В.А. Вокина, Н.Л. Якимова, Л.М. Соседова, А.В. Лизарев

ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ В ПОЗДНЕМ ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ НА ПРОЯВЛЕНИЕ НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ТОЛУОЛА У ВЗРОСЛЫХ БЕЛЫХ КРЫС

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», Ангарск, Россия

Проведено исследование показателей поведения и ЭЭГ при толуольной интоксикации у животных с нормальным и нарушенным течением эмбрионального развития. Моделирование пренатальной гипоксии осуществляли путём введения раствора нитрита натрия в дозе 50 мг/кг на 18–19-й день гестации (E18). В возрасте 3 месяцев проводили ингаляционное воздействие толуолом (150 ppm, 4 недели) на самцов из полученного потомства. После экспозиции оценивали параметры слуховых и зрительных вызванных потенциалов и поведение животных в «крестообразном лабиринте».

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, толуол, белые крысы, поведение, зрительные и слуховые вызванные потенциалы

INFLUENCE OF ACUTE HYPOXIA IN LATE GESTATION PERIOD ON THE DEVELOPMENT OF TOLUENE NEUROTOXIC EFFECT IN ADULT ALBINO RATS

V.A. Vokina, N.L. Yakimova, L.M. Sosedova, A.V. Lizarev

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russia

The aim of the present investigation is to estimate the role of prenatal hypoxia in toluene neurotoxic effect in adult rats. Toluene-induced behavioral and electroencephalographic manifestations were investigated in animals with normal and abnormal embryonic development. To simulate prenatal hypoxia, we gave subcutaneous injections of sodium nitrite to pregnant female rats in a dose of 50 mg/kg on the 18–19th day of gestation. At the age of 3 months the males from the offspring were exposed to toluene inhalation (560 mg/m³, 4 weeks, 4 h/day, 5 days/week). After toluene inhalation exposure we estimated rats' individual behavior by plus maze test and visual and auditory evoked potentials (VEPs and AEPs). Toluene reduced P2N2 interpeak amplitude of VEPs compared with control rats without any latency change. We found out that toluene exposure of rats with acute prenatal hypoxia in late gestation had led to inhibition of motor activity and a statistically significant increase in latency of VEP's N1, AEP's P3 and N1P2 interpeak amplitude of AEP in comparison with all remained groups. Thus, these results show that prenatal hypoxic damage to the central nervous system is an aggravating factor in toluene intoxication in rats.

Key words: prenatal hypoxia, toluene, albino rats, behavior, auditory and visual evoked potentials

За последние несколько десятилетий в современной науке стремительно развивается новое направление – «перинатальное программирование», в рамках которого рассматривается роль перинатальных факторов в развитии хронических заболеваний. Более ранние исследования в данном направлении были сосредоточены на роли недостатка нутриентов, кислорода или гормонов, ведущих к таким заболеваниям, как диабет, ожирение, гипертензия, ишемическая болезнь сердца или сахарный диабет второго типа [2, 6]. Наряду с этим наблюдается всплеск исследований, посвящённых изучению влияния материнского психологического стресса на развитие психоневрологических заболеваний у потомства [3, 5]. Рассматривая пренатальную гипоксию как мощный стрессовый фактор, мы предположили, что её последствия могут «программировать» развитие повышенной индивидуальной чувствительности к действию химических производственных факторов. В рамках данной гипотезы нами проведена серия экспериментов, целью которых являлось изучение роли пренатальной гипоксии в развитии повышенной чувствительности белых крыс к действию широко распространённого в промышленности и быту нейротоксического соединения – толуола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование пренатальной гипоксии осуществляли путём подкожного введения раствора нитрита натрия беременным самкам белых крыс в дозе 50 мг/кг на 18–19-й день гестации ($n = 15$). Потомство контрольных животных получено от самок, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном объёме ($n = 10$). В дальнейшем из полученного потомства в эксперименте использовались только самцы. В возрасте 2,5–3 месяцев половина особей из потомства как контрольных, так и опытных самок подвергалась ингаляционному толуолу в затравочных камерах (560 мг/м³; 4 недели, 4 часа в день, 5 дней в неделю) – данные животные составили группы «толуол» и «Г18 + толуол» соответственно. Второй половине животных в ингаляционные камеры подавали чистый воздух – данные животные составили группы «контроль» и «Г18». Спустя 4 недели постэкспозиционного периода проводили обследование всех групп животных в крестообразном лабиринте, представляющем собой установку из четырёх одинаковых тупиковых отсеков (30 × 30 × 30 см), соединённых между собой через такую же пятую центральную камеру с отверстиями 12 × 12 см в стенке для входа со стороны центральной камеры. Животное помещали в

центральную камеру и позволяли ему исследовать помещения лабиринта до тех пор, пока животное не производило 13 посещений его тупиковых камер. Заход в тупик считали состоявшимся, если животное переносило все 4 лапы в это отделение лабиринта. Последовательность переходов и их продолжительность регистрировали с помощью компьютерной программы RealTimer. Последующий анализ включал в себя выделение и оценку следующих видов поведения: латентный период начала исследования лабиринта; общее время в лабиринте, затраченное на 13 заходов в его тупики; количество вертикальных стоек; суммарная длительность нахождения в отсеках и центре лабиринта; латентный период полного обхода лабиринта; количество диаметральных переходов из тупика в тупик через центральный отсек. После окончания обследования наркотизированных животных (кетамин 75 мг/кг, рометар 10 мг/кг, внутривенно) помещали в стереотаксическую установку, освобождали поверхность черепа от мягких тканей и имплантировали два регистрирующих электрода. Электроды (диаметр 100 мкм, длина 2 мм) вживляли стереотаксически в точки с координатами AP = 1,5 от лямбды, L = 2 (№ 1, зрительная кора); AP = 1,5 от брегмы, L = 2 (№ 2, сенсомоторная кора). Глубина введения электродов в кору составляла 2 мм. Индифферентный электрод вживляли в носовые кости. Регистрацию зрительных и слуховых вызванных потенциалов (ЗВП и СВП) проводили через 3–4 дня после вживления электродов с использованием многофункционального комплекса «Нейрон-Спектр-4» (ООО «Нейрософт», Россия). Анализировали абсолютные латентности пиков P1, N1, P2, N2, а также межпиковую амплитуду комплексов N1P2 и P2N2.

Животные всех групп содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986).

Статистический анализ результатов исследования проводился с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.1. (StatSoft Inc., США)

(лицензия № АХХR004Е642326FA). Для сравнения групп применяли U-критерий Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При тестировании животных в «крестообразном лабиринте» наблюдалась активация двигательной активности, индуцированная толуолом (табл. 1), в данной группе животных (группа «толуол») число «вертикальных стоек» превышало показатели контрольной группы ($p = 0,001$), в то время как латентный период полного обхода был значительно ниже ($p = 0,02$). Животные, подвергавшиеся пренатальной гипоксии (группа «E18»), на полное обследование лабиринта тратили значительно больше времени, чем демонстрировали снижение двигательной активности. Тестирование экспонированных толуолом крыс с нарушенным течением эмбриогенеза показало, что локомоторная активация, вызванная действием толуола, компенсируется последствиями пренатальной гипоксии и менее выражена. Кроме того у животных данной группы («E18 + толуол») наблюдалась тенденция к повышению числа диаметральных переходов из тупика в тупик через центральный отсек крестообразного лабиринта, что свидетельствовало о нарушении навигационного обучения и пространственной памяти.

Результаты электроэнцефалографического обследования показали, что существенного влияния на параметры СВП и ЗВП животных с нормальным пренатальным развитием толуол не оказывает. Выявлено снижение межпиковой амплитуды P2N2 ЗВП, по сравнению с контрольными животными, без изменения латентности основных пиков ЗВП и СВП (табл. 2).

У животных, подвергавшихся воздействию пренатальной гипоксии, наблюдалось значительное повышение латентности пиков N1, P2, N2 и P3 ЗВП и СВП ($p < 0,01$) без изменения межпиковых амплитуд N1P2 и P2N2. При воздействии толуола на животных с пренатальной гипоксией наблюдалась статистически значимое увеличение латентности пиков N1 ЗВП и P3 СВП, а также тенденция к повышению межпиковой амплитуды N1P2 СВП, по сравнению со всеми группами («толуол», «E18» и «контроль»).

Таблица 1

Результаты тестирования белых крыс в крестообразном лабиринте, Me (LQ; UQ)

Показатели	Варианты исследования			
	Контроль (n = 28)	Толуол (n = 25)	E18 + толуол (n = 18)	E18 (n = 18)
Число вертикальных стоек	21 (18; 24)	27 (25; 32)*	24 (16; 26)#	16 (15; 23)
Суммарная длительность в центре, с	86 (75; 94)	76 (65; 92)	101 (82; 118)#	134 (111; 152)*
Суммарная длительность в отсеках, с	242 (194; 282)	226 (177; 285)	202 (208; 272)	312 (234; 378)*
Латентный период первого визита, с	5 (3; 8)	4 (2,7; 5,6)	10 (7; 20)*, #	8 (4; 14)
Время на 13 визитов в отсеки, с	368 (283; 392)	268 (241; 358)	330 (292; 366)#	426 (392; 512)*
Латентный период полного обхода, с	181 (116; 229)	106 (84; 164)*	137 (113; 202)	198 (161; 221)
Число диаметральных переходов	1 (1; 2)	2 (1; 2)	2 (1; 3)	1,5 (0; 2)

Примечание: * – различия статистически значимы, по сравнению с контролем, при $p < 0,05$; # – различия статистически значимы, по сравнению с группой «толуол», при $p < 0,05$; n – число животных в группе.

Таблица 2
Показатели слуховых и зрительных вызванных потенциалов головного мозга белых крыс, Me (LQ; UQ)

Показатели		Контроль	Толуол	E18 + толуол	E18
Зрительные вызванные потенциалы					
Латентность (мс)	N1	72 (68; 82)	72 (68; 83)	142 (125; 156)*:#	170 (153–180)*
	P2	108 (105; 120)	107 (106; 116)	223 (190; 242)*:#	250 (206–264)**
	N2	155 (143; 168,5)	154 (144; 160)	273 (264; 320)*:#	305 (269–318)**
	P3	205 (198; 233)	232 (221; 256)	342 (320; 344)*:#	340 (320–342)**
Амплитуда (мкВ)	N1–P2	11,5 (3–12)	7 (5; 11)	16 (1; 34)	16 (7–29,5)
	P2–N2	23,5 (12–42,5)	1 (0; 7)*	7 (4; 25)	18,5 (9,5–35)
Слуховые вызванные потенциалы					
Латентность (мс)	N1	72 (71; 80)	81 (77; 83)	130 (114; 167)	149 (135–216)**
	P2	111 (108; 119)	120 (113; 126)	197 (177; 216)	209 (180–254)**
	N2	151 (149; 166)	151 (148; 175)	260 (221; 299)	278 (272–288)**
	P3	238 (265; 257)	234 (212; 253)	279 (273; 322)	318 (306–341)**
Амплитуда (мкВ)	N1–P2	9 (3–24)	14 (2; 27)	24 (16; 42)	11 (5–23,5)
	P2–N2	17,5 (9–24)	21 (4; 49)	9 (3; 49)	9,5 (2–13)

Примечание: * – различия статистически значимы, по сравнению с контролем, при $p < 0,05$; # – различия статистически значимы, по сравнению с группой «толуол», при $p < 0,05$; число животных в каждой группе равно 10.

Наши предыдущие работы показали, что влияние экспозиции толуола на показатели поведения зависит от условий пренатального развития. Так, при воздействии толуола на животных с пренатальной гипоксией на ранних постимплантационных стадиях эмбриогенеза (E13) было выявлено повышение агрессивности, угнетение ЦНС и повышение тревожности [1]. Учитывая тот факт, что тормозное влияние на ЦНС и снижение когнитивных функций животных толуол вызывает при воздействии высоких уровней (500 ppm и выше) [4], можно предположить, что животные, подвергавшиеся пренатальной гипоксии, являются более чувствительными к воздействию токсиканта, демонстрируя подобные изменения уже в концентрации 150 ppm. Таким образом, в результате проведённых исследований подтверждена выдвинутая нами гипотеза и доказана возможность формирования в процессе онтогенеза повышенной индивидуальной чувствительности к действию нейротоксичных веществ на фоне пренатального гипоксического поражения ЦНС. Возможно, в подобных условиях более интенсивно могут развиваться процессы выработки зависимости к наркотическим средствам либо может повышаться риск отравлений профессиональными ядами при хронических экспозициях в низких дозах и т. п. Отсутствие необходимых сведений о механизме, лежащем в основе «программирования» повышенной чувствительности к действию нейротоксикантов после перенесённой пренатальной гипоксии, обосновывает необходимость дальнейших исследований в данной области.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Вокина В.А., Соседова Л.М., Рукавишников В.С., Якимова Н.Л., Лизарев А.В. Нейротоксический эффект толуола на фоне пренатального гипоксического повреждения головного мозга белых крыс // Медицина труда и промышленная экология. – 2014. – № 4. – С. 30–34.
2. Vokina VA, Sosedova LM, Rukavishnikov VS, Yakimova NL, Lizarev AV (2014). Neurotoxic effect of toluene in the course of prenatal hypoxic brain damage in white rats [Neurotoksicheskiy effekt toluola na fone prenatal'nogo gipoksicheskogo povrezhdeniya golovnogogo mozga belykh krysl]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*, (4), 30-34.
3. Aiken CE, Ozanne SE (2014). Transgenerational developmental programming. *Human Reproduction Update*, (20), 63-75.
4. Babenko O, Kovalchuk I, Metz GA (2015). Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, (48), 70-91.
5. Bushnell PJ, Oshiro WM, Samsam TE, Benignus VA, Krantz QT, Kenyon EM (2007). A dosimetric analysis of the acute behavioral effects of inhaled toluene in rats. *Toxicol. Sci.*, (99), 181-189.
6. Khashan AS, Abel KM, McNamee R (2008). Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch. Gen. Psych.*, (65), 146-152.
7. Lau C, Rogers JM, Desai M, Ross MG (2011). Fetal programming of adult disease: implications for prenatal care. *Obstet. Gynecol.*, (117), 978-1063.

Сведения об авторах
Information about the authors

Вокина Вера Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» (665827, г. Ангарск, 12а микрорайон, 3; тел.: 8 (3955) 55-40-89; e-mail: vokina.vera@gmail.com)

Vokina Vera Aleksandrovna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer of the Laboratory of Biological Modeling and Translational Medicine of East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research (665827, Angarsk, 12a microdistrict; tel.: +7 (3955) 55-40-89; e-mail: vokina.vera@gmail.com)

Якимова Наталья Леонидовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» (e-mail: tox_lab@mail.ru)

Yakimova Natalya Leonidovna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer of the Laboratory of Biological Modeling and Translational Medicine of East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research (e-mail: tox_lab@mail.ru)

Соседова Лариса Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» (e-mail: sosedlar@mail.ru)

Sosedova Larisa Mikhaylovna – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Biological Modeling and Translational Medicine of East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research (e-mail: sosedlar@mail.ru)

Лизарев Александр Викторович – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований»

Lizarev Aleksandr Viktorovich – Candidate of Medical Sciences, Junior Research Officer of the Laboratory of Biological Modeling and Translational Medicine of East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research