

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЙ ВАНАДИЯ И ХРОМА НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КРЫС

Трубачев В.В., Балабекова М.К., Касенов Б.Ж., Карчалова А.М., Токушева А.Н., Ахмедшина Д.А., Альдекеева Ж.Е., Жукешева М.К., Рыспекова Н.Н.

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

Актуальность проблемы загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами объясняется, прежде всего, широким спектром их действия на организм человека. В ранее проведенных опытах было доказано, что затравка тяжелыми металлами приводит к нарушению поведенческих реакций, однако отдаленные последствия в данных исследованиях не изучались [3,4]. Цель настоящего исследования: изучение отдаленных последствий затравки солями тяжелых металлов и влияние их на поведенческие реакции. Экспериментальные исследования проводились по следующим сериям: 1 серия – крысы контрольная группа; 2 серия – крысы + металлы через 1 неделю; 3 серия – крысы + металлы через 1 месяц. Животным экспериментальных групп в течение 12 суток была проведена затравка посредством перорального введения растворов солей тяжелых металлов: бихромата калия и метаванадата аммония, при помощи зонда. Крысы из контрольной группы получали эквивалентный объем физиологического раствора NaCl. Изучение поведенческих реакций экспериментальных животных проводилось в Суок-тесте. Установлено, что через 1 неделю после окончания затравки тяжелыми металлами у экспериментальных крыс в СУОК-тесте наблюдали на фоне повышенной тревожности снижение исследовательской и двигательной активности. Через 1 месяц в поведенческих реакциях наблюдалось присутствие тревожности, о чем судили по нарастанию оборонительной двигательной активности.

Ключевые слова: тяжелые металлы, СУОК-тест, поведенческие реакции, крысы.

## EXPERIMENTAL STUDIES OF LONG-TERM CONSEQUENCES OF INTOXICATION BY SALTS OF HEAVY METALS

Trubachev V.V., Balabekova M.K., Kasenov B.Zh., Karchalova A.M., Tokusheva A.N., Ahmedshina D.A., Aldekeeva Zh.E., Zhukesheva M.K., Ryspekova N.N.

*Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Department of Pathophysiology, Almaty, e-mail: balabekovamarina@mail.ru*

The relevance of problems of environmental pollution with heavy metals is urgent due to their broad spectrum of action on the human body. By their main experiments it was proved that heavy metal primer leads to disruption of behavioral reactions, but long-term effects were not studied in these studies [3,4]. The importance of this research: the study of long-term effects of seed salts of heavy metals and their influence on behavioral response. Broadly speaking, experimental studies were carried out in the following series: 1 series - the rat control group; Series 2 + -rats metals after 1 week; 3 series –rat metals + 1 month. The animal of the experimental groups was carried out in the seed for 12 days by oral administration of solutions of salts of heavy metals: potassium metavanadate and ammonium dichromate, using a probe. Rats in the control group received an equivalent volume of physiological NaCl solution. The learning of behavioral reactions of experimental animals was carried out in Suoktest. In experiment, it was found that within one week after seeding with heavy metals in experimental rats in test-Suok observed to decrease background research increased anxiety and locomotors activity. As it produced results of 1 month of behavioral reactions observed the presence of anxiety, as judged from the increase in the defense of physical activity at this study.

Keywords: heavy metals, suok-test, behavioral reactions, rats

В последнее время в основе загрязнения окружающей среды и обострении экологической обстановки все большую роль играют выбросам тяжелых металлов от предприятий цветной и черной металлургии, нефтеперерабатывающих заводов и транспорта. Актуальность проблемы загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами объясняется, прежде всего, широким спектром их действия на организм человека. Тяжелые металлы

вливают практически на все системы организма, оказывая токсическое, аллергическое, канцерогенное, гонадотропное действие [5,6,7]. В ранее проведенных опытах было доказано, что затравка тяжелыми металлами приводит к нарушению поведенческих реакций, однако более поздние последствия в данных исследованиях не изучались [1,9]. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение последствий затравки солями тяжелых металлов и влияние их на поведенческие реакции.

### **Материал и методы исследования**

Эксперимент проводился на 30 самцах белых беспородных крыс, по 10 в каждой серии. Для проведения эксперимента были взяты крысы массой  $230 \text{ г} \pm 10 \%$ . Источник получения – собственный виварий. Эксперименты проводились на базе вивария НИИ ФиПМ 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 Министра здравоохранения Республики Казахстан от 25 июля 2007 года № 442 в соответствии с Госстандартом Республики Казахстан «Надлежащая лабораторная практика. Основные положения», утвержденным приказом Министра 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. Решение локальной этической комиссии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова от 01.04.15, протокол № 3.

Животным экспериментальных групп в течение 12 суток была проведена затравка солями тяжелых металлов посредством перорального введения при помощи зонда растворов бихромата калия и метаванадата аммония. Крысы контрольной группы получали эквивалентный объем физиологического раствора NaCl. Исследования проводились через 1 неделю и через 1 месяц после окончания затравки солями тяжелых металлов.

Экспериментальные исследования проводились по следующим сериям:

1 серия – контрольная группа;

2 серия – крысы, получавшие соли тяжелых металлов (через 1 неделю);

3 серия – крысы, получавшие соли тяжелых металлов (через 1 месяц).

Изучение поведенческих реакций экспериментальных животных проводилось в Суок-тесте. Данная модель основана на тестировании животного на приподнятой длиной 2–3 метровой горизонтальной аллее (шириной 6 см). Стандартный период тестирования в Суок-тесте составляет 5 мин. Маркером шест был разделен на равные 15-ти см сегменты и

зафиксирован на высоте 20–25 см при помощи торцевых стенок (20 x 20 см) либо двух опор ножек соответственно. При тестировании животное помещалось в центр аллеи, которая была окружена двумя сегментами справа и слева, формирующими условную «центральную зону» [10].

Процедуры статистического анализа выполнялись с помощью программы Statistica 7.0. Значение уровня статистической значимости принималось в случаях  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В первом опытным сеансе у крыс, подвергавшихся воздействию солей тяжелых металлов, по сравнению с контрольной группой в 2 раза статистически значимо ( $p=0,0019$ ,  $Z=3,136$ ) увеличивалась латенция первого перемещения (табл.1).

Таблица 1

Показатели поведенческих реакций в СУОК-тесте крыс, подвергавшихся воздействию тяжелых металлов, в сравнении с контрольной группой (через 1 неделю)

Показатели поведенческого акта	Контроль, n=10		Металлы, 1 неделя, n=10		Mann-Whitney U test
	Me	25%-75%	Me	25%-75%	
Латентный период	2,5	2,0-3,0	4,5	4,0-5,0	$p=0,0019$ , $Z=3,136$
Количество остановок	6,0	6,0-7,0	11,5	11,0-12,0	$p=0,0079$ , $Z=2,657$
Время остановок	30,0	25,0-32,0	34,5	30,0-35,0	$p=0,0494$ , $Z=3,491$
Горизонтальная активность	28,0	25,0-36,0	12,0	11,0-12,0	$p=0,0003$ , $Z=3,819$
Груминг	10,0	5,0-10,0	1,0	0,1-1,0	$p=0,0009$ , $Z=3,753$
Примечание: * – по Mann – Whitney UTest статистическая значимость по отношению к контрольной группе.					

Медиана количества остановок, совершенных крысами, подвергавшимися воздействию солей металлов, составила 11,5 (интерквартильный размах от 11,0 до 11,5), что было на 47,8 % статистически значимо больше ( $p=0,0079$ ,  $Z=2,657$ ) показателей контрольных особей. Время остановок также статистически значимо увеличилось на 13 % ( $p=0,0494$ ,  $Z=3,491$ ), что является признаком тревожно-депрессивного поведения. Таким образом, крысы, подвергавшиеся воздействию солей металлов, продемонстрировали высокий уровень тревожности, что проявилось в удлинении латенции первого перемещения по аллее и увеличении числа остановок.

Статистически значимое снижение на 57,1 % ( $p=0,0003$ ,  $Z=3,819$ ) горизонтальной двигательной активности у крыс, подвергавшихся воздействию солей тяжелых металлов, сопровождалось статистически значимым уменьшением актов груминга в 10 раз ( $p=0,0009$ ,  $Z=3,753$ ).

Через месяц после прекращения затравки металлами исследование поведенческих паттернов повторили. В первом опытном сеансе у крыс, подвергавшихся воздействию солей тяжелых металлов, в сравнении с контрольными особями наблюдалось снижение количества остановок в 1,7 раз ( $p=0,0079$ ,  $Z=2,657$ ), однако эти изменения сопровождались увеличением продолжительности времени остановок в 2 раза (табл. 2).

Таблица 2

Показатели поведенческих реакций в СУОК-тесте крыс, подвергавшихся воздействию тяжелых металлов, в сравнении с контрольной группой (через 1 месяц)

Показатели поведенческого акта	Контроль, n=10		Металлы, 1 месяц, n=10		Mann-Whitney U test
	Me	25%-75%	Me	25%-75%	
Количество остановок	6,0	6,0-7,0	3,5	2,0-5,0	$p=0,0079$ , $Z=2,657$
Вертикальная активность	2,5	2,0-3,0	0	0	$p=0,0011$ , $Z=3,254$
Заглядывания	11,5	10,0-12,0	19,5	16,0-23,0	$p=0,0108$ , $Z=2,549$
Примечание: * – по Mann – Whitney UTest статистическая значимость по отношению к контрольной группе.					

Также в сравнении с контролем наблюдалось снижение исследовательской активности. Так, вертикальная активность статистически значимо уменьшилась в 2,5 раза ( $p=0,0011$ ,  $Z=3,254$ ). Количество заглядываний в сравнении с контрольной группой увеличилось на 41 % ( $p=0,0108$ ,  $Z=2,549$ ). Данные изменения сопровождались увеличением количества болюсов в 2 раза, что может свидетельствовать о сохранении тревожного состояния у крыс, подвергавшихся влиянию солей тяжелых металлов.

Во втором опытном сеансе сохранялась тенденция, наблюдаемая ранее. Так, продолжительность остановок в сравнении с контрольными крысами в первую неделю после прекращения затравки увеличилась на 34,7 % ( $p=0,0022$ ,  $Z=3,062$ ), а через месяц на 84,7 % ( $p=0,011$ ,  $Z=3,254$ ). Данные изменения сопровождались снижением продолжительности груминга в первую неделю после окончания затравки в 26 раз ( $p=0,0002$ ,  $Z=3,780$ ), а через месяц на 66,1 % ( $p=0,0301$ ,  $Z=2,169$ ) (табл. 3).

Таблица 3

Показатели поведенческих реакций в СУОК-тесте крыс, подвергавшихся воздействию тяжелых металлов, в сравнении с контрольной группой (через 1 месяц)

Показатель поведенческого акта	Контроль, n=10		Металлы, 1 месяц, n=10		Mann-Whitney U test
	Me	25%-75%	Me	25%-75%	
Время остановок	22,5	20,0-30,0	147,0	80,0-170,0	$p=0,011$ , $Z=3,254$

Груминг	29,5	26,0-32,0	10,0	2,0-20,0	p=0,0301, Z=2,169
Горизонтальная активность	31,5	30,0-32,0	21,0	11,0-27,0	p=0,0393, Z=2,061
Переходы в центр	3,0	2,0-4,0	1,0	0,0-2,0	p=0,0036, Z=2,910
Болюсы	0	0	1,0	1,0-1,0	p=0,0048, Z=2,820
Примечание: * – по Mann – Whitney UTest статистическая значимость по отношению к контрольной группе.					

Во втором опытном сеансе также наблюдалось статистически значимое уменьшение горизонтальной активности в первую неделю после окончания затравки металлами в 2,3 раза ( $p=0,0002$ ,  $Z=3,780$ ), через месяц на 33,3 % ( $p=0,0393$ ,  $Z=2,061$ ). В оба срока исследования отмечалось уменьшение количества переходов в центр более чем в 3 раза ( $p=0,0036$ ,  $Z=2,910$ ), а также увеличение в сравнении с контрольной группой количества болюсов в 2 раза ( $p=0,0048$ ,  $Z=2,820$ ).

Полученные экспериментальные данные показывают, что в оба периода исследования соединения тяжелых металлов оказывали выраженное повреждающее действие на организм экспериментальных животных. Через месяц после окончания затравки тяжелыми металлами поведенческие паттерны приближаются к показателям контрольных животных. Однако деструктивное влияние тяжелых металлов окончательно не нивелировалось. Через месяц после окончания затравки сохранялся высокий уровень тревожности. Данный критерий определялся уменьшением продолжительности груминга и одновременным увеличением количества болюсов [8]. Помимо этого, у крыс сохранялась более низкая двигательная активность, об этом свидетельствует снижение количества переходов в центр и более длительная, в сравнении с контрольными животными, продолжительность времени остановок. Показатели исследовательской активности, по истечении месяца после прекращения затравки, также уступали аналогичным поведенческим паттернам контрольных крыс, об этом свидетельствовал более низкий уровень вертикальной двигательной активности. Крысы реагируют замиранием на новые, потенциально опасные стимулы [11,12]. Эта реакция имеет неоспоримую адаптивную значимость, так как неподвижность уменьшает возможность акустического или зрительного обнаружения животного хищниками (Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П.) (1991) [2]. Однако по количеству заглядываний крысы, подвергавшиеся воздействию солей тяжелых металлов, превосходили контрольную группу животных. Необходимо отметить, что по мнению ряда авторов [4,3], тревожность животных в первые минуты пребывания в новой обстановке может проявляться и усилением двигательной активности, принимая характер оборонительной. Учитывая, что данная поведенческая реакция сопровождалась увеличением количества болюсов и уринаций, можно предположить, что данный вывод является верным.

По результатам проведенного исследования были сделаны следующие выводы. В первую неделю после затравки солями тяжелых металлов животные демонстрировали высокий уровень тревожности, а также низкую двигательную и исследовательскую активность. Об этом свидетельствует увеличение как количества, так и продолжительности остановок, снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности в оба срока исследования. Через 1 месяц было выявлено улучшение горизонтальной двигательной активности. Помимо этого, отмечалось и увеличение показателей исследовательских паттернов, таких как «заглядывания», «обнюхивания». Однако животные могут проявлять повышенную двигательную активность в качестве оборонительной парадигмы. Как уже ранее отмечалось в обсуждении результатов, у животных, подвергавшихся воздействию солей тяжелых металлов, спустя месяц после прекращения затравки, увеличивалось время замираний, количество болюсов, сокращалась продолжительность груминга. Полученные данные свидетельствуют о том, что деструктивное воздействие тяжелых металлов на организм имеет хронический характер.

В дальнейшем планируется продолжить исследование отдаленных последствий воздействия тяжелых металлов на состояние организма экспериментальных животных на более поздних сроках.

### Список литературы

1. Балабекова М.К., Нурмухамбетов А.Н., Жукешева М.К., Рыспекова Н.Н., Аканов А.А. Влияние разных стрессорных раздражителей на поведенческие реакции крыс // Современные наукоемкие технологии. – 2014. – № 6. – С. 44-48; URL: <http://top-technologies.ru/ru/article/view?id=34651> (дата обращения: 07.04.2016).
2. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. (Bures J., Buresova O., Houston D.P.). Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.
3. Гаев В.В., Кокаева Ф.Ф., Марзоев А.И. Новые подходы к коррекции поведенческих нарушений обусловленных техногенным загрязнением среды // Вестник Владикавказского научного центра. – Владикавказ, 2005. – Т.5. – № 3. – С.66-69.
4. Кравцов А.А. Пренатальное воздействие ацетата свинца на антиоксидантную глутатионовую систему головного мозга новорожденных крысят *in vivo* и на нейритный рост *in vitro* / А.А. Кравцов, А.Я. Шурыгин, Л.В. Шурыгина и др. // Нейрохимия. – 2009. – Т. 26, № 3. – С. 225–231.
5. Мудрый И.В. Тяжелые металлы в окружающей среде и их влияние на организм / И.В.

Мудрый, Т.К. Короленко // *Врачебное дело.* – 2002. – № 5/6. – С. 6-9.

6. Намазбаева З.И. Некоторые аспекты токсичности аэрозолей окружающей среды // *Современные проблемы профессиональных заболеваний бронхолегочной системы: Материалы междунар. науч. конф.* – Караганда, 2001. – С. 22-27.

7. Нурмухамбетов А.Н., Ударцева Т.П., Балабекова М.К. Влияние промышленного загрязнения на иммунную систему в эксперименте // *Вестник МГОУ (Москва).* – 2011. – № 2 (44). – С. 85–87.

8. Тушмалова Н.А., Квеквескири А.Н., Иноземцев А.Н., Кокаева Ф.Ф., Прагина Л.Л., Альварес Р. Some molecular mechanisms of pharmacological correction of memory // *Molecular basis of action of bioactive substances on behaviour.* – Tallinn, 1999. – 76 с.

9. Husainov D.R., Modifying action of heavy metal salts on anti-inflammatory aspirin action / D.R. Husainov, V.V. Shylina, I.I. Korenyuk et al. // *Health.* 2010. Vol.2, no. 6. P. 630–633.

10. Kalueff A.V., Tuohimaa P. The Suok ("ropewalking") murine test of anxiety // *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 2005. No. 14(2). P. 87-99.

11. Wrennb S.M., Gold P.E., Cycloheximide impairs and enhances memory depending on dose and footshock intensity // *Behav Brain Res.* 2012. Vol. 233(2). P. 293-297.

12. Zhang L., Schallert T., Zhang Z.G., Jiang Q., Arniego P., Li Q., Lu M., Chopp M. A test for detecting long-term sensor motor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia // *Journal of Neuroscience Methods.* 2002. Vol. 117. P. 207-214.