

## ОТДАЛЕННЫЕ НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРЕНАТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СЕЛЕКТИВНЫХ М- и Н-ХОЛИНОЛИТИКОВ

Байрамов А.А., Полетаева А.О., Юкина Г.Ю., Богданова Л.А..

СПбГМУ им акад. И.П.Павлова, академическая группа акад. РАМН Ф.Г.Углова при кафедре госпитальной хирургии для субординаторов, С.-Петербург.

*197342, Санкт-Петербург, ул. Сердобольская, д. 64, литер Д, офис 519;*

*Тел.: +7 (812) 609-99-38*

### Введение

Пренатальное воздействие различных химических препаратов и экологических токсикантов (никотина, хлорорганических соединений (ХОС), барбитуратов и др.), обладающих холинотропными свойствами, способно вызвать нарушение онтогенетического развития основных нейромедиаторных систем головного мозга в перинатальном периоде [1, 7, 12]. Происходит долговременное нарушение в развитии синаптической функции нейронов мозга в постнатальном периоде и изменение поведенческой деятельности у половозрелого потомства [1, 3, 4, 13]. Действие этих факторов обусловлено дисфункцией холинергической медиаторной системы, что полиморфным образом сказывается на развитии и функционировании различных структур и нейромедиаторных систем мозга. Помимо многообразных изменений, выявляемых в развитии и функционировании самой холинергической системы, отмечаются нарушения в развитии основных медиаторных систем развивающегося мозга эмбрионов, а также отдаленные нейрохимические изменения в структурах головного мозга потомства в постнатальном периоде [2, 5, 9-11, 14].

В связи с большим значением для последующей жизни состояния здоровья в перинатальном периоде проведено множество исследований по изучению воздействия различных химических факторов и экологических токсикантов, обладающих холинотропными свойствами, на развитие мозга в раннем онтогенезе. В то же время в литературе отсутствуют исследования, посвященные оценке перинатального периода после экспозиции селективных холиноблокаторов. В связи с изложенным, целью данной работы явилось исследование у 2-месячного потомства крыс отдаленных эффектов пренатального воздействия центральных М- и Н-холинолитиков метамизила и ганглерона на нейрохимический статус некоторых структур мозга, участвующих в регуляции нейроэндокринной и поведенческих функций организма.

## Материалы и методы

Беременным самкам крыс линии Wistar на разных сроках беременности (9-11, 12-14 и 17-19 сутки гестации) производились трёхразовые инъекции (1 раз в день) Н-холиноблокатора ганглерона в дозе 10 мг/кг и М-холиноблокатора метамизила в дозе 2 мг/кг. Дозы препаратов определялись селективностью их холинолитического действия. Опытные группы формировали по срокам пренатального введения препаратов. Потомство интактных крыс использовалось в качестве контрольной группы. Крысят в возрасте 2 месяцев декапитировали без предшествующей анестезии. Головной мозг немедленно погружали в жидкий азот. Гипоталамус и гиппокамп, выделенные в криостате при  $-20^{\circ}\text{C}$ , хранились в жидком азоте до подготовки образцов к хроматографическому анализу.

Концентрацию нейромедиаторов: дофамина (ДА), норадреналина (НА), серотонина (5-ГТ) и их метаболитов определяли в выделенных структурах мозга методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC-ED) в системе Beckman System Gold с электрохимическим детектором LC-4C. Выделенные структуры мозга гомогенизировали в охлажденной 0,1 Н хлорной кислоте, центрифугировали при 14000 g в течение 7 минут при  $4^{\circ}\text{C}$ . Часть супернатанта в количестве 20 мкл вводилась в систему HPLC-ED. Разделение пиков проходило в хроматографической колонке SphereClone 5 $\mu$  ODS 2 (250x4,60 mm) с предколонкой "Phenomenex". Аналитическое время прохождения пробы в хроматографической колонке составляло 18 минут в изократическом режиме при скорости 1.0 мл/мин. Подвижная фаза состояла из цитрат-фосфатного буфера (pH=3,5), ацетонитрила (88 мл/л) и октансульфоновой кислоты (0,18 ммоль/л). Идентификацию хроматографических пиков, а также их количественную оценку осуществляли по отношению к пикам, полученным от внешних стандартов. Для оценки оборота медиаторов в структурах мозга использовали отношение метаболит/медиатор от измеренных **суммарных** концентраций этих нейрхимических веществ.

Результаты исследования обработаны статистически методом вариационного анализа ANOVA с помощью программы Origin 7.0. Различия признавались достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследований

**Обмен нейромедиаторов в гиппокампе.** Для гиппокампа потомства крыс, подвергнутого пренатальному воздействию холинолитиков, характерно значительное снижение концентрации

нейромедиаторов ДА, НА и 5-ГТ, в большей степени ДА, и изменением уровня его метаболита по сравнению с контрольным потомством (рис.1).

У крысят, подвергавшихся в период пренатального развития воздействию ганглерона, уровень ДА был снижен в 1,5 – 2,5 раза ( $p \leq 0,001$ ). Наибольшее падение уровня ДА отмечали в группе с введением ганглерона на 9-11 сутки гестации. Пренатальное введение метамизила не влияло на содержание ДА в гиппокампе 2-месячного потомства. Одновременно зарегистрировано значимое увеличение концентрации 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в на 21,7% ( $p \leq 0,001$ ) в группе Г10 и на 26,3% ( $p \leq 0,001$ ) в группе Г13. Снижение концентрации НА в гиппокампе наблюдалось только в группах Г10 и Г13 (соответственно 66,6% и 70,0%,  $p \leq 0,001$ ). При этом содержание его метаболита 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля (МГФГ) было увеличено во всех исследуемых группах в 1,5 - 2,0 раза. В отличие от других нейромедиаторов уровень 5-ГТ в гиппокампе был умеренно снижен во всех группах потомства обоего пола по сравнению с контрольным потомством. Содержание метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) в гиппокампе было снижено в группах с пренатальным воздействием обоих холинолитиков.

Представленные в таблице 1 данные свидетельствуют об увеличении оборота ДА в гиппокампе у крысят, подвергавшихся в период пренатального развития воздействию метамизила, и о возрастании оборота 5-ГТ в гиппокампе у потомства, подвергавшегося пренатальному воздействию как метамизила, так и ганглерона.

**Обмен нейромедиаторов в гипоталамусе.** Для ткани гипоталамуса 2-месячных крысят, подвергавшихся воздействию холинолитиков в пренатальный период, характерно значительное снижением ДА-ергической активности по сравнению с гипоталамусом контрольных животных (рис.2). В значительной степени изменялись концентрации и других нейромедиаторов по сравнению с контрольной группой.

Пренатальное воздействие ганглерона сопровождалось более выраженными изменениями уровня ДА, НА и 5-ГТ в гипоталамусе потомства по сравнению с воздействием метамизила. Концентрации ДА и 5-ГТ и их метаболитов ДОФУК и 5-ГИУК были снижена во всех группах Г10, Г13 и Г18. Нейрохимический статус ипоталамусе характеризовался повышением процессов деградации НА у потомств в группе Г18 и в еще большей мере в группе Г10: снижение на 26,2% ( $p \leq 0,001$ ) по сравнению с контролем и с потомствами М10-М18. При этом наблюдалось накопление продуктов метаболизма медиатора: содержание МГФГ было повышено во всех группах в 1,5 - 2,5 раза.

Наибольшие изменения оборота нейромедиаторов в гипоталамусе были выявлены в отношении ДА (табл.1). Индексы отношения 5-ГИУК/5-ГТ были более стабильным, тогда как оборот НА был повышенным, что может отражать увеличение НА-ергической синаптической активности в гипоталамусе.

### **Обсуждение**

Результаты исследования свидетельствуют о том, что введение М или Н–холиноблокаторов беременным самкам в «критические периоды» пренатального развития эмбрионов способны вызвать долговременные изменения в активности нейромедиаторных систем в исследуемых структурах мозга, выявляющиеся у 2-месячного потомства. Пренатальная экспозиция М- и Н-холинолитиков сопровождается значительным снижением ДА-ергической и 5-ГТ-ергической активности в гиппокампе и в гипоталамусе 2-месячного потомства по сравнению с контрольным и животными.

Ранее в механизме действия химических препаратов и экологических токсикантов на холинореактивную систему мозга отмечались прежде всего антихолинэстеразный или холиномиметические эффекты [1, 7, 12]. Представленные нами данные дают основание полагать, что пренатальное воздействие селективных М и Н–холиноблокаторов также, как и воздействие других веществ с холинотропными свойствами (никотин, ХОС, барбитураты и др.), обуславливает долговременные изменения в активности нейромедиаторных систем в структурах мозга у потомств обоих полов.

Показан половой диморфизм в эффектах пренатального воздействия холинолитиков на ДА-ергическую систему (рис.3). Оказалось, что у самцов снижение концентрации ДА в структурах мозга наблюдалось в большей мере, после пренатального введения Н-холинолитика ганглерона, а у самок – преимущественно после пренатального воздействия М-холинолитиком метамизилом.

Согласно данным ряда исследователей дефекты синаптической активности ДА в гиппокампе в перинатальном периоде могут сопутствовать гиппокамп-связанным поведенческим дефицитам у половозрелых особей [4, 9, 14]. Пренатальное воздействие никотина, экзогенного лиганда Н-холинергического рецептора, в раннем онтогенезе приводит к стойкому изменению активности основных нейромедиаторных систем в структурах мозга в постнатальном периоде: при хроническом введении никотина беременным самкам показано

снижение DA-ергической нейронной активности у 2,5-месячного потомства и изменение поведенческой деятельности у взрослых особей [9, 10, 19].

Результаты наших исследований указывают на значительное снижение 5-ГТ-ергической синаптической активности у потомства крыс с пренатальным воздействием М- и Н-холинолитиков. В гиппокампе концентрация 5-ГТ была снижена у крысят обоих полов во всех экспериментальных групп по сравнению с контрольным потомством, хотя содержание 5-ГИУК при этом было сопоставимо с соответствующими значениями в контрольной группе. В гипоталамусе снижение содержания 5-ГТ и 5-ГИУК отмечали только у потомства, подвергнувшегося пренатальному воздействию ганглерона. В развивающемся мозге пренатальный 5-ГТ выполняет роль нейротрофного фактора, влияющего на дифференцирование клеток и региональную цитоархитектонику мозга. Поэтому нарушение обмена 5-ГТ в пренатальном периоде при воздействии ХОС является одной из причин развития нейроповеденческих аномалий у потомства [2, 3, 5, 6, 11]. В частности, нарушение обмена 5-ГТ в перинатальном периоде может проявляться в виде развития аффективных состояний у половозрелых животных [2, 3, 6].

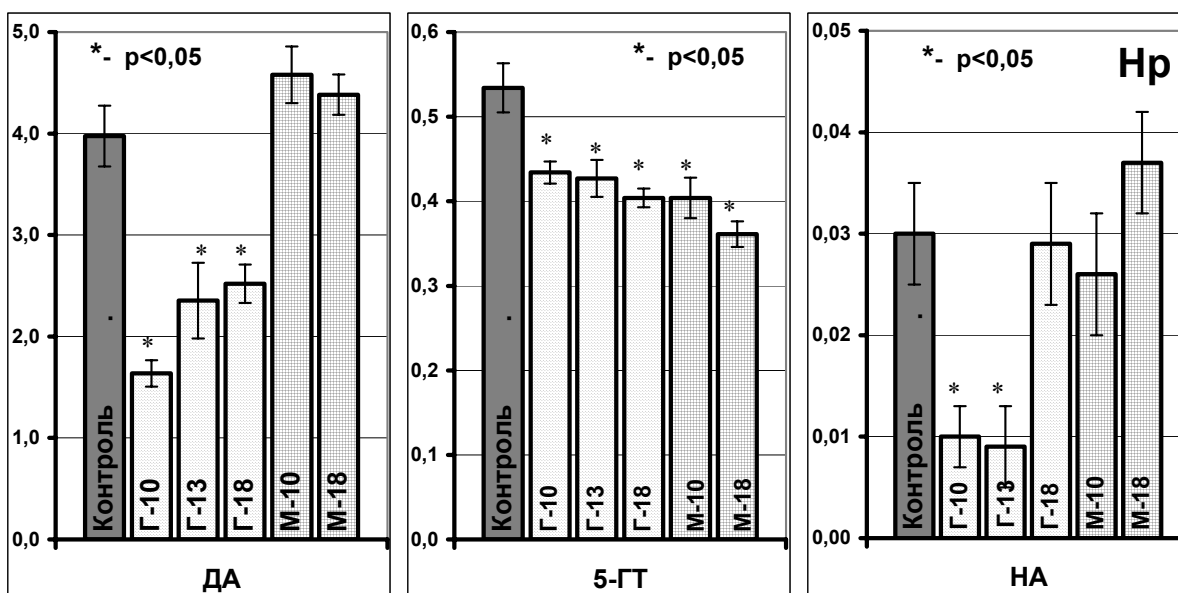
Таким образом, пренатальное воздействие селективных М- и Н-холинолитиков подобно другим химическим препаратам и экологическим токсикантам с холинотропными свойствами вызывает отдаленные изменения в формировании нейромедиаторных функций, выявляемые у 2-месячного потомства. В свою очередь наблюдаемые отклонения могут способствовать последующему развитию нейроповеденческих аномалий и аффективных нарушений у половозрелых особей [3, 6, 8].

### **Литература:**

1. Abreu-Villaca Y., Seidler F.J., Tate C.A. et al. Prenatal nicotine exposure alters the response to nicotine administration in adolescence: effects on cholinergic systems during exposure and withdrawal // *Neuropsychopharmacology*. 2004. Vol.29, №5. P.879-890.
2. Aldridge J.E., Seidler F.J., Meyer A. et al. Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: effects during different critical periods // *Environ. Health Perspect*. 2003. Vol.111. P.1736–1743
3. Azmitia E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis // *Brain Res. Bull*. 2001. Vol.56. P.413–424

4. Beer A., Slotkin T.A., Seidler F.J. et al. Nicotine Therapy in Adulthood Reverses the Synaptic and Behavioral Deficits Elicited by Prenatal Exposure to Phenobarbital // *Neuropsychopharmacology*. 2005. Vol.30. P.156–165
5. Dam K., Garcia S.J., Seidler F.J., Slotkin T.A. Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways // *Dev. Brain Res*. 1999. Vol.116. P.9–20
6. Dreyfus C.F. Neurotransmitters and neurotrophins collaborate to influence brain development // *Perspect. Dev. Neurobiol*. 1998. N 5. P.389–399
7. Icenogle L.M., Christopher N.C., Blackwelder W.P. et al. Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation // *Neurotoxicol. Teratol*. 2004. Vol.26. №1. P.95-101.
8. Levitt P., Harvey J.A., Friedman E. et al. New evidence for neurotransmitter influences on brain development // *Trends Neurosci*. 1997. Vol.20. P.269–274
9. Lichtensteiger W., Schlumpf M. Prenatal nicotine exposure: biochemical and neuroendocrine bases of behavioral dysfunction // *Dev. Brain Dysfunct*. 1993. №6. P.279-304.
10. Muneoka K., Ogawa E., Kamei K. et al. Prenatal nicotine exposure affects the development of the central serotonergic system as well as the dopaminergic system in rat offspring: involvement of route of drug administrations // *Developmental Brain Research*. 1997. Vol.102. P.117-126.
11. Qiao D., Seidler F.J., Padilla S., Slotkin T.A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: what is the vulnerable period? // *Environ. Health Perspect*. 2002. Vol.110. P.1097–1103
12. Robinson S.E. Effect of Prenatal Opioid Exposure on Cholinergic Development // *J. Biomed. Sci*. 2000. N7. P.253–257
13. Slotkin T.A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates // *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2004. Vol.198. P.132-151.
14. Steingart R.A., Abu-Roumi M., Newman M.E. et al. Neurobehavioral damage to cholinergic systems caused by prenatal exposure to heroin or phenobarbital: cellular mechanisms and the reversal of deficits by neural grafts // *Brain Res. Dev. Brain Res*. 2000. Vol.122. P.125–133.
15. Turlejski K. Evolutionary ancient roles of serotonin: longlasting regulation of activity and development // *Acta Neurobiol. Exp*. 1996. Vol.56. P.619–636

Рисунок 1.



Подпись к рисунку 1:

Рис. 1. Содержание нейромедиаторов ДА, НА и 5-ГТ (нг/мг сырой ткани) в гиппокампе у 2-месячных самцов крыс, подвергавшихся воздействию ганглера (Г) и метамизила (М) в разные сроки пренатального развития.

Обозначения: –Г10-Г13 и Г18– группы с воздействием ганглера на 9-11, 12-14 и 17-19 сутки гестации, соответственно; М10-М18– группы с воздействием метамизила на 9-11 и 17-19 сутки гестации соответственно. \*  $p < 0,05$  указано по отношению к контрольной группе.

В остальных рисунках и таблице обозначения аналогичны рис.1.

**Таблица 1.**

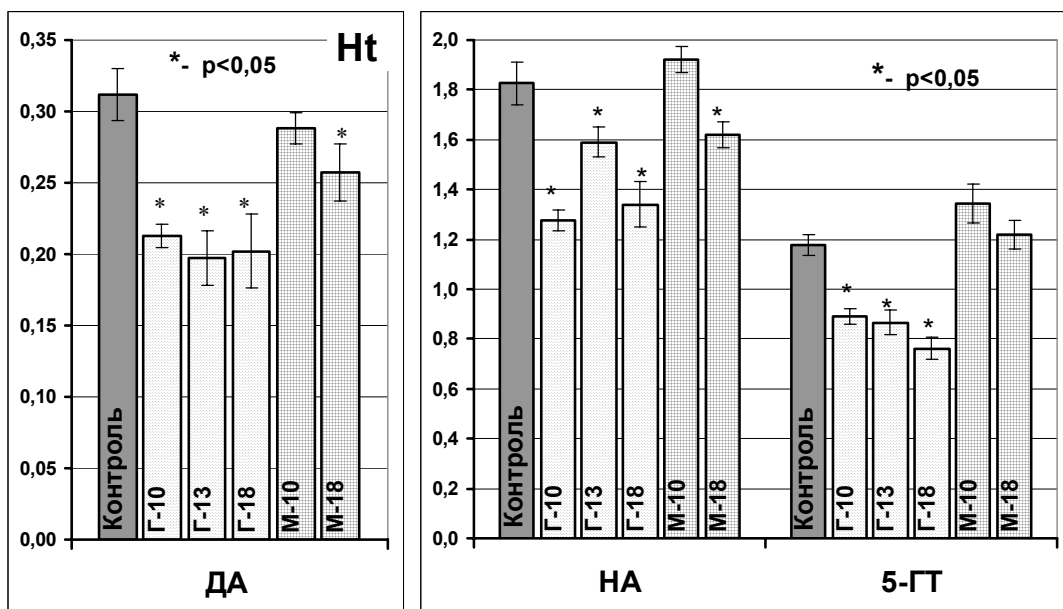
группы	ГИППОКАМП		ГИПОТАЛАМУС	
	ДА	5-ГТ	ДА	5-ГТ
Контроль	0,244±0,018	0,976±0,068	0,637±0,037	0,608±0,035
Г-10	0,228±0,026	1,120±0,061	0,470±0,023*	0,578±0,041
Г-13	0,194±0,022	1,192±0,078*	0,461±0,030*	0,636±0,028
Г-18	0,340±0,020*	1,134±0,062*	0,540±0,026	0,587±0,032
М-10	0,344±0,022*	1,240±0,059*	0,378±0,033*	0,538±0,039
М-18	0,402±0,031*	1,188±0,069*	0,490±0,041*	0,550±0,039

**Подпись к таблице 1**

Оборот нейромедиаторов ДА и 5-ГТ в гиппокампе и гипоталамусе у 2-месячных крысят, подвергавшихся воздействию М- или Н-холинолитика в разные сроки пренатального развития.



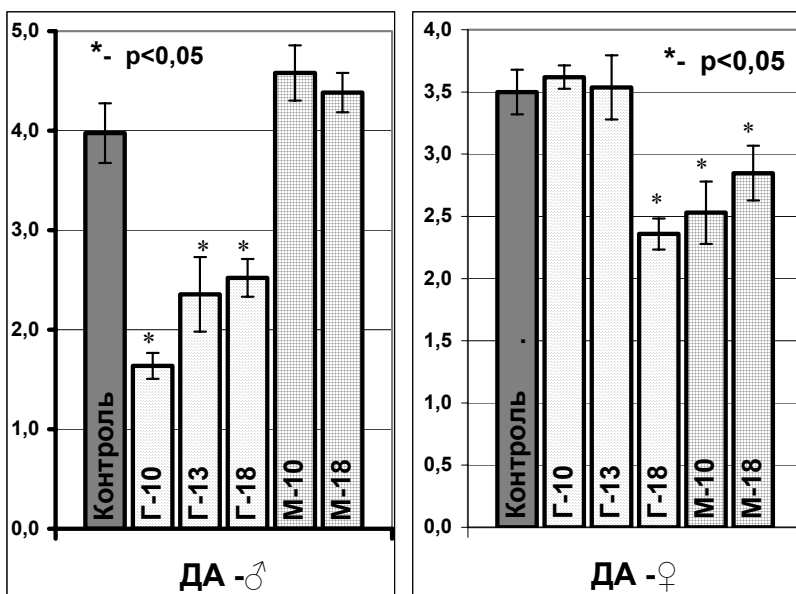
Рисунок 2.



Подпись к рисунку 2:

Содержание нейромедиаторов ДА, НА и 5-ГТ (нг/мг сырой ткани) в гипоталамусе у 2-месячных самцов крысят, подвергавшихся воздействию ганглерона или метамизила в разные сроки пренатального развития.

Рисунок 3.



**Подпись к рисунку 3:**

Половой диморфизм по содержанию ДА (нг/мг сырой ткани) в гиппокампе 2-месячных крысят, подвергавшихся воздействию ганглерона или метамизила в разные сроки пренатального развития. ♂, ♀ – обозначения самцов и самок соответственно.