

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АЦЕТАТА СВИНЦА НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ КОРРЕКЦИИ ПУТЕМ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

Жукешева М.К.¹, Каримова Л.Р.¹, Трубачев В.В.¹, Касенов Б.Ж.¹, Ниязбекова Л.С.¹, Терликбаева Г.А.¹, Бектурарова Г.Б.¹

¹НАО «Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова», Алматы, e-mail: info@kaznmu.kz

Доказанная роль тяжелых металлов в развитии нейродегенеративных заболеваний делает вопрос поиска эффективных методов, индуцирующих нейропротекцию и нейропластичность, актуальным на сегодняшний день ввиду возрастающего загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами, особенно в районах с промышленными предприятиями. Изучался корригирующий эффект гипобарической гипоксии при свинцеиндуцированной затравке крыс. Для оценки интегрированной работы коры головного мозга и подкорковых структур исследовалась реакция активного избегания (РАИ) у опытных животных. Эксперимент состоял из четырех серий опытов и двух этапов. Искусственную интоксикацию солью ацетата свинца (АС) моделировали пероральным введением раствора, гипобарическую гипоксию – с помощью аппарата Комовского путем откачивания воздуха. При оценке реакций активного избегания (РАИ) на первом сеансе у молодых затравленных крыс, корригированных гипоксией, в 2,5 раза ($p < 0,05$, $Z = 2,305$) больше правильных реакций, чем у нелеченых крыс; на втором сеансе при проверке закрепления рефлекса у них выявлено статистически значимое возрастание числа правильных реакций в 3,7 раза ($p < 0,05$, $Z = 2,381$) по сравнению с некорригированными крысами, что свидетельствовало о заметном улучшении способности к обучению.

Ключевые слова: гипобарическая гипоксия, ацетат свинца, нейротоксичность, гипоксическое кондиционирование ЦНС, поведенческие реакции, реакции активного избегания, консолидация памяти.

STUDY OF THE EFFECTS OF LEAD ACETATE ON THE BEHAVIORAL REACTIONS OF LABORATORY ANIMALS AND THE POSSIBILITIES OF THEIR CORRECTION BY HYPOXIC PRE-CONDITIONING

Zhukesheva M.K.¹, Karimova L.R.¹, Trubachev V.V.¹, Kasenov B.Zh.¹, Niyazbekova L.S.¹, Terlikbaeva G.A.¹, Bekturarova G.B.¹

¹NJSC Kazakh National Medical University named after S. D. Asfendiyarov, Almaty, e-mail: info@kaznmu.kz

The proven role of heavy metals in the development of neurodegenerative diseases makes the issue of finding effective methods that induce neuroprotection and neuroplasticity relevant today due to the increasing pollution of the environment with heavy metals, especially in areas with industrial enterprises. The correcting effect of hypobaric hypoxia was studied in lead-induced inoculation of rats. To assess the integrated work of the cerebral cortex and subcortical structures, the active avoidance reaction (AAR) was studied in experimental animals. The experiment consisted of 4 series and two stages. Artificial intoxication with lead acetate salt (AC) was simulated by oral administration of a solution, hypobaric hypoxia was modeled using the Komovsky apparatus by pumping air. When assessing the reactions of active avoidance (RAA) at the first session in young inoculated rats, corrected by hypoxia, 2.5 times ($p < 0,05$, $Z = 2,305$) more correct reactions than in untreated rats; in the second session, when checking the fixation of the reflex, they revealed a statistically significant increase in the number of correct reactions by 3.7 times ($p < 0.05$, $Z = 2,381$) compared with uncorrected rats, which indicated a marked improvement in learning ability.

Keywords: hypobaric hypoxia, lead acetate, neurotoxicity, hypoxic conditioning of the central nervous system, behavioral reactions, active avoidance reactions, memory consolidation.

В связи с увеличением количества промышленных предприятий и нарастающей урбанизацией населения возросла роль антропогенного загрязнения окружающей среды солями свинца, хрома, ванадия [1-3].

В настоящее время большие объемы выбросов свинца в атмосферу происходят во

многих отраслях промышленности [4-6]. На долю цветной металлургии приходится более 90% выброса свинца [7; 8].

Свинец и многие другие тяжелые металлы, попадая в системный кровоток, оказывают полиорганный повреждающий эффект. Одной из мишеней является нервная ткань, а именно головной мозг, в котором кумулируют высокие концентрации свинца [6-8]. Учитывая доказанную нейротоксичность тяжелых металлов и возрастающее загрязнение ими окружающей среды, особенно в районах с промышленными предприятиями [6; 7], вопрос поиска эффективных методов, индуцирующих нейропротекцию и нейропластичность, является одним из наиболее актуальных на сегодняшний день.

Целью данного исследования является изучение эффектов гипобарической гипоксии при свинцеендуцированных нарушениях высшей нервной деятельности.

Материал и методы исследования. При проведении экспериментов руководствовались рекомендациями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и научных целях» (Страсбург, 18 марта 1986 г.), Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации №199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» от 01.04.2016, Приказом министра здравоохранения Республики Казахстан от 25 июля 2007 года № 442, Государственным стандартом Республики Казахстан «Надлежащая Лабораторная Практика. Основные положения» СТ РК 1613-2006 Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан (Госстандарт) (Астана), Приказом министра здравоохранения Республики Казахстан от 12 ноября 2009 года № 697 «Об утверждении Правил проведения медико-биологических экспериментов, доклинических (неклинических) и клинических исследований».

Дизайн эксперимента: эксперимент, включающий 4 серии, проводили на половозрелых белых крысах массой 180-200 граммов:

1-я серия – половозрелые крысы (контроль) (n – 10);

2-я серия – половозрелые крысы + гипобарическая гипоксия (n – 10);

3-я серия – половозрелые крысы + ацетат свинца (n – 10);

4-я серия – половозрелые крысы + ацетат свинца + гипобарическая гипоксия (n – 10).

1%-ный водный раствор ацетата свинца вводили перорально с помощью шприца для ингаляционных вливаний (Ш-14 ск, ОАО «МИЗ-Ворсма», РФ) в дозе 15 мг/кг массы тела крысы в течение 12 дней. Контрольным крысам вводили 0,9%-ный раствор натрия хлорида. Начиная с 6-го дня затравки АС, крыс подвергали воздействию гипобарической гипоксии.

Гипобарическую гипоксию моделировали с использованием аппарата Комовского путем откачивания воздуха в режиме 0,6 атм., что соответствует 456 мм рт. ст. (высота 4-5 км)

и парциальному давлению кислорода 97-85 мм рт. ст. (сатурация 90%), экспозицией 60 минут в течение 7 дней ежедневно.

Поведенческие реакции изучали в тесте реакций активного избегания (РАИ). Аппаратурой для формирования УРАИ служила вытянутая прямоугольная камера (50*25*30) с электрифицированным решетчатым полом, непрозрачной перегородкой, со свободным отверстием по центру, которая разделяет камеру на две одинаковые части. Электрической стимуляцией служил источник с фиксированным сопротивлением.

Процедура УРАИ. Крысу помещали в челночную камеру, после 30 с нахождения в этом отсеке включали свет (условный сигнал – УС) и через 5 с на пол подавали электрический ток (безусловный сигнал – БС). Если животное в течение действия УС переходило в другой отсек, то БС не подавали, и в течение 30-45 с животное пребывало в межстимульном интервале. Если во время действия УС крыса не переходила в темный отсек, то подавался БС до тех пор, пока животное не покидало освещенный отсек (электрическая стимуляция была максимально допустима в течение 25 секунд). В течение одной сессии проводили 50 сочетаний. Интерпретировали число переходов за сессию в темный отсек во время изолированного действия УС – время избегания и задержку времени избавления от БС (реакция заторможенности).

Статистическую обработку результатов исследования производили при помощи программы Statistics 20. Количественные показатели представлены в виде $M \pm SD$ и Me (25-75%), где M – среднее значение, $\pm SD$ – стандартное отклонение; Me – медиана, 25-75% – межквартильный интервал; 95% ДИ (доверительный интервал).

Проверку вариационных рядов на нормальность распределения проводили методом Mann-Whitney. При нормальном распределении сравнение между вариационными рядами проводили параметрическим методом с определением критерия Стьюдента. При отсутствии распределения Гаусса в вариационных рядах проверку на наличие различия между группами осуществляли при помощи критерия Вилкоксона для зависимых групп (выработка к проверке). В случае независимых совокупностей использован U-критерий Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для оценки функционирования высшей нервной деятельности у экспериментальных животных изучали их поведение в реакции активного избегания (РАИ) в ответ на условный раздражитель, что явилось показателем способности формирования пространственной ориентации и условных рефлексов корой головного мозга (выработка), а также консолидации памяти (проверка). Сравнение результатов данного теста между группами контроля и опыта позволяет точно выявить изменения и определить их закономерность.

Таблица 1

Средние показатели РАИ у контрольных животных и у животных, подвергавшихся воздействию гипобарической гипоксии, при исследовании консолидации памяти

Показате ль РАИ	Контроль				Wilcoxon 2 – Sample Test	Гипоксия				Mann- Whitney U - Test
	N	Me	25%	75%		N	Me	25%	75%	
Проверка										
Число избеганий	10	15,8	8,0	23,0	Z = 3,2 p<0,05	10	12,5	9,0	15,0	Z = 3,7 p<0,05
Число избавлений	10	33,8	27,0	42,0	Z = 4,2 p<0,05	10	37,5	35,0	41,0	Z = 3,9 p<0,05
Примечание: по Wilcoxon 2 – Sample Test статистическая значимость по отношению к выработке, по Mann-Whitney U - Test статистическая значимость по отношению к контролю										

Согласно данным таблицы 1, проверка РАИ показала статистически значимый прирост числа избавлений в группе, подвергшейся воздействию гипобарической гипоксии. Так, данный параметр увеличился на 9,8% (Me=37,5, межквартильный размах от 35,0 до 41,0) в сравнении с контрольной группой (Me=33,8, межквартильный размах от 27,0 до 42,0). В то же время отмечается снижение количества числа избеганий на 20,8% (p<0,05, z=3,7). Таким образом, гипобарическая гипоксия оказала заметное воздействие на показатели реакции активного избегания (РАИ) у экспериментальных крыс.

Таблица 2

Средние показатели РАИ у контрольных животных и у животных, подвергавшихся воздействию ацетата свинца

Показатель РАИ	Контроль				Wilcoxon 2 – Sample Test	Металл				Mann- Whitney U – Test
	N	Me	25%	75%		N	Me	25%	75%	
Проверка										
Число избеганий	10	15,8	8,0	23,0	Z= 0,1 p>0,05	10	3,5	2,0	6,0	Z = -2,64 p<0,05
Число избавлений	10	33,8	27,0	42	Z = 3,9 p<0,05	10	46,5	44,0	48,0	Z = 3,02 p<0,05
Примечание: по Wilcoxon 2 – Sample Test статистическая значимость по отношению к выработке, по Mann-Whitney U - Test статистическая значимость по отношению к контролю										

Как представлено в таблице 2, во втором опытном сеансе отмечается понижение числа реакций избегания у животных, подвергавшихся воздействию ацетата свинца. Среднее число избеганий в 4,5 раза выше в контрольной группе. Количество избавлений, наоборот, статистически значимо выросло в затравленной группе (Me = 46,5, межквартильный размах от 44,0 до 48,0). В итоге под влиянием ацетата свинца существенно снизилась способность к

обучению и запоминанию в тесте РАИ.

Таблица 3

Средние показатели РАИ у контрольных животных и у животных,

Показатель РАИ	Контроль				Wilcoxon 2 – Sample Test	Металл + гипоксия			
	N	Me	25%	75%		N	Me	25%	75%
Проверка									
Число избеганий	10	15,8	8,0	23,0	Z = 3,82 p<0,05	10	12,8	12,0	15,0
Число избавлений	10	33,8	27,0	42	Z = 3,91 p<0,05	10	37,8	35,0	38,0
Примечание: по Wilcoxon 2 – Sample Test статистическая значимость по отношению к выработке.									

Согласно данным таблицы 3, у животных, подвергавшихся воздействию ацетата свинца и гипобарической гипоксии, также отмечается значительное снижение числа правильных избеганий ($M_e=12,8$, межквартильный размах от 12,0 до 15,0) в сравнении с контролем ($M_e=15,8$, межквартильный размах от 8,0 до 23,0). Число избавлений статистически значимо возрастает на 11% ($p < 0,05$, $Z = 3,91$).

Таблица 4

Средние показатели РАИ у животных, подвергавшихся воздействию гипобарической

Показатели РАИ	Гипоксия				Металл				Mann-Whitney U - Test
	N	Me	25%	75%	N	Me	25%	75%	
Выработка									
Число избеганий	10	5,3	4,0	7,0	10	1,33	0,0	1,0	Z = - 3.05 p<0,05
Проверка									
Число избеганий	10	12,5	9,0	15,0	10	3,5	2,0	6,0	Z = -3.13 p<0,05
Число избавлений	10	37,5	35	41,0	10	46,5	44,0	48	Z =3.13 p<0,05
Примечание: по Wilcoxon 2 – Sample Test статистическая значимость по отношению к выработке, по Mann-Whitney U - Test статистическая значимость по отношению группы «Гипоксия» к «Металлу».									

Результаты, представленные в таблице 4, показывают, что у животных, подвергавшихся воздействию гипобарической гипоксии, отмечается более высокая способность к обучению и запоминанию теста РАИ по сравнению с затравленными крысами. В первом опытном сеансе число правильных избеганий в 4 раза выше, чем у животных, подвергавшихся воздействию ацетата свинца ($p < 0,05$, $Z = 3,05$). Во втором опытном сеансе данная тенденция сохраняется. Число правильных избеганий возросло на 357% в сравнении с металлической группой ($Me = 12,5$, межквартильный размах от 9,0 до 15,0), число избавлений меньше на 19% ($Me = 37,5$, межквартильный размах от 35,0 до 41,0).

Таблица 5

Средние показатели РАИ у животных, подвергавшихся воздействию ацетата свинца,
и у животных, подвергавшихся воздействию соединений ацетата свинца
и гипобарической гипоксии

Показатель РАИ	Металл				Металл + гипоксия				Mann-Whitney
	N	Me	25%	75%	N	Me	25%	75%	U - Test
Выработка									
Число избеганий	10	1,33	0,0	1,0	10	3,3	2,0	5,0	Z=-2.305 p<0,05
Проверка									
Число избеганий	10	3,5	2,0	6,0	10	12,8	12,0	15,0	Z=2.381 p<0,05
Число избавлений	10	46,5	44,0	48	10	37,8	35,0	38,0	Z=2.501 p<0,05
Примечание: по Mann-Whitney U - Test статистическая значимость группы «Металл» по отношению к группе «Металл+гипоксия».									

Согласно результатам, указанным в таблице 5, у животных, подвергавшихся воздействию соединений тяжелых металлов и гипобарической гипоксии в первом опытном сеансе, был отмечен рост числа избеганий в 2,5 раза ($p < 0,05$, $Z = 2,305$) в сравнении с группой животных, подвергавшихся воздействию ацетата свинца ($Me = 1,33$, межквартильный размах от 0,0 до 1,0). Во втором опытном сеансе число правильных избеганий было в 3,7 раза выше в сравнении с металлической группой, а число избавлений ниже на 18,5% ($Me = 37,8$, межквартильный размах от 35,0 до 38,0).

Таким образом, гипокситерапия у животных, затравленных соединениями тяжелых металлов, оказывала существенное воздействие на процессы формирования и воспроизведения временных связей РАИ.

Обсуждение

По результатам реакций активного избегания можно сделать вывод о достоверности гипотезы об эффективности ежедневной гипобарической гипоксии в режиме 0,6 атм. в течение 60 минут на протяжении 7 дней в отношении уменьшения выраженности нейротоксического действия АС.

При проведении теста РАИ у животных с воздействием гипобарической гипоксии и АС четко выражена закономерность улучшения способности выработки условных рефлексов и их закрепления в первом и втором сеансах по сравнению с некорригированными крысами.

Механизмы нейропротекции и пластичности, вызванные гипоксическим кондиционированием: от геномного репрограммирования до системных адаптаций, находятся на стадии изучения. Однако имеющиеся данные показывают, что регулярное воздействие определенных доз нормо- и гипобарической гипоксии запускает эндогенные механизмы нейропротекции и нейропластичности в ЦНС [9; 10].

Уменьшение поступления кислорода в ЦНС представляет собой триггер механизмов адаптации к гипоксии, которые последовательно организованы в две отдельные фазы в зависимости от их начала относительно длительности воздействия гипоксического стимула [10; 11]. Первая фаза (немедленная фаза) адаптации к гипоксии происходит в течение первых нескольких минут или часов после воздействия гипоксии, при которой развивается нейропротективное состояние, длящееся непродолжительное время [9; 10]. Механизмами, лежащими в основе этого временного нейрозащитного состояния, являются изменения проницаемости ионных каналов, фосфорилирование белков и посттрансляционные модификации [9]. В эту фазу наблюдается повышение внутриклеточного содержания и стабилизация фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией (HIF-1 – hypoxia-inducible factor-1), а точнее его α -субъединицы (HIF-1 α), который считается ключевым регулятором клеточного кислородного гомеостаза и играет инициальную роль в возникновении и запуске второй фазы (долгосрочной) адаптации к гипоксии через целевые проадаптивные гены [10-12].

Долгосрочная адаптация требует активации генов и синтеза белков *de novo*, происходит через несколько часов или дней после воздействия гипоксического стимула [9; 11; 13]. На этой фазе нейрозащита связана с угнетением механизмов повреждения и активацией резистентности нейронов. В основе лежит активация третичных мессенджеров – индуцибельных (c-Fos, NGFI-A, HIF-1) или повсеместно распространенных (pCREB, NF- κ B), действующих как факторы транскрипции [13]. Целевыми генами для факторов транскрипции являются гены нейротрофинов, митохондриальных и цитозольных антиоксидантных ферментов, антиапоптотических факторов, эритропоэтина, фактора роста эндотелия сосудов

VEGF (vascular endothelial growth factor), вовлеченных в нейрососудистое ремоделирование [13; 14].

С учетом результатов исследования подтверждается индукция гипокситерапией нейропротекции и нейропластичности мозга, что доказывает значительное улучшение поведенческих реакций, а именно высшей нервной деятельности (памяти, условно-рефлекторной деятельности) у лабораторных животных.

Заключение

Таким образом, наше исследование доказывает статистически значимое улучшение показателей функционирования высшей нервной деятельности (условно-рефлекторной деятельности) у затравленных АС лабораторных животных с предварительным гипоксическим прекондиционированием и, как следствие, наличие индуцирующего нейропротекцию и нейропластичность действия гипобарической гипокситерапии в режиме 0,6 атм. ежедневно в течение 7 дней.

Список литературы

1. Отравление свинцом. WHO World Health Organization. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health> (дата обращения: 10.03.2022)
2. Anastasio A., Caggiano R., Macchiato M., Paolo C., Ragosta M., Paino S., Cortesi ML. Heavy Metal Concentrations in Dairy Products from Sheep Milk Collected in Two Regions of Southern Italy. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2006. vol. 47. no. 69 P. 569-577.
3. Разыков З.А., Юнусов М.М. Оценка уровня загрязнения воды реки Сырдарья тяжелыми металлами (на территории Республики Таджикистан) // XXI век. Техносферная безопасность. 2016. Т. 1. № 4. С. 48–53.
4. Nurmadieva G.T., Zhetpisbaev B.A. Influence of the ecosystem on human health in the industrial developed regions of Kazakhstan. *Nauka i Zdravookhranenie*. 2018. vol.20 no. 4. P. 107-132.
5. ВОЗ факторы здоровья. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.grandars.ru/college/medicina/factory-zdorovya.html#a3> (дата обращения: 10.03.2022)
6. Титова В.И., Дабахов М.В., Дабахова Е.В. Экотоксикология тяжелых металлов. М.: Учебное пособие, 2001. 135 с.
7. Комусова О.И. Влияние ацетата свинца на кору головного мозга и кровь при введении антиоксидантов, 06.02.01. Автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Саранск, 2017. 175с.

8. Dirnagl U., Becker K., Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol.* 2009. vol. 8. no. 4. P. 398-412.
9. Rybnikova E., Samoilov M. Modern concepts of the molecular mechanisms of hypoxic pre- and postconditioning using hypobaric hypoxia. *Front Neurosci* 2015. vol. 9. no. 10. P. 388–388.
10. Baillieul S., Chacaroun S., Doutreleau S., Detante O., Pépin JL., Grani S. Hypoxic conditioning and the central nervous system: A new therapeutic opportunity for brain and spinal cord injuries? *Experimental Biology and Medicine.* 2017. vol. 242. no. 11. P. 1198-1206.
11. Lukyanova L.D., Sukoyan G.V., Kirov Yu.I. The role of pro-inflammatory factors, nitric oxide and some parameters of lipid metabolism in the development of immediate adaptation to hypoxia and accumulation of HIF-1alpha. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2013. vol. 154. no. 5. P. 597-601.
12. Rybnikova E., Glushchenko T., Tulkova E., Churilova A., Yaroshevich O., Baranova K., Samoilov M. Preconditioning induces prolonged expression of the transcription factors pCREB and NF-kappa B in the rat neocortex before and after severe hypobaric hypoxia. *Journal of Neurochemistry.* 2012. vol. 106. no. 3. P. 1450-1458.
13. Rybnikova E., Glushchenko T., Tyulkova E., Baranova K., Samoilov M. Preconditioning of mild hypobaric hypoxia increases the expression of transcription factors c-Fos and NGFI-A in the neocortex and hippocampus of rats. *Neuroscience Research.* 2019. vol. 65. no. 4. P. 360-366.
14. Самойлов М., Чурилова А., Глущенко Т., Баранова К. Паттерн нейрональной экспрессии транскрипционных факторов NF-kB при предъявлении различных режимов гипобарической гипоксии // *Фізіологічний журнал.* 2013. Т. 59. № 6. С. 132-140.