

УДК 612.821.3:615.777.9-099:569.323.4

## СПОСОБНОСТЬ К ОБУЧЕНИЮ У КРЫС ПРИ ОТРАВЛЕНИИ СВИНЦОМ И КАДМИЕМ

Касенов Б.Ж., Балабекова М.К., Ахмедшина Д.А., Трубачев В.В.

*Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, e-mail: kasenov74@mail.ru*

Показана способность крыс к обучению, в камерах, предназначенных для выработки и проверки сохранения поведения в ответ на электроболевое раздражение, при отравлении тяжелыми металлами. Проведен анализ взаимосвязи между введением комбинации солей тяжелых металлов и итогом обучения крыс. Учитывались следующие характеристики: время, проведенное в светлом отсеке, количество избеганий и избавлений от ударов электрическим током и латентное время перебежки. Зарегистрированные в экспериментальной работе данные позволили установить существенную зависимость между отравлением и способностью обучаться. По данным непараметрического анализа изучаемые нами характеристики показали, что введение комбинации оксида кадмия в дозе 1 мг/кг м.т и ацетата свинца в дозе 10 мг/кг м.т ухудшило способность к обучению, которая проявилась в нарушении формирования реакций пассивного и активного избегания.

Ключевые слова: кадмий, свинец, реакция пассивного и активного избегания.

## LEARNING ABILITY IN RATS AT A POISONING WITH LEAD AND CADMIUM

Kasenov B.Zh., Balabekova M.K., Akhmedshina D.A., Trubachev V.V.

*Kazakh National Medical University named after Asfendiyarov, Almaty, e-mail: kasenov74@mail.ru*

The ability of rats to learn, in coffer intended for development and testing of conservation behavior in response to electrical pain stimulation, in cases of poisoning by heavy metals. Spend analysis relationship between the introduction of a combination of salts of heavy metals and the result of the learning rats. Consider the following data: time spent in the light section, the number of avoidances and escapes from the electric shock and the latent time rush. Registered in the experimental work of the data allowed to establish a significant relationship between the poisoning and the ability to learn. According to the non-parametric analysis of the characteristics studied by us have shown that administration of the combination of cadmium oxide at a dose of 1 mg/kg b.w. and lead acetate at a dose of 10 mg/kg b.w. worsened the ability to learn, which is manifested in violation of formation of conditioned reflexes of passive and active avoidance.

Keywords: cadmium, lead, a conditioned reaction of passive and active avoiding.

Способность к обучению – одна из наиболее важных свойств живых организмов. В этом процессе животные извлекают знания из предыдущего опыта. Влияние тяжелых металлов на организм человека и животных известно, что получило широкое освещение в литературе. Однако, как изменяется исследуемое свойство мозга при воздействии комплекса факторов окружающей среды, к которым можно отнести и комбинацию металлов, не имеет полной ясности в конкретных случаях. Широкий диапазон комбинаций металлов многократно увеличивает варианты ответов организма на их вредное воздействие. Поведение животных используется как критерий оценки экологического качества среды [3,4]. Моделирование в эксперименте комбинированного действия факторов техногенного загрязнения приближено к реальным условиям. Особый интерес представляет исследование для оценки экотоксикологических воздействий изменений в механизмах процесса формирования приобретенного поведения – обучения [5,6], т.к. оно лежит в основе непрерывной адаптации к условиям столь же непрерывно меняющейся среды.

**Цель исследования.** Определить способность к обучению у крыс при отравлении солями кадмия и свинца.

**Материал и методы исследования.** Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах, м.т. 180-220 гр. Источник получения – собственный виварий. Эксперименты проводились на базе вивария НИИФиПМ им. Б.А. Атчабарова. Медико-биологические эксперименты и доклинические исследования на животных проводились согласно «Правилам проведения доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан», утвержденным приказом Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 25 июля 2007 года № 442 в соответствии с Госстандартом Республики Казахстан «Надлежащая лабораторная практика. Основные положения», утвержденным приказом Министерства индустрии и торговли РК. В исследовании учитывались рекомендации, изложенные в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» /под ред. Р.У. Хабриева, Москва, 2005 г. При проведении экспериментов руководствовались рекомендациями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и научных целях», Страсбург 18 марта 1986 г. Заседание № 3 от 01.04.15 ЛЭК КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова.

Животные были разделены на две серии количеством 10 голов в каждой; в первую серию входили контрольные крысы, получавшие равный объем физиологического раствора. Во второй серии с помощью зонда крысам вводили последовательно отдельно 1 мг/кг м.т. оксида кадмия и 10 мг/кг ацетат свинца в течение 2-х недель. Выработывали реакции активного и пассивного избегания (РАИ и РПИ) через неделю от начала эксперимента, проверку проводили в конце второй недели эксперимента. РАИ и РПИ выработывали по общепринятым методикам [1]. Крысы избегают интенсивного света и предпочитают неяркое освещение. Когда их помещают в сильно освещенное пространство, соединенное с темной камерой, они быстро переходят в нее и остаются там. Время между впуском животного и его переходом в темную камеру можно точно измерить. Как только все четыре лапы животного оказываются в темном пространстве, подается большой силы ток и животное возвращают в жилую клетку. Способность к обучению проверяют при помощи запоминания, поместив животное в освещенную часть установки и вновь измерив латентный период перехода в темную половину. Аппаратура: установка, состоит из освещенного и темного отсеков, соединенных отверстием (рисунок 1). В темной камере решетчатый пол электрифицирован, к нему подается ток напряжением 20 вольт.



*Рис. 1. Камера для выработки и проверки РПИ*

Аппаратура для проведения РАИ. Используется прямоугольная камера размером 50×15 [см] с металлическими стенками высотой 40 см и электрифицированным металлическим полом (рисунок 2). Камера разделена стенкой, имеющей дверцу, на два отсека размерами 25×15 [см]. Каждый отсек может освещаться лампами мощностью 20 Вт, вмонтированными в плексигласовые стенки. Используют источник тока с ручным переключателем напряжения. Камеру помещают в слабо освещенную комнату.



*Рис. 2. «Челночная» камера для выработки и проверки РАИ*

Статистическую обработку данных проводили с помощью методов непараметрической статистики. Сравнение показателей, полученных на разных этапах эксперимента, осуществляли по U критерию Манна – Уитни, Вилкоксона [2]. Процедуры статистического анализа выполнялись с помощью программы Statistica 7.0. Значение уровня статистической значимости принималось в случаях  $p \leq 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Исследования поведенческих реакций в РПИ показали, что десять животных контрольной группы через 6,4 сек. осуществляли переход в темный отсек (таблица 1). Переход в темный отсек животное осуществляет под влиянием не только исследовательского поведения, но и врожденного предпочтения темных участков пространства (фотофобии). Наличие резкого градиента между светом и темнотой позволяет проверить сохранность в памяти животного условного рефлекса. Так, через неделю в аналогичной ситуации

контрольным животным понадобилось в среднем 267,2 сек., чтобы перейти в темный отсек. Обученные животные оставались в освещенной камере в течение такого времени, вероятно, вследствие блокирования активного поведения условным рефлексом (сохранение в памяти болезненного ощущения при переходе в темный отсек).

Таблица 1

Время пребывания крыс в светлом отсеке камеры в РПИ сек.

Показатели поведенческого акта	Контроль, n=10		Металлы, n=10		Mann – Whitney U test, Wilcoxon test
	Me	25%-75%	Me	25%-75%	
Выработка	6,4	5,1-8,2	9,0	8-11	0,0028** Z=2,986
Проверка	272	258-282	207,5	192-237	0,0001* 0,0015** Z=3,919
Примечание: * – выработка к проверке (значимость по Вилкоксоу),** – по Mann – Whitney U-Test статистическая значимость по отношению к контрольной группе					

Под влиянием металлов время пребывания крыс в светлом отсеке камеры во время выработки рефлекса составило 207,5 сек., предположительно происходит угнетение активного поведения крыс (таблица 1). Крысы, как и другие грызуны, имеют врожденный норковый рефлекс, который сводится к тому, что на свету они укрываются в узких темных местах. Крыса запоминает полученное электроболовое воздействие и учится избегать темной части экспериментальной установки. Как правило, для обучения требуется всего лишь одна сессия. Через семь суток проводится проверочная сессия: снова помещаем крысу в светлый отсек, измеряя латентный период – время, в течение которого крыса в нём остаётся. Чем оно дольше, тем прочнее память о неприятностях, подстерегающих животное в темном отсеке. Таким образом, для сравнения влияния экспериментальных металлов на память мы будем использовать латентное время.

Латентный период у отравленных животных по сравнению с контролем сокращается во время проверки сохранения энграмм памяти, то есть можно предположить, что запоминание и вспоминание необходимого навыка затруднено. Быстрое покидание безопасного с интенсивным раздражителем в качестве света отсека животные предпочитали темному и опасному, что связано с прямым или опосредованным влиянием металлов на способность запомнить навык.

Введение комбинации соединений кадмия и свинца привело к нарушению процесса формирования и воспроизведения реакции пассивного избегания, что ухудшило способность к обучению в данной ситуации.

Изучение поведения крыс в челночной камере с целью обучения реакции активного

избегания показало, что животные проводят примерно равное время в обеих камерах. Для активного избегания характерно поведение животного, направленное на снижение воздействия раздражителя (электрического тока) на свой организм. Животное при перебежании в затемненный отсек попадает в безопасную область. На первый удар электрического тока животное замирает, или припадает к полу на короткое время, вскоре оно пытается убежать от электрических ударов. У некоторых регистрируются также голосовые реакции. Первоначально крыса обучается воспринимать сигналы предстоящей боли по мелькающему свету и звуку переключателя. Способность к обучению условной реакции избегания наследуется по простому моногенному типу [7], на вспышку света животное быстро обучается переходить в безопасный отсек. Выработка реакции избегания во многом зависит от протяженности области мшистых волокон, отражающей число синапсов в системе связей между зубчатой извилиной и гиппокампом. Такая сложная стимульная реакция вскоре вызывает страх, о котором свидетельствует снижение исследовательской активности, замирание, неподвижность. Продолжение эксперимента приводит к развитию у крыс реакции бегства. Животное узнаёт, что перемещение в затемнённый отсек безопасно, а после убегания из освещенной части боль прекращается. Затем реакция страха постепенно подавляется и запускается реакция бегства лишь по одному световому сигналу, вызывающему страх. Далее наступает стабильный уровень поведения, при котором на световой сигнал крыса избегает удара электрическим током. Накопление приобретенного таким образом опыта выразалось в том, что животное при каждом новом сеансе использовало меньший объем движений (животное при попадании в темную камеру сразу же поворачивалось головой к отверстию и в такой позе ожидало следующий световой условный сигнал) для достижения критерия обученности.

У контрольных крыс, начиная с 38 по 42 сочетания, вырабатывался навык избегания. При проверке – с 2628 сочетания УС с безусловным раздражителем. При этом у некоторых животных навык воспроизводился в начале сочетаний, но стабильное и ровное проявление было заблокировано, по всей видимости, реакцией страха, отвлечением внимания животного на груминг или «намеренной» проверкой наличия БС или иными стимулами.

Введение соединений тяжелых металлов существенно нарушило процессы формирования, консолидации и воспроизведения энграмм памяти РАИ (таблица 2).

Таблица 2

Количество избеганий и избавлений при выполнении исследования РАИ

Показатели поведенческого акта	Контроль, n=10		Металл 1 месяц, n=10		Mann – Whitney U test, Wilcoxon W test
	Me	25%-75%	Me	25%-75%	

Выработка реакции					
Избегания	12,5	10-14	6,0	5-6	0,0022** Z=3,780
Избавления	38,5	36-40	44,0	44-45	0,0233** Z=3,919
Проверка реакции					
Избегания	27,0	25-28	7,5	7-9	0,0001* 0,0025** Z=3,919
Избавления	23,0	22-25	42,0	39-43	<0,0001* 0,0233** Z=3,919
Примечание: * – выработка к проверке (значимость по Вилкоксоу), ** – по Mann – Whitney UTest статистическая значимость по отношению к контрольной группе					

Так, число правильных реакций избегания у животных, получавших тяжелые металлы, во время проверки оставалось почти таким же, как и во время выработки. Критерий обучения, оцениваемый по количеству избеганий, у животных, получавших комбинацию тяжелых металлов, был достигнут лишь на 46–48 сочетаниях.

Количество правильных реакций избеганий у крыс, получавших металлы, составляло лишь 11,4 %, что в 2 раза отставало от показателей контрольных животных и свидетельствовало о снижении процессов выработки навыка избегания. Через неделю, при проверке извлечения полученного опыта, количество избеганий в контроле составило 53,4 %, а у крыс, продолжавших получать комбинацию металлов – 15,4 %.

Одной из разновидностей избегания является избегание в челночной камере. По сравнению с беговой дорожкой выработка избегания в челночной камере является довольно трудным заданием из-за отсутствия постоянной безопасной области и простой инструментальной реакции, наличия меняющегося аверзивного градиента и увеличения роли эмоциональных факторов. Ее можно представить как постоянно инвертируемую ситуацию одностороннего избегания.

Обучение активному избеганию – это основное поведенческое явление, теоретические и практические аспекты которого продолжают привлекать большое внимание со стороны психологов и нейрофизиологов. Как и в других вариантах инструментального обусловливания, животное обучают контролировать применение безусловного сигнала (БС) путем соответствующих реакций на условные сигналы (УС), предшествующие вредному стимулу. Первой стадией обучения является, как правило, реакция бегства, которая прекращает эффект БС. При продолжении обучения появляются предвосхищающие реакции, которые позволяют животному вообще избежать БС. Поведение избегания также возникает при отсутствии каких-либо внешних УС (так называемое недискриминированное избегание)

при условии, что БС применяются с регулярными интервалами – избегание по Сидману, причем само время или стимулы, приуроченные ко времени, служат в качестве УС.

Реакция избегания является инструментальной реакцией, в результате повторения которой формируется навык выполнять действия, позволяющие избежать наказания или опасности. Классическим вариантом экспериментальной модели реакции избегания является челночная камера. Установка «челночная камера» представляет собой бокс, разделенный на две половины перегородкой с отверстием посередине. Таким образом, при многократном повторении описанной процедуры вырабатывается условный рефлекс избегания, который заключается в том, что крыса обучается уходить на противоположную половину камеры до истечения 10 секунд после подачи звукового сигнала. На основе этих повторений вырабатывается определенное обучение в обозначенных условиях. При повреждении мозга изменяется способность к обучению, что можно статистически проанализировать.

**Заключение.** Таким образом, реакции перехода являются генетически детерминированной формой ответа у крыс, поэтому возможно измерить на основе поведенческих особенностей способность к обучению перехода в камерах. У контрольных животных реакции пассивного и активного переходов выработались, что свидетельствует об образовании в нервной системе комплекса временных условных связей, позволяющих проявлять адекватное и целесообразное поведение. Введение комбинации тяжелых металлов оксида кадмия и ацетата свинца привело к нарушению процесса выработки реакций как пассивного, так и активного избегания. На основании чего можно заключить, что тяжелые металлы ухудшают способность к определенным аспектам обучения в камерах. Можно предположить, что существуют некоторые звенья в механизмах интоксикации тяжелыми металлами, которые влияют на способность к обучению у исследуемых животных, что делает необходимым дальнейшие исследования.

### **Выводы**

1. Реакция избегания, являясь генетически заложенной формой ответа на раздражитель, сформировалась у контрольных животных, что характеризовалось формированием реакций пассивного и активного избегания.
2. Введение комбинации оксида кадмия в дозе 1 мг/кг м.т и ацетата свинца в дозе 10 мг/кг м.т ухудшило способность к обучению реакции избегания.

### **Список литературы**

1. Буреш Я., Бурешова О. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. Д. Хьюстон. – М.: Высш. шк., 1991. – 399 с.

2. Ермолаев О.Ю. Математическая статистика для психологов: учеб. для вузов. – 2-е изд. испр. – М.: Московский психолого-социальный институт; Изд. Флинта, 2003. – 336 с.
3. Кокаева Ф.Ф., Кокаева И.Ю., Марзоев А.И. Поведение как критерий оценки экологического качества среды // XVII Съезд Всероссийского Физиологического общества. Ростов-на-Дону. 1998: тезисы докладов. – Ростов-на-Дону, 1998. – С. 258.
4. Кокаева Ф.Ф. Поведение как критерий поражающего действия техногенного загрязнения среды на организм животных и эффективности мер коррекции: автореф. дис. ... д-ра биол. наук.03.00.16.; 03.00.13. – М.: МГУ, 2006. – 47 с.
5. Нурмухамбетов А.Н., Меерсон Ф.З. Антиоксидантная защита химических повреждений сердца и мозга. – Алматы, 1992. – 265 с.
6. Ударцева Т.П. Механизмы адаптации к совместному воздействию загрязнителей окружающей среды и ограничения движений: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Алматы, 2002. – 287 с.
7. Buselmaier W., Vierling Th., Balzereit W., Schwegler H. (1981). Genetic analysis of avoidance learning by means of different psychological test systems with inbred mice as model organisms, Psychol. Res., 43, 317-333.