for pharmacological action aimed at reducing of neurodegenerative changes in the brain.

Key words: hippocampus, trimethyltin chloride, gene expression, metabotropic glutamate receptors
