

УДК 57.04 :575.8

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АТРОПИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *Ache* И *Bche* ПРИ ОТРАВЛЕНИИ КРЫС МАЛАТИОНОМ

А.В. Бабкин¹, И.С. Бердинских¹, Н.С. Осечкина², Г.В. Назаров¹, М.А. Юдин¹, В.Н. Быков¹

¹Научно-исследовательский испытательный институт (военной медицины) Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Федеральное государственное учреждение науки «Институт Токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

На модели отравления крыс малатионом в дозе 1 ЛД₅₀ охарактеризована экспрессия генов *Ache* и *Bche* в образцах тканей на фоне лечения атропином. Отравление малатионом вызывает достоверное снижение относительного уровня экспрессии генов *Ache* и *Bche* в головном мозге и печени. Уменьшение экспрессии исследованных генов составило более 50 % и сохранялось на этом уровне в течение 14 суток. Установлено, что лечение атропином оказывает протективное действие к снижению уровня экспрессии в головном мозге. Полученные данные указывают на взаимосвязь эффективности лечения с показателями экспрессии изучаемых генов.

Ключевые слова: экспрессия гена, ген *Ache*, ген *Bche*, малатион, атропин.

Введение. До настоящего времени оценка активности холинэстеразы (ХЭ) остается наиболее точным критерием диагностики поражения фосфорорганическими соединениями (ФОС) по степени тяжести, а также показателем адекватности проведения терапии. Малатион используется в качестве модельного ФОС при экспериментальном исследовании динамики развития интоксикации и эффективности проводимой терапии [1].

Показано, что различный эстеразный статус определяет устойчивость организма к воздействию ФОС и, в том числе малатиона [2]. Так значительная активность бутирилхолинэстеразы (БХЭ) в плазме крови мышей обуславливает более высокую резистентность животных данного вида к отравлению ФОС, по сравнению с крысами [3]. Несоответствие профиля ферментативной активности у обезьян и человека завышает параметры защитной эффективности и лечебного эффекта препаратов при экстраполяции результатов на человека [4].

С угнетением ацетилхолинэстеразы (АХЭ) связывают нарушения нервно-мышечной передачи и развитие холинопозитивной симптоматики при поражении ФОС. В тоже время первичный контакт токсиканта при попадании в организм происходит с БХЭ плазмы крови [5]. Данное обстоятельство указывает на необходимость исследования активности обоих ферментов при диагностике отравлений ФОС.

Помимо эстеразного статуса, устойчивость к воздействию ФОС может быть обусловлена уровнем экспрессии целевых генов в постинтоксикационном периоде отравлений. Известно, что ферментативная активность ХЭ определяется молекулярно-генетическими особенностями, в том числе уровнем экспрессии генов *Ache* и *Bche*, кодирующих АХЭ (шифр фермента КФ 3.1.1.7) и БХЭ (шифр фермента КФ 3.1.1.8). Анализ информационных источников показал, что к настоящему времени недостаточно полно рассмотрена динамика изменения экспрессии генов *Ache* и *Bche*

Бабкин Александр Владимирович (Babkin Aleksandr Vladimirovich), научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, babkinnik@yandex.ru

Бердинских Ирина Сергеевна (Berdinskih Irina Sergeevna), научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, irina_berdinskih@mail.ru.

Осечкина Наталья Сергеевна (Osechkina Natalya Sergeevna), научный сотрудник ФГУН «Институт Токсикологии» ФМБА России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, dunats@rambler.ru.

Назаров Георгий Валерьевич (Nazarov Georgiy Valerevich), доктор химических наук, доцент, начальник отдела НИИИ ВМ ВМедА им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, denis-100@list.ru.

Юдин Михаил Анатольевич (Yudin Mikhail Anatol'evich), кандидат медицинских наук, доцент, заместитель начальника отдела НИИИ (ВМ) ВМедА им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, mikhail.judin@gmail.com.

Быков Владимир Николаевич (Bykov Vladimir Nikolaevich), доктор медицинских наук, профессор, начальник НИИЦ (МБЗ) НИИИ (ВМ) ВМедА им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, bykov_imm@yahoo.com.

на экспериментальных моделях отравления животных некоторыми ФОС [6, 7, 8]. Также отсутствует информация о характере влияния малатиона на уровень экспрессии генов *Ache* и *Bche* в постинтоксикационном периоде, остаются не исследованными особенности экспрессии рассматриваемых генов на фоне терапии.

Цель данного исследования – изучение влияния атропина на экспрессию генов *Ache* и *Bche* в образцах тканей крыс на фоне отравления малатионом.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Приказ Минздрава России от 23 августа 2010 г. № 708 н) на белых нелинейных крысах-самцах массой 180-240 г, содержащихся в условиях вивария (питомник «Рапполово», Ленинградская область). За 12 ч до начала эксперимента животных лишали доступа к пище. Для моделирования отравления животным однократно внутривенно (в/ж) вводили малатион в дозе 1 ЛД₅₀ (410 мг/кг). В качестве антидота отравлений ФОС животным вводили атропин в дозе 2 мг/кг [9]. Животным без лечения вводили стерильную воду для инъекций из расчета 1 мл/кг. Наблюдение за животными согласно «Руководства...» осуществляли в течение 14 суток [9].

Тотальную РНК для анализа экспрессии выделяли из образцов головного мозга, печени и крови крыс с использованием автоматической станции «NorDiag Arrow» (Швеция). Выделенную РНК переводили в кДНК по протоколу High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems (США).

Экспрессию генов *Ache* и *Bche* в образцах тканей крыс оценивали через 1, 7 и 14 суток после введения малатиона в дозе 1 ЛД₅₀ методом ПЦР-РВ, по отношению к гену-рефери *18s-rRNA* на амплификаторе «7900HT Fast Real-Time PCR System», Applied Biosystems (США), с использованием тест-систем Applied Biosystems (Rn00596883_m1 и Rn00576087_m1). Термоциклирование осуществляли по следующей программе: 50°C – 120 секунд – 1 цикл; 95°C – 600 секунд – 1 цикл; (95°C – 15 секунд, 60°C – 60 секунд) – 45 циклов.

Относительный уровень экспрессии генов (УЭ, %) определяли по формуле [10]:

$$\text{УЭ} = \frac{\text{количество мРНК определяемого гена}}{\text{количество мРНК гена } 18s-rRNA} \times 100\%$$

Статистическую обработку результатов производили в программе Statistica 8.0 с использованием критерия Крускала-Уоллиса.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований у всех экспериментальных животных не было выявлено экспрессии генов *Ache* и *Bche* в образцах крови, в то же время установлен значимый уровень экспрессии указанных

генов в образцах головного мозга и печени.

УЭ генов *Ache* и *Bche* в головном мозге крыс до (интактные) и через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом в дозе 1 ЛД₅₀ (с лечением атропином (опыт) и без лечения (контроль)) показаны на рисунке 1.

Анализ результатов (рис. 1, а) показал, что у животных контрольной группы через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом в дозе 1 ЛД₅₀ выявлено достоверное снижение УЭ гена *Ache* в головном мозге.

У крыс, получавших лечение атропином 2 мг/кг, изменения УЭ гена *Ache* через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом достоверно ($p < 0,05$) не отличались от интактной группы.

Установлено, что УЭ гена *Bche* в головном мозге интактных крыс превышает показатель экспрессии гена *Ache* в 2,8 раза. По этому показателю характерен широкий разброс внутри одной популяции крыс (рис.1, б).

При исследовании УЭ гена *Bche* в головном мозге крыс выявлено достоверное снижение ее в среднем в 1,5-2 раза после отравления малатионом в дозе 1 ЛД₅₀. В этой группе снижение уровня экспрессии прослеживалось на протяжении всего срока наблюдения.

Применение атропина оказывало положительное влияние на УЭ *Bche* в головном мозге. Несмотря на существенное снижение показателя через 1 сутки после отравления малатионом в дальнейшие сроки отмечали восстановление экспрессии (7 суток) и ее рост в 1,5 раза (14 суток) по сравнению с интактными животными. Через 14 суток после начала эксперимента экспрессия *Bche* в головном мозге на фоне введения атропина была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у не леченных животных.

УЭ генов *Ache* и *Bche* в печени крыс до (интактные) и через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом в дозе 1 ЛД₅₀ (с лечением атропином (опыт) и без лечения (контроль)) показаны на рисунке 2.

У крыс через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом в дозе 1 ЛД₅₀, независимо от того вводился атропин или нет, выявляли достоверное снижение УЭ гена *Ache* в печени (рис. 2, а). Уменьшение уровня экспрессии данного гена в печени составило около 50 % и сохранялось на протяжении всего срока регистрации показателей.

Схожие результаты наблюдались и при анализе экспрессии гена *Bche* в печени крыс (рис. 2, б). Установлено, что у крыс контрольной группы (без лечения атропином) через 1, 7 и 14 суток после введения малатиона в дозе 1 ЛД₅₀ выявляли статистически значимое снижение УЭ гена *Bche* в печени. Уменьшение УЭ данного гена составило более 70 % и сохранялось на протяжении все-

го срока регистрации показателей. Применение атропина компенсировало снижение УЭ гена *Bche* в печени через 1 сутки после введения токсиканта. Через 7 и 14 суток после введения малатиона у опытных животных также выявляли снижение УЭ гена *Bche*.

Из результатов настоящего исследования можно заключить, что у животных после отравления малатионом выявлено достоверное снижение УЭ гена *Ache* и *Bche* в головном мозге и печени. Максимум снижения в 3 раза отмечен по окончании 1 суток интоксикации для экспрессии гена *Ache*. В отношении экспрессии гена *Bche* снижение относительно интактных значений составило 1,5-2 раза. Установлено, что УЭ гена *Bche* интактных

крыс превышает показатель экспрессии гена *Ache* около 3 раз. Снижение экспрессии указанных выше генов при отравлении малатионом, вероятно, может объясняться его влиянием на транскрипционный аппарат клетки, функциональная активность которого в печени выше, чем в других органах [11, 12]. Малатион, действуя как «негативный» регулятор транскрипции генов *Ache* и *Bche*, может приводить к терминации данного процесса и, как следствие, к снижению уровня мРНК.

На фоне терапии атропином 2 мг/кг изменения экспрессии генов *Ache* и *Bche* в головном мозге крыс через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом от интактной группы достоверно не от-

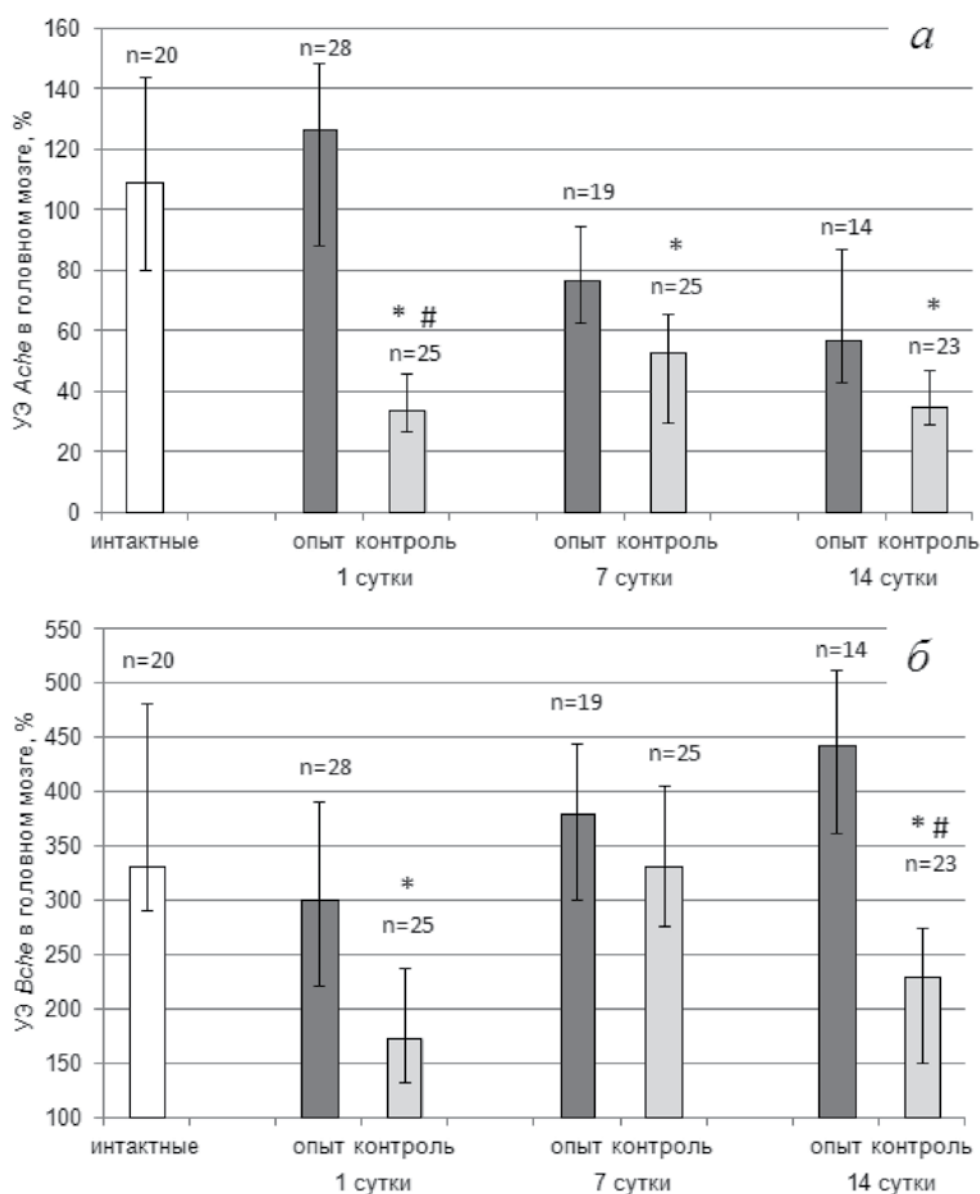


Рис. 1 - Относительный уровень экспрессии генов *Ache* (а) и *Bche* (б) в головном мозге крыс после применения атропина на фоне отравления малатионом, Медиана (25; 75 перцентиль)
 Примечание: * - значимое ($p < 0,05$) различие с группой «интактные»; # - значимое ($p < 0,05$) различие групп: «опыт» и «контроль»; n - количество животных в группе

личались. Атропин не влиял на уровень экспрессии гена *Ache* в печени. Уменьшение УЭ данного гена составило до 70 % и сохранялось на этом уровне на протяжении всего срока регистрации показателей. Схожие результаты наблюдались и при анализе экспрессии гена *Bche* в печени крыс. Однако применение атропина компенсировало снижение УЭ гена *Bche* в печени только через 1 сутки после введения токсиканта. Через 7 и 14 суток после введения малатиона у опытных животных наблюдалось снижение УЭ гена *Bche*. Выявленная закономерность может объясняться «позитивным» влиянием атропина на регуляторные элементы генов *Ache* и *Bche* (промоторы, энхансеры) и факторы транскрипции, которые

инициируют процесс транскрипции и приводит к наработке и увеличению мРНК в клетке [13].

Полученные данные указывают на способность атропина предупреждать резкое снижение экспрессии генов *Ache* и *Bche* в головном мозге в острый период отравления и указывают на целесообразность учета УЭ при разработке перспективных средств терапии отравлений ФОС. Вместе с тем, знания об уровне экспрессии генов *Ache* и *Bche* могут быть использованы при определении критериев оценки эффективности терапии и построения прогноза исхода интоксикации.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования изучено влияние атропина на уровень экспрессии генов *Ache* и *Bche* на

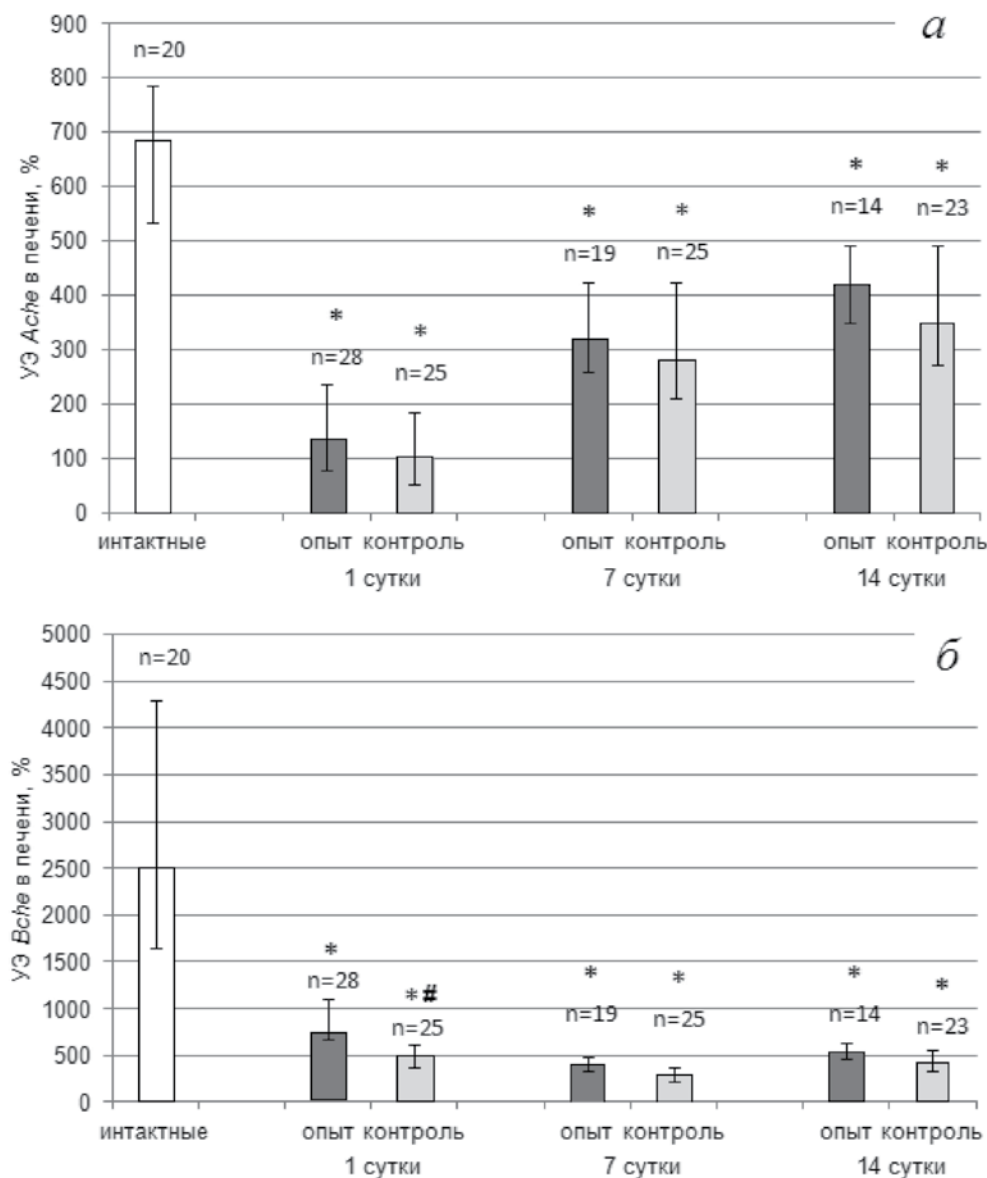


Рис. 2 - Относительный уровень экспрессии генов *Ache* (а) и *Bche* (б) в печени крыс после применения атропина на фоне отравления малатионом, Медиана (25; 75 перцентиль)

Примечание: * - значимое ($p < 0,05$) различие с группой «интактные»; # - значимое ($p < 0,05$) различие групп: «опыт» и «контроль»; n - количество животных в группе

фоне отравления крыс малатионом. При отравлении крыс малатионом выявлено достоверное снижение УЭ гена *Ache* и *Bche* в головном мозге и печени. Установлено, что применение атропина препятствует снижению УЭ генов *Ache* и *Bche* в головном мозге крыс через 1, 7 и 14 суток после отравления малатионом и предупреждает

снижение УЭ гена *Bche* в печени у животных через 1 сутки интоксикации. Показатели уровней экспрессии изучаемых генов возможно использовать при оценке и прогнозировании эффективности перспективных средств лечения отравлений ФОС (реактиваторы ХЭ, гепатотропные препараты и т.д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шиллов В.В. и др. Изучение эффективности лекарственных средств на модели экспериментальной нейропатии при отравлении малатионом. // Медицина труда и промышленная токсикология. 2013; 8: 13-18.
2. Aurbek N. Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudocatalytic scavenger inorganophosphate poisoning: A kinetic analysis. *Toxicology*. 2009; 259: 133-139.
3. Naik R.S. et al. Development and validation of a simple assay for the determination of cholinesterase activity in whole blood of laboratory animals. // *J. Appl. Toxicol.* 2013; 33 (4): 290-300.
4. Bahar F.G. et al. Species difference of

- esterase expression and hydrolase activity in plasma. // *J. Pharm. Sci.* 2012; 101 (10): 3979-3988.
5. Bajgar J. et al. Changes of cholinesterase activities in the rat blood and brain after sarin intoxication pretreated with butyrylcholinesterase. // *Drug. Chem. Toxicol.* 2007; 30 (4): 351-359.
6. Бабкин А.В. и др. Ассоциация полиморфных вариантов гена *Bche* с активностью бутирилхолинэстеразы крыс после отравления малатионом. // *Токсикологический вестник*. 2014; 5: 16-20.
7. Lopez-Granero C. et al. Chlorpyrifos-, diisopropylphosphorofluoridate-, and

- parathion-induced behavioral and oxidative stress effects: are they mediated by analogous mechanisms of action. // *Toxicol. Sci.* 2013; 131 (1): 206-216.
8. Xing, H. et al. Alterations in mRNA expression of acetylcholinesterase in brain and muscle of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2010; 73 (7): 1666-1670.
9. Миронов А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть М.: Гриф и К; 2012.
10. Осеchkina Н.С. и др. Влияние экспрессии и полиморфизма генов, кодирующих ГАМК-рецепторы, на тяжесть депримирующего действия этанола у

- крыс. // *Токсикологический вестник*. 2014; 6: 22-28.
11. Rhee J. S. et al. Effect of pharmaceuticals exposure on acetylcholinesterase (AChE) activity and on the expression of AChE gene in the monogonont rotifer *Brachionuskoreanus*. // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2013; 158 (4): 216-224.
12. Zhen H. Toxic effects of HgCl₂ on activities of SOD, AChE and relative expression of SOD, AChE, CYP1A1 of zebrafish. // *Ecotoxicology*. 2014; 23 (10): 1842-1845.
13. Charoenying T. et al. Effects of paraoxon on neuronal and lymphocytic cholinergic systems. // *Toxicol. Pharmacol.* 2011; 31 (1): 119-128.

REFERENCES:

1. Shilov V.V. et al. Study of the effectiveness of drugs in experimental models of poisoning neuropathy in malathion. // *Occupational medicine and industrial ecology*. 2013; 8: 13-18 (in Russian).
2. Aurbek N. Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudocatalytic scavenger inorganophosphate poisoning: A kinetic analysis. // *Toxicology*. 2009; 259: 133-139.
3. Naik R.S. et al. Development and validation of a simple assay for the determination of cholinesterase activity in whole blood of laboratory animals. // *J. Appl. Toxicol.* 2013; 33 (4): 290-300.

4. Bahar F.G. et al. Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma. // *J. Pharm. Sci.* 2012; 101 (10): 3979-3988.
5. Bajgar J. et al. Changes of cholinesterase activities in the rat blood and brain after sarin intoxication pretreated with butyrylcholinesterase. *Drug. Chem. Toxicol.* 2007; 30 (4): 351-359.
6. Babkin A.V. et al. Association of *Bche* gene polymorphic variants with activity of rat butyrylcholinesterase after exposure to malathion. // *Toxicological Review*. 2014; 5: 16-20 (in Russian).
7. Lopez-Granero C. et al. Chlorpyrifos-, diisopropylphosphorofluoridate-, and

- oxidative stress effects: are they mediated by analogous mechanisms of action. // *Toxicol. Sci.* 2013; 131 (1): 206-216.
8. Xing, H. et al. Alterations in mRNA expression of acetylcholinesterase in brain and muscle of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2010; 73 (7): 1666-1670.
9. Mironov A.N. Guidelines for pre-clinical trials of drugs. Part Moscow. 2012 (in Russian).
10. Osechkina N.S. et al. The expression's influence and polymorphism of genes, which encode gaba-receptors, on left ethanol influence in laboratory rats. // *Toxicological Review*. 2014; 6: 22-28 (in Russian).

11. Rhee J. S. et al. Effect of pharmaceuticals exposure on acetylcholinesterase (AChE) activity and on the expression of AChE gene in the monogonont rotifer *Brachionuskoreanus*. // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2013; 158 (4): 216-224.
12. Zhen H. Toxic effects of HgCl₂ on activities of SOD, AChE and relative expression of SOD, AChE, CYP1A1 of zebrafish. // *Ecotoxicology*. 2014; 23 (10): 1842-1845.
13. Charoenying T. et al. Effects of paraoxon on neuronal and lymphocytic cholinergic systems. // *Toxicol. Pharmacol.* 2011; 31 (1): 119-128.

A.V. Babkin¹, I.S. Berdinskih¹, N.S. Osechkina², G.V. Nazarov¹, M.A. Yudin¹, V.N. Bykov¹

A STUDY OF ATROPINE INFLUENCE ON ACHE AND BCHE GENES EXPRESSION IN RATS EXPOSED TO MALATHION POISONING

¹Scientific Research Test Institute of Military Medicine of Medical Military Academy named after S.M. Kirov (The Russian Federation Department of Defense), 195043, Saint-Petersburg, Russian Federation

²Federal State Scientific Institution «Institute of Toxicology «Federal Medico-Biological Agency» Russia, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

Levels of expression of *Ache* and *Bche* genes in tissue samples were investigated in rats exposed to malathion in dose of 1 LD₅₀ and following atropine treatment. Malathion poisoning causes statistically significant decrease in levels of expression of *Ache* and *Bche* genes in brain and liver. The decrease of expression of these genes was greater than 50 % and remained at this level during 14 days. It was shown that atropine treatment prevents decrease in *Ache* gene expression in brain. These findings suggest the possibility of gene expression level assessment in brain during the screening of promising treatments for OP poisoning.

Keywords: gene expression, gene *Ache*, gene *Bche*, malathion, atropine.

Переработанный материал поступил в редакцию 16.09.2015 г.