

**МЕДИЦИНА**

УДК 612.821.2

*Г. П. МИРОНОВА, Л. С. ХАНИЛО, С. Г. ПАШКЕВИЧ***ВЛИЯНИЕ СНИЖЕНИЯ НАПРЯЖЕНИЯ КИСЛОРОДА НА КОГНИТИВНЫЕ  
ФУНКЦИИ КРЫС***(Представлено членом-корреспондентом В. А. Кульчицким)**Институт физиологии НАН Беларуси, Минск**Поступило 23.03.015*

**Введение.** Мозг составляет 2 % от общей массы тела, а потребляет 20 % всего кислорода. Работа нейронных популяций напрямую зависит от насыщения крови кислородом. Недостаточное кровоснабжение головного мозга функционального характера, например, при проведении ортостатической пробы, может сопровождаться обморочным состоянием у людей с вегетативными дисфункциями [1; 2]. Острые нарушения мозгового кровотока становятся причиной развития неврологических и психических расстройств, одним из проявлений которых является нарушение когнитивных функций (память, внимание, речь, психомоторная координация) [3]. Гиппокамп «кодирует» информацию для последующего хранения в мозге, что является основой процессов запоминания. Короткий период ишемического воздействия сопровождается повреждением СА1 области, тогда как СА3 область и зубчатая фасция устойчивы к нему [4].

Известно, что многократно повторяющаяся гипоксия легкой и средней степени оказывает своеобразный защитный эффект на когнитивные функции мозга [5; 6]. В опытах на монгольских песчанках продемонстрировано, что кратковременные интервальные воздействия сублетальной ишемии предотвращают гибель чувствительных пирамидных нейронов области СА1 гиппокампа в ответ на последующую глобальную ишемию [7]. Гипобарическое прекондиционирование ослабляет не только структурные повреждения при повторном воздействии гипоксии, но и нарушения высших функций мозга, в частности, способствует сохранению памяти [8]. У мышей после 8-минутной билатеральной окклюзии общих сонных артерий отмечен нейрогенез и миграция нейробластов из субвентрикулярной зоны в стриатум и неокортекс [9]. Аноксическое 5-минутное прекондиционирование у новорожденных крыс не вызывает гибель нейронов и на протяжении 3 недель активизирует образование нейроноподобных элементов в зубчатой извилине и субвентрикулярной зоне. Новообразованные клетки мигрируют преимущественно в высокочувствительные к ишемии зоны головного мозга, к примеру, такие как СА1 зона гиппокампа. [10]. Таким образом, одним из компенсаторных механизмов защиты нейронов головного мозга при изменении напряжения кислорода в нервной ткани является процесс нейрогенеза.

Эти фундаментальные знания обосновывают адекватность повышения резистентности нейронов к гипоксическим воздействиям путем «тренировки» прекондиционирующими умеренными гипоксическими и/или кратковременными ишемическими воздействиями. Изменение кислородного режима организма является одним из факторов, координирующим взаимосвязь кардиоритма с изменениями тонуса сосудов мозга, что также влияет на когнитивно-мнестическую деятельность человека [11]. В условиях гипоксии существенная часть компенсаторных реакций осуществляется посредством взаимодействия бульбарного дыхательного центра и супрабульбарных образований. Одним из важнейших комплексов супрабульбарных структур, обеспечивающих адаптивную регуляцию дыхания, является лимбическая система, и в частности, гиппокамп [12]. Феномен прекондиционирования является наиболее изученной кардиопротективной

стратегией. При этом механизмы повышения устойчивости к недостатку кислорода нейронов мозга и в настоящее время являются дискутабельными.

Установлено, что важными критериями сохранения функционального состояния нейронов после ишемического инсульта являются предшествующий воздействию уровень внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) и особенности ионного гомеостаза [1]. При возбуждении ускоряется расходование АТФ и креатинфосфата, а при торможении замедляется. При дополнительном воздействии сильного внешнего раздражителя защитные рефлексы млекопитающих могут развиваться по типу «борьба–бегство», соответственно с активным расходом или экономией эндогенных ресурсов.

Учитывая вышесказанное, для выяснения механизмов кратковременной гипоксической активации функций мозга проведены эксперименты на белых крысах с предварительно выработанным условным рефлексом избегания в челночной камере по методике Я. Буреша, О. Бурешовой, Дж. Хьюстон [13].

**Материалы и методы исследования.** Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах ( $n = 28$ ) массой 170–200 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария (температура воздуха  $23 \pm 1$  °С, вентиляционный режим 30 мин/ч) при свободном доступе к воде и пище, 12/12-часовом режиме освещения и темноты с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными [14].

Для изучения процессов запоминания у животных в качестве модели обучения с отрицательным подкреплением использован тест выработки условных рефлексов в челночной камере [13].

До начала выработки условного рефлекса крыс ( $n = 18$ ) в течение 4–5 суток проведен хэндлинг (держали каждую крысу в руках по 2–3 мин в день) и адаптация к экспериментальным условиям (нивелирование проявлений ориентировочного рефлекса). Затем в течение 5–6 суток у животных выработан условный рефлекс избегания в челночной камере, состоящей из двух разных по площади отсеков – большого ( $41 \times 47 \times 30$  см) и малого ( $15 \times 25 \times 30$  см). В каждом отсеке камеры имеется металлический решетчатый пол и предусматривается селективное включение света. Между камерами находится отверстие, имитирующее вход «в норку». Отверстие при необходимости перекрывается дверцей. За один сеанс обучения осуществляется 8–10 сочетаний условного раздражителя (включение света) с безусловным ноцицептивным стимулом (пропускание тока силой 0,008–0,01 мА в течение 1–2 сек по решетчатому полу в отсеках большой или малой камеры, где находится крыса). Животных, у которых условный рефлекс долгое время не вырабатывается, не берут в эксперимент.

После выработки условного рефлекса избегания (критерием чего было проявление защитного рефлекса на включение света без подкрепления) у всех крыс измеряют латентный период реакции избегания (ЛПРИ) в течение 2–3 суток (фон). После измерения фоновых показателей ЛПРИ животных разделяют на 2 группы. В соответствии с протоколом опытов в день основного эксперимента крыс опытной группы ( $n = 12$ ) подвергают кратковременной (5 мин) гипобарической гипоксии. Контрольные животные ( $n = 6$ ) с выработанным условным рефлексом избегания гипоксии не подвергают.

Для моделирования сдвига газового гомеостаза создают гипобарическую гипоксию (в сосуде, объемом 2 л в течение 5 мин, условный подъем на высоту 2300 м над уровнем моря, снижение барометрического давления до 577,6 мм рт. ст., что сопровождается снижением парциального давления кислорода  $PO_2$  до 121 мм рт. ст.) *in vivo* с применением декомпрессора. Для измерения давления разреженных газов используют вакуумметр (100 КПа, Россия). С целью исключения влияния гиперкапнии с помощью химического поглотителя  $Ca(OH)_2$  96 % и NaOH 4 % адсорбируют  $CO_2$ .

Измерение ЛПРИ в день проведения эксперимента у крыс проводят спустя 15–20 мин ( $n = 6$ ) и 1,5 ч ( $n = 6$ ) после 5 мин гипоксии. Параллельно измеряют ЛПРИ и у контрольной группы животных ( $n = 6$ ). Динамику изменений ЛПРИ у всех крыс прослеживают на 3-и, 7-е, 14, 21, 28, 35, 42-е сутки после проведения основного эксперимента.

Для оценки пассивно-оборонительного рефлекса ( $n = 10$ ) применяют анальгезиметр Hotplate LE 7406 (Stoelting, США). Моделью ноцицептивной реакции служит тепловое воздействие ( $t = 55$  °С)

на конечности животных согласно стандартной методике N. B. Eddy, D. Leimbach (1953). В этих условиях регистрируют суммарную двигательную активность (СДА): количество вертикальных стоек, горизонтальных перемещений, актов груминга. Защитные рефлексы сопровождаются соответственно активным расходом (гипералгезия, увеличение СДА) или экономией эндогенных ресурсов (гипоалгезия, уменьшение СДА). При этом укорочение латентного периода ноцицептивного рефлекса (ЛПНР) свидетельствует о развитии гипералгезии, а увеличение – гипоалгезии.

Полученные данные статистически обрабатывают методом ANOVA с применением *t*-критерия Стьюдента. Для построения графиков используют программу Origin-6.1.

**Результаты и их обсуждение.** Величина ЛПРИ у крыс ( $n = 18$ ) до проведения эксперимента с гипоксией (фон) при переходе из большой камеры в малую составляла в среднем  $2,4 \pm 0,1$  с, из малой камеры в большую –  $4,6 \pm 0,2$  с.

Показано, что через 15–20 мин после 5-минутной гипоксии у крыс опытной группы наблюдалось достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение (в 5 раз – от  $4,6 \pm 0,2$  до  $22,7 \pm 4,0$  с) ЛПРИ при переходе из малой камеры в большую. Латентный период реакции перехода из большой камеры в малую также в 1,5 раза возрос по сравнению с фоном (рис. 1, а).

Спустя 1,5 ч наблюдений изменения ЛПРИ стали более выраженными, а именно, латентный период (ЛП) реакции перехода из малой камеры в большую возрос в 7,6 раз по сравнению с фоном, а из большой камеры в малую – в 3,2 раза (рис. 1, б).

На 3-и сутки после проведения эксперимента с гипоксией ЛПРИ при переходе из большой камеры в малую у крыс контрольной и опытной групп практически не отличался от фона (рис. 1, 2). Величина ЛП реакции перехода из малой камеры в большую у крыс контрольной группы сохранялась на уровне фоновых значений, а у крыс опытной группы была в 2–2,5 раза выше фона.

На 7-е сутки наблюдения (или 14–15-е сутки с момента образования условного рефлекса) у крыс контрольной и опытной групп различий между величиной ЛПРИ и фоновым уровнем при переходе из большой камеры в малую не выявлено. В то время как ЛПРИ у крыс опытной группы при переходе из малой камеры в большую возрос по отношению к фону в 1,3 раза (рис. 1), а у крыс контрольной группы – в 3–3,5 раза (рис. 2).

На 14-е сутки наблюдения у животных контрольной группы величина ЛПРИ при переходе из малой камеры в большую превышала уровень фоновых значений почти в 5 раз, а у крыс опытной группы, подвергавшихся гипоксии, – в 1,5–2 раза (рис. 1, 2). Рефлекс перехода из большой камеры в малую у крыс обеих групп сохранялся на уровне фона.

Только на 21-е сутки у животных опытной группы зафиксировано достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение в 2–2,5 раза по отношению к фону ЛПРИ при переходе из большой камеры в малую. Далее на 28, 35, 42-е сутки наблюдения ЛП реакции перехода из большой камеры в малую оставался фактически стабильным вплоть до окончания периода наблюдения (42-е сутки). Этот факт можно объяснить естественной защитной реакцией – избежать опасного открытого пространства в большом отсеке.

Величина ЛП реакции перехода из малой камеры в большую к 21-м суткам наблюдения продолжала нарастать у животных обеих групп, а к концу периода наблюдения (42-е сутки) величина ЛПРИ у контрольных крыс была выше фонового уровня в 5–6 раз, а у крыс опытной группы – в 2–2,5 раза (рис. 1, 2). Достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение ЛПРИ при переходе из малой камеры в большую является характерным признаком угасания выработанного условного рефлекса. Такая же картина развития уга-

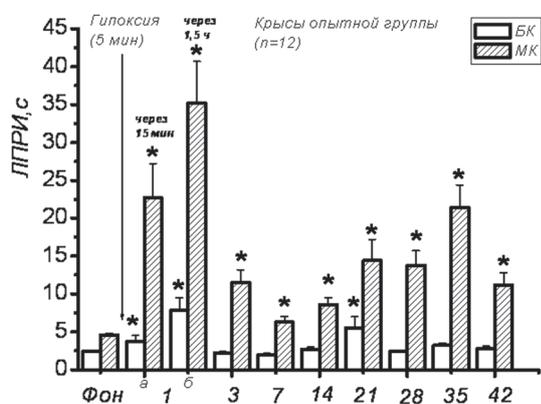


Рис. 1. Динамика величины ЛПРИ у крыс опытной группы, подвергавшихся кратковременной (5 мин) гипоксии. Фон – среднее значение ЛПРИ до гипоксии; белые столбики – ЛПРИ при переходе крыс из большой камеры в малую (БК); заштрихованные столбики – при переходе крыс из малой камеры в большую (МК); стрелкой указан момент предъявления 5 мин гипоксического стимула; а – ЛПРИ через 15–20 мин, б – через 1,5 ч после окончания воздействия гипоксии. По оси абсциссы указаны дни измерения ЛПРИ после проведения эксперимента с гипоксией; \* –  $p < 0,05$  по отношению к фону

сания условного рефлекса зарегистрирована ранее в экспериментах, проведенных на интактных животных [15]. Необходимо отметить, что у крыс опытной группы, подвергавшихся кратковременной гипоксии, угасание условного рефлекса происходило примерно в два раза медленнее, чем у крыс контрольной группы, которые гипоксии не подвергались.

Для оценки поведенческой активности и характера защитных рефлексов в тесте горячая пластина предварительно животных ( $n = 10$ ) подвергали воздействию гипобарической гипоксии, по методике, которая изложена выше.

Установлено, что через 1,5 ч после 5-минутной гипоксии СДА снижается в среднем на 20 % ( $p < 0,05$ ), через 3 суток возвращается в исходный уровень, и на 7-е сутки через 1,5 ч после моделирования более продолжительной 10-минутной гипоксии – снижается в среднем на 60 % ( $p < 0,05$ ). ЛПНР через 1,5 ч после 5-минутной гипоксии увеличивается в среднем на 29 % ( $p < 0,05$ ), через 3 суток возвращается в исходный уровень, на 7-е сутки через 1,5 ч после повторного моделирования более продолжительной 10-минутной гипоксии – возрастает в среднем на 51 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

Таким образом, прекондиционирующий эффект 5-минутной гипоксии выявлен через 7 суток при повторной более длительной 10-минутной гипоксии. Поскольку снижение СДА сопровождается увеличением ЛПНР, подобный характер пассивно-оборонительного рефлекса свидетельствует о переходе организма в режим экономии эндогенных ресурсов, который позволяет сохранить энергетические ресурсы, в том числе для клеток мозга и выжить в условиях снижения напряжения кислорода. Результаты опытов подтвердили высказанную гипотезу об адаптивном характере повторных кратковременных гипоксических воздействий в отношении тяжелого гипоксического фактора.

**Заключение.** На основании полученных данных заключили, что кратковременная гипобарическая гипоксия сопровождается перестройкой интегративной деятельности мозга и механизмов обучения и памяти, которые уязвимы в условиях внезапного снижения напряжения кислорода в тканях мозга. Так, 5-минутная гипоксия сопровождается угнетением условного рефлекса, что наиболее выражено через 1,5 ч после воздействия. Кроме того, при кратковременной гипоксии замедляется естественный процесс угасания условного рефлекса (по сравнению с животными без гипоксии) и более длительно сохраняется выработанный условный рефлекс. Динамика пассивно-оборонительных рефлексов при этом свидетельствует об экономии эндогенных ресурсов организма.

Таким образом, систематические кратковременные гипоксические воздействия легкой степени сопровождаются пластическими перестройками в центральной нервной системе и оптимизацией контроля когнитивных функций, обеспечивающих процесс познания окружающего мира.

## Литература

1. Иванов К. П. // Успехи физиол. наук. 2012. Т. 43, № 1. С. 95–110.
2. Орлов Р. С., Ноздрачев А. Д. Нормальная физиология. М., 2009. С. 88–93.
3. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. М., 2001.
4. Vallet P. G., Charpiot A. // Encephale. 1994. Vol. 20, N 2. P. 131–137.

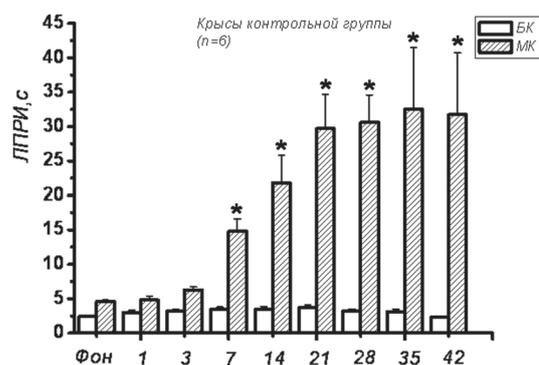


Рис. 2. Динамика величины ЛПНР у крыс контрольной группы (без гипоксии) в течение 42 суток после проведения эксперимента с гипоксией. Обозначения те же, что на рис. 1

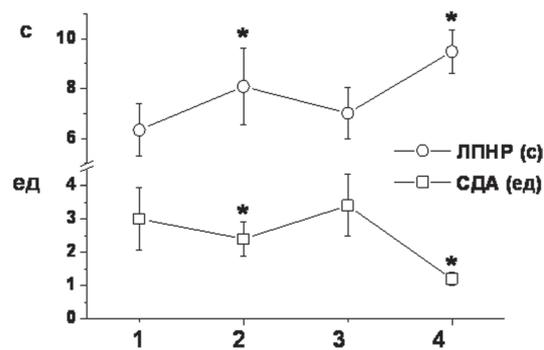


Рис. 3. Изменение суммарной двигательной активности (СДА) в единицах (ед) и латентного периода ноцицептивного рефлекса (ЛПНР, с): 1 – контроль; 2 – через 1,5 ч после 5-минутной гипоксии; 3 – через 3 суток после 5-минутной гипоксии; 4 – через 1,5 ч после 10-минутной гипоксии у крыс-самцов ( $n = 10$ ). \* –  $p < 0,05$  по отношению к контролю

5. Щербак Н. С., Выболдина Т. Ю., Галагудза М. М. и др. // Российский физиол. журн. 2012. № 8. С. 990–999.
6. Туровская М. В., Туровский Е. А., Кононов А. В. и др. // Биологические мембраны. 2013. Т. 30, № 5–6. С. 479–490.
7. Kitagawa K., Matsumoto M., Tagaya M. et al. // Brain Res. 1990. Vol. 528, N 1. P. 21–24
8. Самойлов М. О., Рыбникова Е. А., Чурилова А. В. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2012. № 3. С. 3–10.
9. Li Y., Yu S. P., Mohamad O. et al. // Transl. Stroke Res. 2010. Vol. 1, N 3. P. 184–196.
10. Pourie G., Blaise S., Trabalon M. et al. // Neuroscience. 2006. Vol. 140. P. 1369–1379.
11. Бурых Э. А., Сергеева Е. Г. // Физиология человека. 2008. Т. 34, № 6. С. 51–62.
12. Акопян Н. С., Адамян Н. Ю., Арутюнян Р. С. и др. // Нейронауки: теоретические и клинические аспекты. 2005. Т. 1, № 1 (приложение). С. 4–5.
13. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. Методика и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М., 1991.
14. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg : Europ. Treaty Series, 1986. N 123. – 48 p.
15. Миронова Г. П., Стрижак И. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2011. № 1. С. 52–55.

*G. P. MIRONOVA, L. S. KHANILO, S. G. PASHKEVICH*

skypasht@mail.ru

## **EFFECT OF AN OXYGEN TENSION REDUCTION ON THE COGNITIVE FUNCTION OF RATS**

### **Summary**

In experiments on 22 sexually mature male rats it was found that short-term hypobaric hypoxia is accompanied by restructuring the integrative activity of the brain and the mechanisms of learning and memory that are vulnerable to the oxygen tension in the tissues of the brain. The oxygen tension reduction during 5 minutes contributes to a two-fold increase of the safety period of the conditioned reflex of active avoidance. The preconditioning effect of 5 minute hypoxia is revealed in 7 days after repeated more prolonged 10 minute hypoxia. The decrease in the total motor activity (an average of 60 %) and the increase in the latency period of nociceptive reflexes (an average of 51 per cent) were accompanied in a test of the hot plate. A similar nature of passive-defensive reflex signals is indicative of the shift of the organism to the endogenous resources saving that allows us to save energy resources, including for brain cells, and to survive under the conditions of lower oxygen tension.