

На правах рукописи

Кокаева Фатима Феликсовна

**Поведение как критерий поражающего действия
техногенного загрязнения среды на организм животных и
эффективности мер коррекции**

**03.00.16 – экология
03.00.13 – физиология**

**Автореферат диссертации на соискание
ученой степени доктора биологических наук**

Москва 2006

Работа выполнена на кафедре высшей нервной деятельности
Биологического факультета Московского Государственного университета
им. М.В.Ломоносова и на кафедре анатомии и физиологии человека и
животных Северо-Осетинского Государственного университета им.
К.Л.Хетагурова

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАН, профессор В.Г.Скребицкий
доктор биологических наук, профессор Ю.П.Козлов
доктор медицинских наук, профессор В.В.Худолей

Ведущее учреждение - Институт глобального климата и экологии РАН

Защита диссертации состоится « »_____ 2006г. в 15 часов 30 мин
на заседании Диссертационного совета Д 501.001.55 в Московском
Государственном Университете им. М.В.Ломоносова
по адресу: 119892, г. Москва, Воробьевы горы, МГУ им. М.В.Ломоносова,
Биологический факультет, аудитория 389.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического
факультета МГУ им. М.В.Ломоносова

Автореферат разослан « »_____ 2006 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат биологических наук

Н.В.Карташова

Актуальность проблемы. Множество разнообразных, чуждых жизни по своей химической природе, отходов проникают в биосферу, накапливается в природных экосистемах, включается в трофические цепи и, в конечном счете, воздействует на человека и его окружение (Федоров, 1983). В настоящее время стало очевидно, что существование человека в условиях прогрессирующего загрязнения окружающей среды техногенными воздействиями есть неизбежная реальность сегодняшнего дня и, возможно, ближайшего будущего. Этот факт означает реальную угрозу для здоровья нации (Худолей, 1998; Авалиани, 2001; Ревич, 2004) и связан с рядом проблем, среди которых нам представилось интересным выделить следующие.

- Изучение ряда тест-систем для оценки в эксперименте нарушений в организме, развивающихся в условиях техногенного воздействия. Исследование общих закономерностей изменения поведенческих реакций объектов различного уровня сложности (от простейших до высших млекопитающих) с целью осуществления контроля за экологическим качеством различных биотопов (вода, воздух, почва).
- Моделирование в эксперименте совместного действия факторов техногенного загрязнения, приближенного к реальным условиям.
- Коррекция и предупреждение развития последствий воздействия техногенных загрязнений на организм человека с применением биологически активных комплексов природного происхождения.

В процессе мониторинга окружающей среды, в частности, тестирования уровня антропогенного загрязнения, исследователи в последние годы все чаще выбирают такие методы анализа, которые позволяют получить информацию о комплексном (интегральном) воздействии загрязнителей на организм животных и растений. Такой подход обоснован тем, что в реальной ситуации редко встречаются случаи изолированного воздействия на организм какого-либо фактора в «чистом» виде. Как правило, действуют смеси соединений самого различного состава

(Куценко, 2004). Один из возможных вариантов воспроизведения в лабораторных условиях действующих в реальных условиях смесей ксенобиотиков, как с целью прогноза возникновения нейрологических нарушений, индуцированных загрязнением окружающей среды, так и для экологического биотестирования, может состоять в использовании естественного комплекса антропогенных загрязнителей, аккумулированных в растениях (Смит, 1988; Dudka, 1996) и метеоосадках (Ревич, 1981; Будников, 1988), в качестве фактора воздействия в экспериментальных моделях поведения животных.

Преимущество использования экспериментальных моделей поведения животных, по сравнению с другими методами, для изучения механизмов поражения нервной системы в экологических исследованиях среды, определяется тем, что поведение может адекватно представлять суммарный индекс изменений в нервной системе, индуцированных загрязнением окружающей среды. Особый интерес представляет исследование для оценки экотоксикологических воздействий изменений в механизмах процесса формирования приобретенного поведения - обучения, которое сопровождается долговременной потенциацией синаптических систем (Bliss, Lomo, 1970; Скребицкий, 2004). Для отдельных экотоксикантов, в частности для свинца, экспериментально подтверждена связь их поражающего действия на формирования долговременной памяти с нарушением долговременной потенциации в гиппокампе (Carcia-Arenas, 2004).

Очевидно, экспериментальных модели поведения животных могут эффективно применяться в исследованиях по изысканию средств, повышающих устойчивость организма к действию техногенных загрязнителей. Предпочтение в этом поиске должно быть отдано биологически активным соединениям из натуральных источников. К таким препаратам относятся, в первую очередь, экстракты растительного происхождения (Соколов, Замотаева, 1990; Пастушенков, 1990). Механизм защитного действия растений на организм животных и человека есть

основания связывать с различными свойствами биологически активных веществ, входящих в их состав, от мембранозащитных (Бобков, 1984; Naik et al., 2003; Simic et al., 2003; Ferreira et al., 2005; Choi, Cho, 2005) до способности индуцировать апоптоз в злокачественных клетках (Rafi et al., 2002).

Результаты целого ряда исследований отечественных и зарубежных ученых, подтверждающие эффективность применения поведения животных в качестве тест-системы для оценки загрязнения среды (Таиров, Попович, 1989; Попович, Авалиани, 1992; Kulig, 1996; Кокаева, 1998; Кокаева, 2000; Кокаева, 2001; Тушмалова, 2002; Scott, 2004) позволяет обсуждать возможность формулировки концепции нового направления в экологическом мониторинге - поведенческого мониторинга. Краеугольным камнем концепции экологического мониторинга должны стать представления, развиваемые на основе анализа откликов на действие техногенных загрязнений, возникающих в поведенческих тест-системах организмов различного уровня биологической организации.

В настоящее время можно считать бесспорным, что, по меньшей мере, одним из путей реализации эффектов техногенных загрязнителей является их воздействие на мембраны, на процессы липоперекисного окисления в этих клеточных структурах (Владимиров, 1972; Козлов, 1973). Нарушениями функций мембран и их структуры под действием химических загрязнителей обусловлены поражения различных систем организма, в том числе систем, отвечающих за организацию поведения. Роль мембранотропного действия, в частности, тяжелых металлов в деструкции клетки показана для эритроцитарных мембран (Соколовский, 1974); синапсомембранных мембран нейронов (Fasistas, 1991); простейших (Дергач, 1995). Перечисленные факты открывают новые возможности использования простейших в качестве биообъектов для мониторинга. Плазматические мембраны высших организмов, в том числе и нейрональные, по своей структуре и выполняемым функциям сравнимы с мембранами одноклеточных (Хухо, 1990). Простейшие

(с одной стороны это клетка, с другой – одноклеточный организм) дают возможность изучить как клеточные, так и организменные реакции на токсическое воздействие. К настоящему времени, в частности, достаточно детально описана в качестве клеточного тест-объекта, позволяющего проводить исследование растворов на предмет выявления токсичных химических соединений, инфузория *Spirostomum ambiguum* (Applewhite, 1972; Тушмалова, 1988; Nalecz-Jawecki, 1997, Быканова, 2003)

В рамках обсуждаемых проблем несомненный интерес представляет комплексное исследование с привлечением в качестве потенциальных тест-систем для экологического мониторинга организмов различного уровня организации и экспериментальных моделей соответствующих поведению различного уровня сложности.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы состояла в изучении индуцированных экотоксикологическим воздействием сдвигов в состоянии систем различного уровня организации. В качестве исследуемых объектов были использованы как простейшие организмы, так и высшие млекопитающие. Это определило постановку следующих задач.

1. Изучить влияние комплекса техногенных загрязнителей (ТЗ), депонированных в естественных объектах (листьях липы и снежном покрове), на исследовательскую и эмоциональную активность крыс в экспериментальных моделях поведения.
2. Изучить влияние комплекса ТЗ, депонированных в естественных объектах (листьях липы и снежном покрове), на обучение и память крыс в экспериментальных моделях поведения.
3. Изучить влияние комплекса ТЗ, депонированных в естественных объектах (листьях липы и снежном покрове), на обучение и память крыс в экспериментальных моделях поведения при различном типе пищевых жиров в составе рациона.

4. Изучить влияние комплекса ТЗ на состояние митохондрий печени крыс.
5. Изучить влияние комплекса ТЗ на функциональное состояние подвижность и осмотическую устойчивость инфузории *Spirostomum ambiguum* по показателям осмотической устойчивости и подвижности.
6. Изучить возможность применения экспериментальных моделей поведения крыс для выявления адаптогенных свойств растительных экстрактов, соответствующих условиям действия ТЗ.
7. Изучить влияние растительных экстрактов, характеризующихся потенциальной адаптогенной активностью в условиях действия ТЗ, на состояние митохондрий печени крыс.

Научная новизна работы. Впервые предложено на основе анализа влияния ТЗ, депонированных в листьях растений и снежном покрове, на животных различного уровня организации, применение комплекса техногенных загрязнителей, аккумулированных в различных естественных объектах в качестве экспериментальной модели ксенобиотического профиля среды.

Впервые показано, что комплекс ТЗ, депонированных в листьях растений и снежном покрове, приводит к нарушению поведения крыс в экспериментальных моделях.

Впервые показано, что комплекс ТЗ, аккумулированных в листьях липы и снежном покрове, оказывает повреждающее действие на митохондрии печени крыс, проявляющееся в активации перекисного окисления липидов и нарушении проницаемости мембран.

Впервые показано, что комплекс техногенных загрязнителей, аккумулированных в естественных природных объектах, нарушает функциональное состояние *Spirostomum ambiguum*.

Впервые описана однонаправленность сдвигов, индуцируемых комплексом ТЗ в состоянии биологических систем различного уровня

организации и, при этом, показано, что чем выше уровень биологической системы тем разнообразнее перечень реакций-откликов на действие ТЗ

Научно-практическая значимость работы

В теоретическом плане работа расширяет представления о повреждающем действии аккумулированных в объектах окружающей среды техногенных загрязнителей.

Показана предпочтительность изучения поведенческих реакций для оценки нарушений в функциональных системах мозга под влиянием техногенных загрязнителей. Комплекс поведенческих реакций может быть использован в качестве суммарного показателя изменений в нервной системе животных, индуцированных загрязнением окружающей среды. Использованные методы исследования поведения животных могут быть применены для оценки как острых воздействия, так и для мониторинга состояния.

Практическое значение проведенных исследований заключается в выявлении положительного эффекта использования некоторых компонентов растительного сырья для уменьшения тяжести негативного воздействия исследованного комплекса техногенных загрязнителей.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на международной конференции «Средства массовой информации в экологическом образовании» (Владикавказ, 1996), на 3-ей и 4-ой Международных экологических конференциях «Устойчивое развитие горных территорий» (Владикавказ, 1998, 2001) на XVII съезде физиологов России (Ростов-на-Дону, 1998), на Всероссийской конференции «Атмосфера и здоровье» (Санкт-Петербург, 1998), на международном конгрессе «Биометеорология–2000» (Санкт-Петербург, 2000).

Публикация результатов исследования

По теме диссертации опубликована одна монография и более 30 научных статей.

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, четыре главы экспериментальных исследований, включающих описание результатов, их обсуждение и резюме, заключение и выводы. Список литературы состоит из 124 источников на русском и 92 на иностранном языках. Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста и иллюстрирована 25 рисунками и 32 таблицами.

Материалы и методы

Животные. Работа выполнена на белых беспородных крысах самцах. Крыс содержали на диете, разработанной в Институте питания АМН России.

Калорийность диеты обеспечивали белки (18%), липиды (26%), углеводы (56%).

Методы исследования поведения животных

Тест «открытое поле». Крысу помещали в центр арены диаметром 90 см с полом, расчерченным тремя концентрическими окружностями, находящимися на равных расстояниях друг от друга, и восьмью диаметрами; наблюдали за поведением крысы в течение 5 минут. В поведении крысы выделяли следующие визуально идентифицируемые поведенческие акты: пересечение диаметров (пробеги), пересечение окружностей (переходы), число актов груминга и замирания, число стоек с опорой на стенки и без опоры. После 5 минут исследования животное возвращали в клетку и тщательно протирали пол после каждого теста (Буреш, 1991).

Приподнятый крестообразный лабиринт. Животное помещали на центральную площадку лабиринта и в течение 5 минут визуально регистрировали его поведенческие акты. Рассчитывали два индекса тревожного поведения: I_p – отношение числа заходов в открытые рукава (ОР) к сумме заходов в открытые и закрытые рукава ($\times 100 \%$); I_t – отношение времени нахождения в светлых рукавах к суммарному времени нахождения в светлых и темных рукавах ($\times 100 \%$). Эти показатели являются стандартными

в методике оценки тревожности грызунов. Чем ниже показатели, тем выше тревожность и наоборот (Воронина, Островская, 1998).

Т-образный лабиринт. Животное помещали на “стартовую” площадку лабиринта и в течение 5 минут визуально регистрировали его поведенческие акты.

Задача пассивного избегания. Процедура состояла из 3 этапов.

1. Ознакомление. Животное помещали на деревянную платформу, выпускали и измеряли латентный период спуска. Через 10 с животное возвращали в жилую клетку. Эту процедуру повторяли 3 раза с интервалами в 30 минут. 2. Обучение. Как только крыса опускалась с деревянной платформы при третьей попытке, на решетчатый пол подавали ток (50 Гц, 1,5 мА), в течение 1–3 сек и после этого животное возвращали в жилую клетку. 3. Воспроизведение. Через 48 ч крысу вновь помещали на деревянную платформу и измеряли латентный период спуска. Тестирование заканчивали, когда животное воспроизводило реакцию спуска с платформы, или же оставалось на платформе более чем на 1 мин. Регистрировали латентное время спуска животного с платформы.

Задача активного избегания. Реакцию вырабатывали в челночной камере, состоящей из двух отсеков. У животных вырабатывали условный рефлекс за 2-5 дней, в течение которых было по 25 предъявлений в день (условный раздражитель – мигающий белый свет). Через 5 сек в той половине, где находилась крыса, включали безусловный раздражитель – электрический ток ($I = 2\text{mA}$) от источника переменного тока с фиксированным сопротивлением. При переходе животного в другой отсек при включении света ток не подавался. После выключения обоих раздражителей следовал межсигнальный интервал длительностью 15 сек. Регистрировали: количество реакций избегания (на свет) и реакций избавления (на ток), количество отказов от перехода, а также латентный период реакции. Критерием обученности служило наличие девяти избеганий в десяти последовательных применениях условного сигнала.

Задача спасения из воды. Для выработки реакции крысу медленно погружали в воду, причем голова животного обращена к фиксированной точке на окружности бассейна. Животному позволяли плавать до тех пор пока оно не найдет веревку и не выберется из воды в течение 5 минут. После окончания попытки животное помещали в теплую камеру, а затем возвращали в жилую клетку. Тестирование сохранения навыка производили таким же образом через 48 часов после обучения. Обучение выражается в уменьшении латентного периода избегания из воды на 2-й день. Регистрировали время нахождения веревки и число выпрыгиваний из воды (Буреш, 1991).

Задача узнавания знакомого предмета. Эксперимент включал три этапа: Первый день – сеанс ознакомления. Животных индивидуально помещали на 5 мин в камеру. Регистрировали двигательную, исследовательскую и эмоциональную активность. Второй день – сеанс обучения. Животных помещали на 5 мин в камеру, в которой предварительно были размещены два одинаковых объекта (объект 1, объект 2). Регистрировали число подходов к объектам, время исследования каждого объекта. Третий день – сеанс тестирования. Животных помещали в камеру, предоставляли возможность исследовать объекты. Объект 2 заменялся на незнакомый новый объект 2'. Регистрировали число подходов к объектам, время исследования каждого объекта в течение 5 мин. Рассчитывали индексы предпочтения по каждому объекту.

Тест принудительного плавания. Животных помещали в сосуд высотой 40 см и диаметром 30 см, заполненный теплой (28–30 °C) водой (Porsolt, 1978). Наблюдали крыс до их полного погружения в воду и отмечали три основных показателя: активное плавание (крыса перемещается в воде, энергично перебирая лапами), аверсивную активность (число прыжков из воды), а также периоды неподвижности. Каждый показатель усреднялся за 1 мин регистрации. Частное от деления числа самых коротких циклов

неподвижности на общее число циклов активного плавания принимали за "индекс депрессивности" (Арушанян, 1989).

Биохимические методы исследования

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли из печени крыс по методу Johnson, Lardy (1967).

О барьерной стабильности митохондриальных мембран судили по изменению оптической плотности суспензии митохондрий в результате инкубации в изотонической среде. Измерение оптической плотности производили через каждые 10 мин в течение получаса на фотокolorиметре «Спектромом 410 (Венгрия) при светофильтре $\lambda = 450$ нм.

Определение содержания конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли колориметрически, регистрируя оптическую плотность цветного комплекса продуктов ПОЛ с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Владимиров, 1972).

Методы исследования функционального состояния инфузории *Spirostomum ambiguum*. Культуру *Spirostomum ambiguum* содержали по описанной методике (Данильченко, Тушмалова, 1983) В качестве показателей функционального состояния регистрировали индекс спонтанной двигательной активности (Тушмалова, 1988) и время жизни в условиях осмотического стресса в гипертонических растворах хлористого натрия и дистиллированной воде (Кокаева, 2001).

Определение в воде содержания солей свинца, цинка, железа, кадмия и молибдена. Определение в воде содержания солей свинца, цинка, железа, кадмия и молибдена проводили на атомном абсорбциометре фирмы «PERKIN ELMER» (США). Предварительно 100 мл исследуемых проб выпарили на водяной бане до влажных солей. В дальнейшем их окисляли с добавлением 5,0 мл концентрированной азотной кислотой и 0,5 мл раствора пергидроля и опять выпаривали. К сухому осадку приливали 10,0 мл раствора, состоящего из равных долей концентрированной азотной кислоты

и дистиллированной воды. В этом растворе определяли содержание исследуемых элементов.

Статистическая обработка результатов проведена с помощью IBM совместимого компьютера, использованы критерии Стьюдента и Мана-Уитни.

Постановка экспериментов. Крыс содержали на диете, разработанной в Институте питания АМН России. В течение 40 дней крыс содержали на синтетической изокалорийной диете: белки (18 %), липиды (26 %) , углеводы (56 %), витамины и солевая смесь. Из хлебных крошек (300 г), сухого молока (30 г), жира (39 г), соли (12 г) формировали пищевой катыш. Солевая смесь (г) состояла: NaCl – 139,9; KH_2PO_4 – 388,8; MgSO_4 – 57,4; CaCO_3 – 380,4; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 26,4; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 4,55; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,53; $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,48; KJ – 0,72; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,024; NaF – 0,11; алюминиевые квасцы – 0,11 и поливитаминная смесь "Гептарис".

В серии по изучению воздействия комплекса техногенных загрязнителей, накопленных в листьях липы (*Tilia cordata*) исследования проводили на двух группах животных: 1- крысам в течении 40 дней в диету добавляли листья липы, собранные в районе с минимальной техногенной нагрузкой из расчета 10 г измельченных листьев на одно животное; 2 - крысам в диету добавляли листья липы из района с максимальной техногенной нагрузкой в той же дозе.

В серии по изучению воздействия комплекса техногенных загрязнителей, накопленных в талой воде снежного покрова исследовали две группы животных: 1 - животных в течение 40 дней поили талой водой из снежного покрова из района с минимальной техногенной нагрузкой; 2 - животных поили талой водой из района с максимальной техногенной нагрузкой;

В серии исследований по изучению роли липидного компонента пищи эксперименты были выполнены на крысах двух контрольных и двух подопытных групп. Крысы групп 1 и 2 получали в пищу листья из района с

минимальной техногенной нагрузкой в сочетании со свиным жиром (1) или растительным маслом (2). Крысы групп 3 и 4 получали в пищу листья из зоны техногенных загрязнений в сочетании со свиным жиром (3) или растительным маслом (4).

Серию исследований по изучению эффектов композита растительных экстрактов и отдельных экстрактов растений солодки голой, лавра благородного, лука репчатого проводили на группах животных, которым в диету добавляли листья липы из района техногенных загрязнений: первая группа животных ежедневно получала ТЗ в составе листьев липы с пищей; вторая группа животных ежедневно получала ТЗ в составе листьев липы с пищей и 1,5 мл композита или одного из экстрактов на крысу с водой. Через 3 недели исследовали поведение животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Настоящее исследование выполнено на материале г. Владикавказа, Республики Северная Осетия Алания. Состояние атмосферного воздуха в республике Северная Осетия Алания, отличаясь рядом специфических факторов, в целом отражает общую картину экологического состояния городов России. Из данных государственного отчета Министерства охраны окружающей среды следует, что общий объем промышленных и твердых бытовых отходов, накопленных в г. Владикавказе, составляет более 5,7 млн тонн. Происходит накопление таких опасных загрязнителей, как свинец, ртуть, кадмий, медь, цинк, фтор, диоксины, оксиды азота, диоксид серы, оксид углерода и других.

Неблагоприятное воздействие на окружающую среду города оказывают выбросы 230 промышленных, 75 автотранспортных и 93 сельскохозяйственных предприятий, расположенных на 220 км². Такой плотности промышленных предприятий нет ни в одном городе России. Основным «поставщиком» техногенных загрязнителей являются предприятия цветной металлургии («Электроцинк», «Победит», «Кристалл»), машиностроительные и металлообрабатывающие заводы («Бином», «Гран»,

«Магнит», «ОЗАТЭ» и др.), а также многочисленный автомобильный транспорт. Поскольку со всех сторон город окружен горами, загрязнители накапливаются в различных средах, что приводит к повышению дозы вредных веществ, превышающих установленные нормы.

Для исследования выбраны два района города: с низкой техногенной нагрузкой – фоновый уровень загрязнения, и с высокой техногенной нагрузкой – максимальный уровень загрязнения. Экологическое состояние выбранных районов города в таблицах 1, 2, 3.

Таблица 1. Загрязнения атмосферы (А) и почвы (Б) районов с высокой и низкой техногенной нагрузкой

А

Районы	Средние значения индексов загрязнения атмосферы загрязнения атмосферы в 1996-2002 гг				
	Сум- марный	Pb	SO ₂	NO	пыль
Район с высокой техногенной нагрузкой	6,30	1,55 ± 0,10	0,66 ± 0,02	4,75 ± 0,29	10,00 ± 7,8
Район с низкой техногенной нагрузкой	2,58	0,65 ± 0,10	0,35 ± 0,29	1,30 ± 0,00	0,80 ± 0,20

Б

Районы	Содержание тяжелых металлов в почве, мг/кг		
	Pb	Zn	Hg
Район с высокой техногенной нагрузкой	1474,50 ± 0,98	3015,50 ± 8,82	1,07 ± 0,00
Район с низкой техногенной нагрузкой	239,00 ± 5,88	473,50 ± 8,82	0,40 ± 0,20
ПДК	32,00	110,00	1,00

Таблица 2. Загрязнение снежного покрова районов с различной техногенной нагрузкой

Районы	Содержание металлов в снеге, мг/л			
	Fe	Pb	Cu	Co
Район с высокой техногенной нагрузкой	2,3	$2,8 \cdot 10^{-1}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-4}$
Район с низкой техногенной нагрузкой	1,4	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$0,7 \cdot 10^{-2}$	$5,7 \cdot 10^{-4}$

Таблица 3. Содержание примесей в водопроводной воде районов с различной техногенной нагрузкой

Районы	Содержание металлов в водопроводной воде, мг/л m)				
	Zn	Fe	Pb	Cd	Mo
Район с высокой техногенной нагрузкой	1,23±0,16	0,17±0,022	0,018±0,02	0,005±0,001	0,03±0,007
Район с низкой техногенной нагрузкой	0,34±0,81	0,084±0.01	0	0	0
ПДК	5,0	0,3	0,3	0,001	0,25

1. Поведение крыс. Нарушения, индуцируемые ТЗ, и их коррекция под действием растительных экстрактов

1.1. Поведение крыс в тестах на эмоциональность и исследовательскую активность. Нарушения, индуцируемые ТЗ, и коррекция их под действием растительных экстрактов

Поведение в тесте «открытое поле». Результаты данного фрагмента исследований позволили обнаружить, что хроническое введение в

организм крыс в составе пищи техногенных загрязнений, депонированных в листве липы, произрастающей в районе с высокой техногенной нагрузкой, приводит к нарушению поведения крыс в тестах «открытое поле» (Рис.1) .

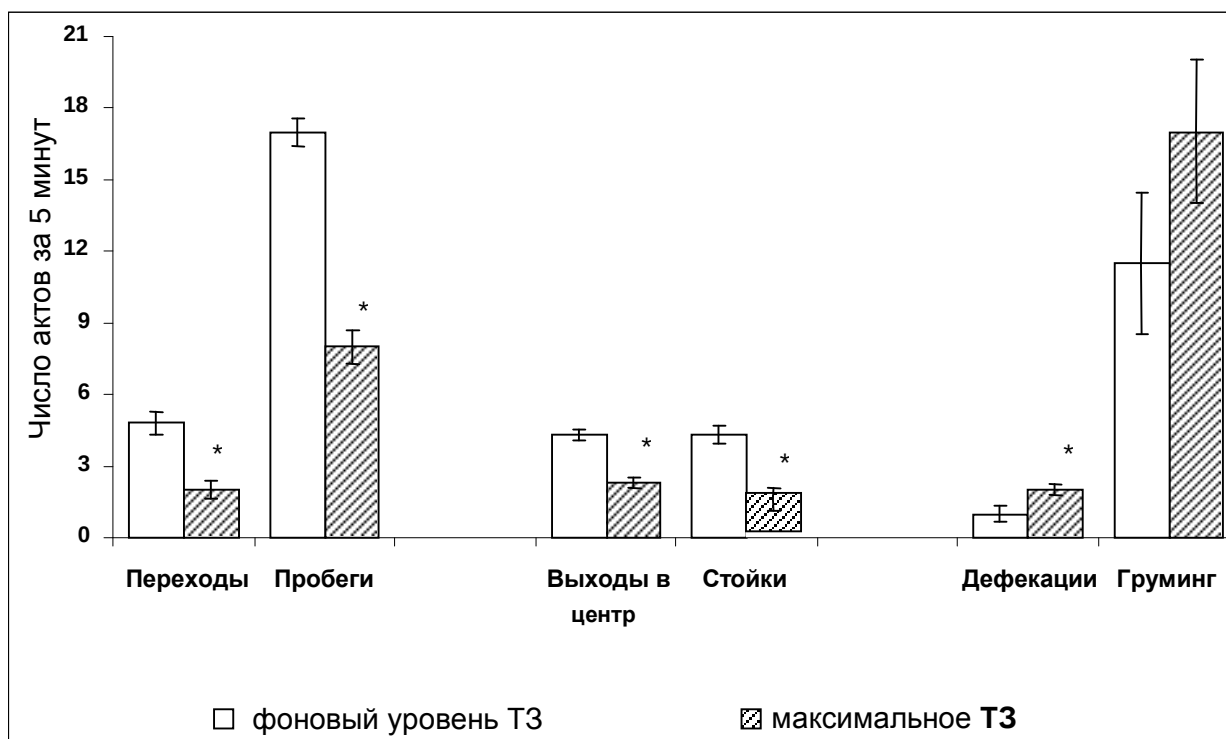
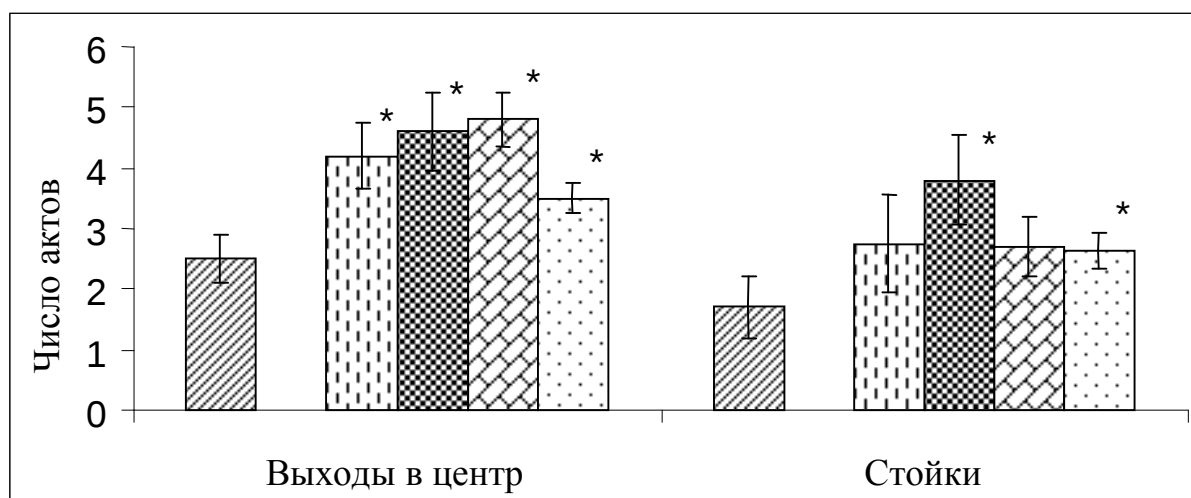


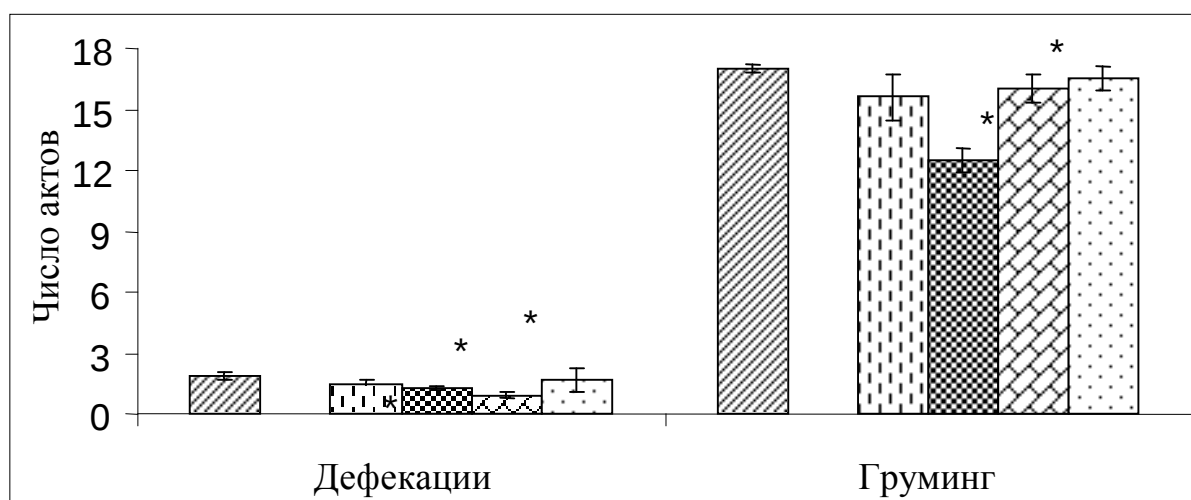
Рис. 1. Влияние ТЗ на поведение крыс в открытом поле.

* – $p < 0,05$, по сравнению с фоновым уровнем

Нарушения заключались в увеличении эмоциональности и тревожности и уменьшении исследовательской активности (Рис. 2). Нарушения были зарегистрированы по таким показателям, как число актов дефекации, груминга, выходов в центр, стоек в открытом поле. Применение экстракта солодки голой, лавра благородного, лука репчатого корректировало нарушения поведенческих показателей эмоциональности, и исследовательской активности у крыс в открытом поле что проявилось в уменьшении числа актов дефекаций и груминга, увеличении числа выходов в центр в открытом поле.



А



Б

- T3
- T3+экстракт солодки голой
- T3+экстракт лука репчатого
- T3+экстракт лавра благородного
- T3+пирацетам, 500 мг/кг

Рис. 2. Влияние растительных экстрактов на поведение крыс в тесте «открытое поле».

*– $p < 0,05$, относительно T3.

Поведение в тесте приподнятый крестообразный лабиринт. Хроническое введение в организм крыс в составе пищи адаптогенов натурального происхождения приводит к коррекции поведения крыс в приподнятом крестообразный лабиринте, нарушенного употреблением с пищей техногенных загрязнений, депонированных в листе липы,

произрастающей в районе с высокой техногенной нагрузкой. Уровень тревожности у крыс под действием экстрактов снижался (Рис. 3).

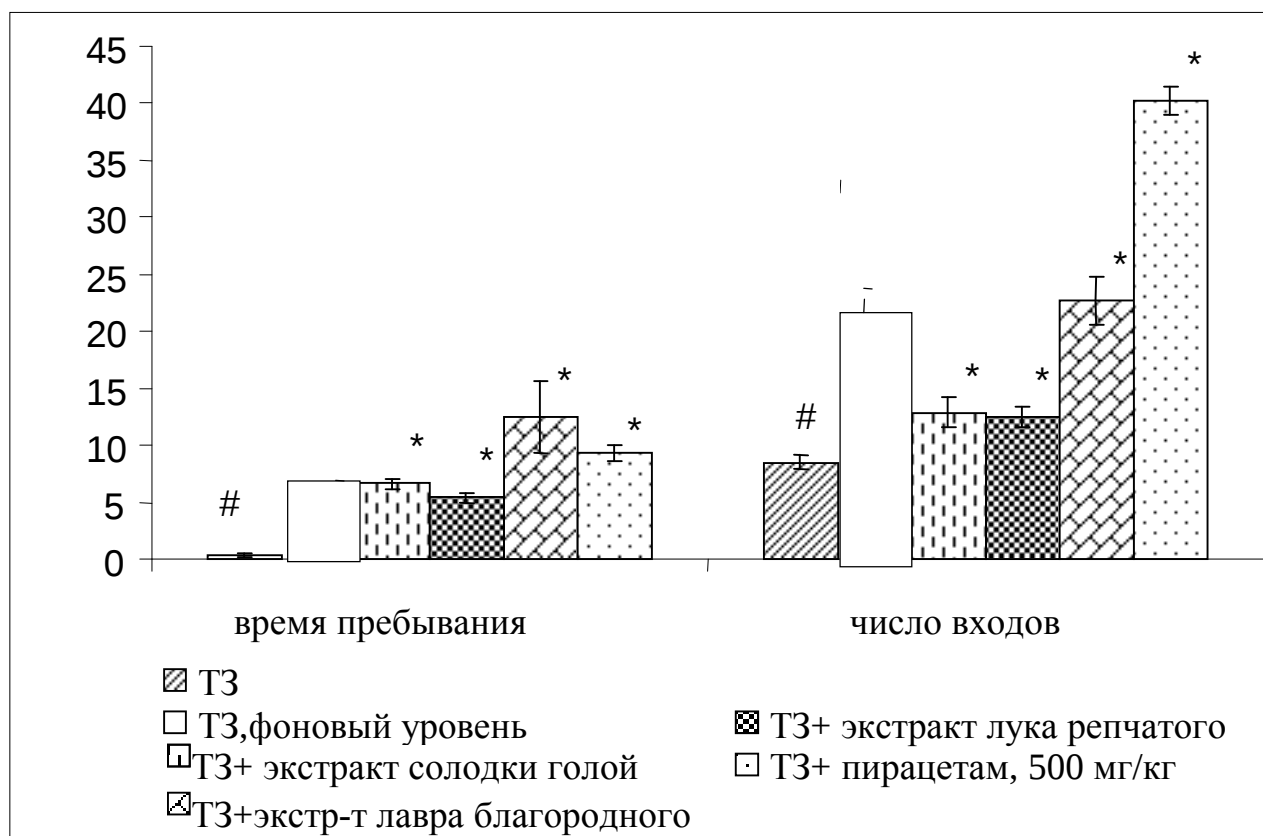


Рис. 3. Поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте.

* – $p < 0,05$, по сравнению T3,

– $p < 0,05$, по сравнению с фоновым уровнем T3

Поведение крыс в тесте вынужденного плавания. Введение в состав диеты воды с высоким содержанием T3 (талая вода из района с максимальной техногенной нагрузкой) изменяло поведение крыс в тесте. Время активного плавания уменьшалось по сравнению с крысами, которые получали воду из района с фоновым уровнем T3 ($2,0 \pm 0,5$ мин и $5,4 \pm 1,03$ мин, соответственно, $p < 0,05$). Однако индексы депрессивности в исследуемых группах достоверно не отличались (1,1 и 0,9, соответственно).

Поведение в Т-образном лабиринте. Применение композита оптимизировало поведенческие стратегии крыс в незнакомом Т-образном лабиринте за 5 мин наблюдения, что выразилось в уменьшении числа дефекаций, увеличении числа входов в аллеи лабиринта и вертикальных

стойке, уменьшении латентного времени достижения целевого отсека в сеансе ознакомления у животных, получавших его на фоне действия техногенных загрязнений по сравнению с животными, не получавшими экстракта (Табл. 4).

Таблица 4. Влияние композита из растительных экстрактов на поведение крыс в Т-образном лабиринте

Поведенческие акты	ТЗ	ТЗ + бальзам
Вертикальные стойки	18,6±3,1	23,75±5,3
Входы в аллеи	7,9±1,4	21,10±5,1*
Дефекации	3,7±0,5	2,70±1,08
Груминг	4,2±0,4	10,25±2,9*

*– $p < 0,05$.

1.2. Поведение крыс в экспериментальных моделях обучения и памяти. Нарушения, индуцируемые ТЗ, и коррекция их под действием растительных экстрактов

Поведение в задаче пассивного избегания (спуск с платформы). Хроническое введение в организм крыс в составе пищи техногенных загрязнений, депонированных в листве липы, произрастающей в районе с высокой техногенной нагрузкой, приводило к нарушению долговременной памяти у крыс в данной экспериментальной модели памяти. Нарушения проявились в уменьшении латентного времени спуска с платформы в сеансе воспроизведения (Рис. 4).

Экстракты солодки голой, лавра благородного, лука репчатого при их совместном введении с техногенными загрязнениями в состав диеты оказывали корректирующее действие на процессы, определяющие эффективность долговременной памяти у крыс в данной модели. Корректирующее действие проявлялось в увеличении латентного времени спуска с платформы в сеансе воспроизведения (Рис. 4).

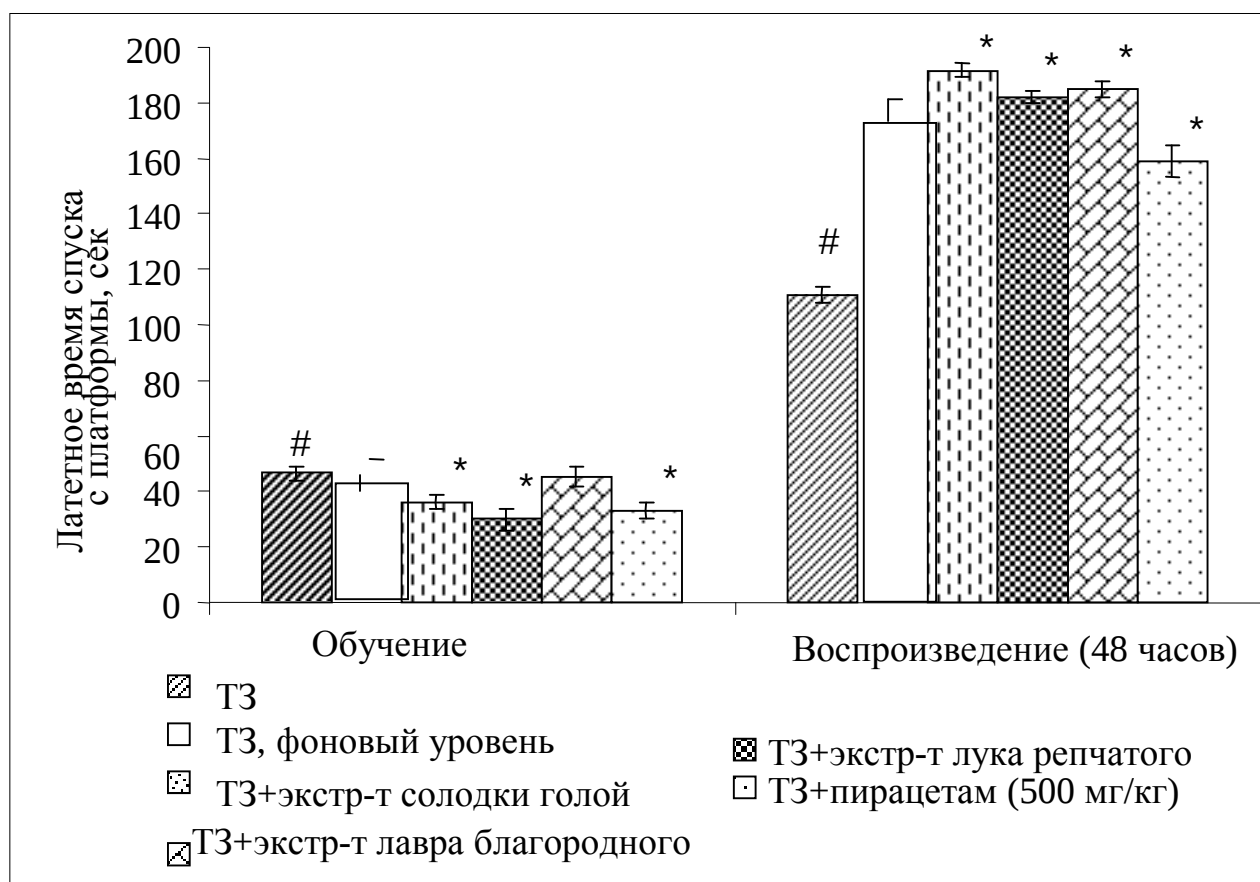


Рис. 4. Поведение крыс в задаче пассивного избегания (спуск с платформы).
* – $p < 0,05$, по сравнению с T3

– $p < 0,05$, по сравнению с фоновым уровнем

Поведение в задаче активного избегания. Хроническое введение в организм крыс в составе пищи техногенных загрязнений, депонированных в листве липы, произрастающей в районе с высокой техногенной нагрузкой, приводит к нарушению обучения крыс в данной модели. Нарушения проявились в увеличении числа предъявлений до выработки критериев обученности – 3, 5, и 9 правильных реакции подряд (Рис. 5).

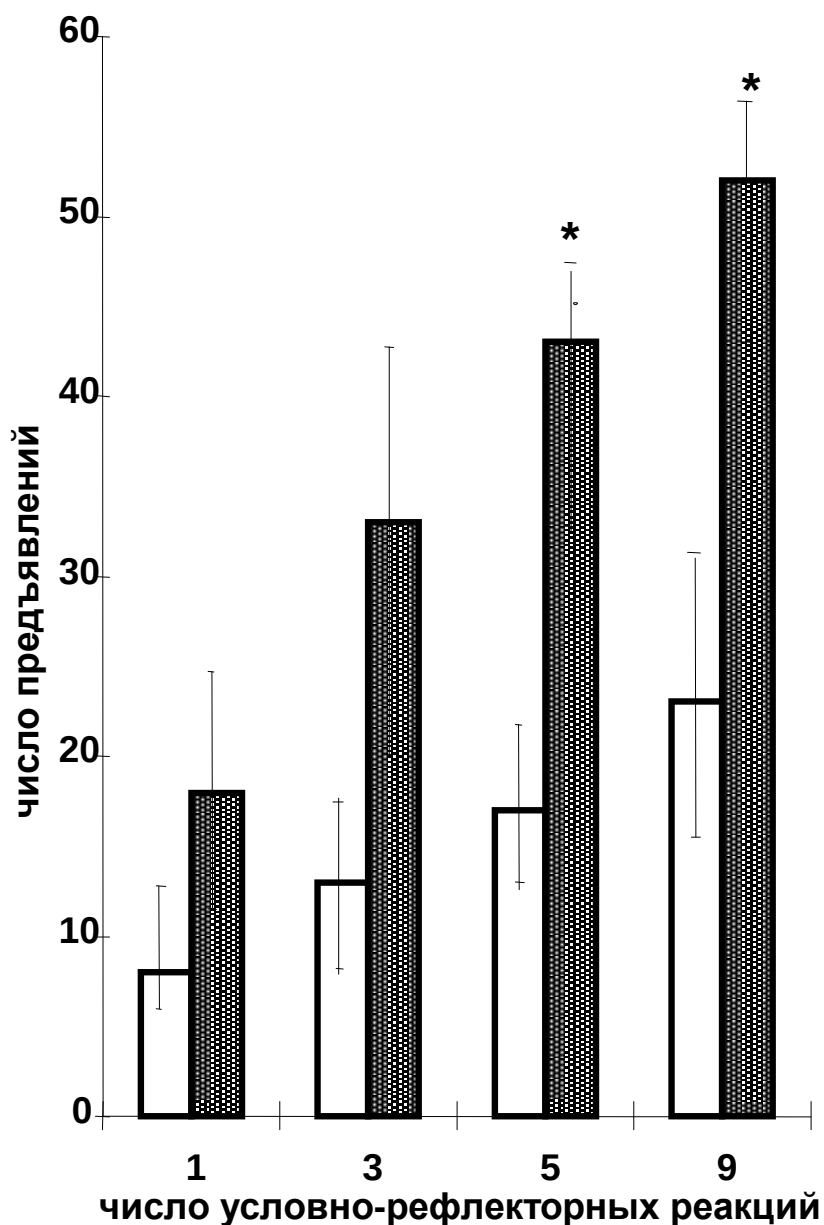


Рис. 5. Влияние ТЗ на обучение крыс в задаче активного избегания

□ - фоновый уровень ТЗ ■ - высокий уровень ТЗ

* – $p < 0,05$ по сравнению с фоновым уровнем

Введение в состав диеты композита из растительных экстрактов ускоряло обучение в задаче активного избегания - число предъявлений до достижения критериев обученности 3, 5 и 9 правильных реакций подряд у крыс, подвергнутых действию ТЗ и получавших композит уменьшалось. Однако наиболее выражено и статистически значимо действие композита растительных экстрактов проявлялось на этапе формирования упроченного навыка – уменьшалось число предъявления сочетаний условного и

безусловного сигнала до достижения критерия обученности 9 правильных реакций из 10 последовательных предъявлений условного сигнала (Рис. 6).

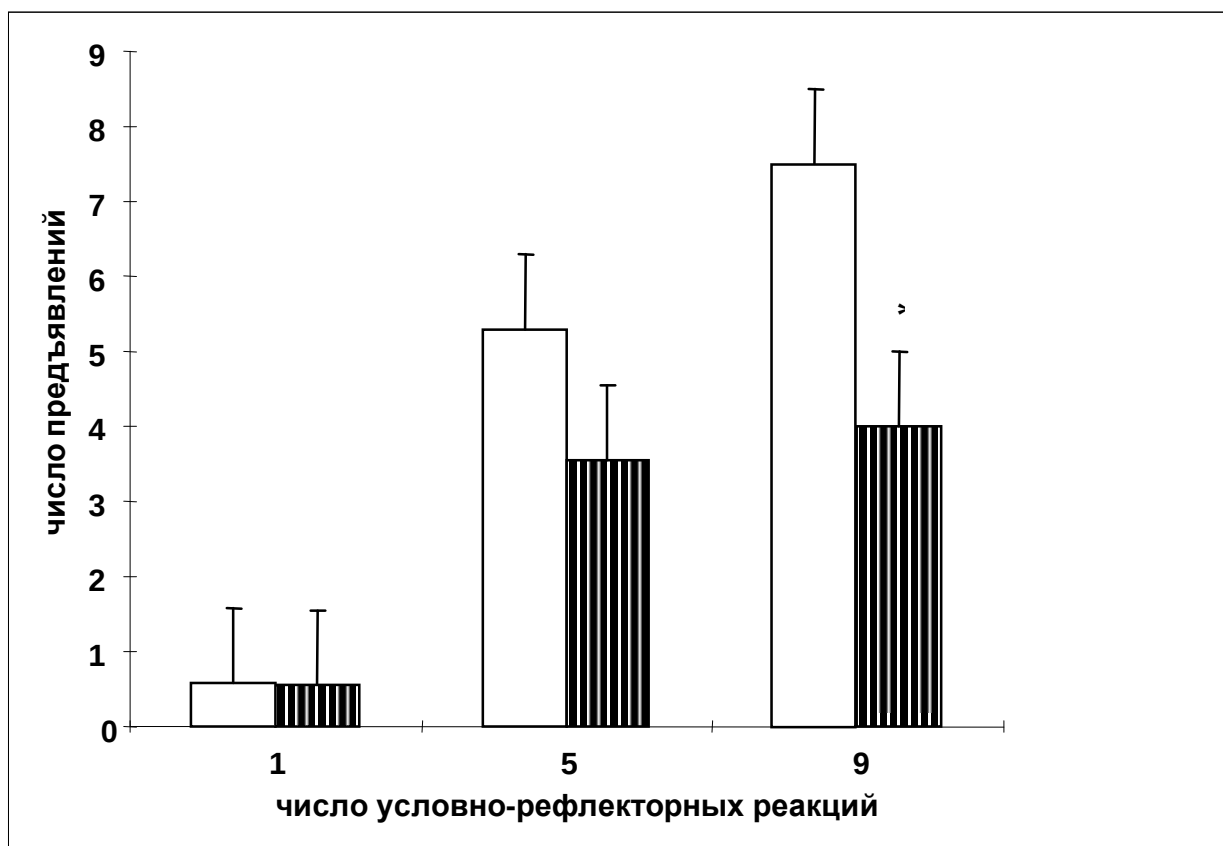


Рис. 6. Влияние композита из растительных экстрактов на обучение крыс в задаче активного избегания

□ – ТЗ; ▨ – ТЗ + композит растительных экстрактов
 * – $p < 0,05$ по сравнению с ТЗ

Задача спасения из воды. Хроническое введение в организм крыс в составе пищи техногенных загрязнений, депонированных в листве липы, произрастающей в районе с высокой техногенной нагрузкой, приводит к ухудшению показателя долговременной памяти в данной модели – увеличению времени достижения безопасной платформы по веревке в сеансе воспроизведения (Рис. 7).

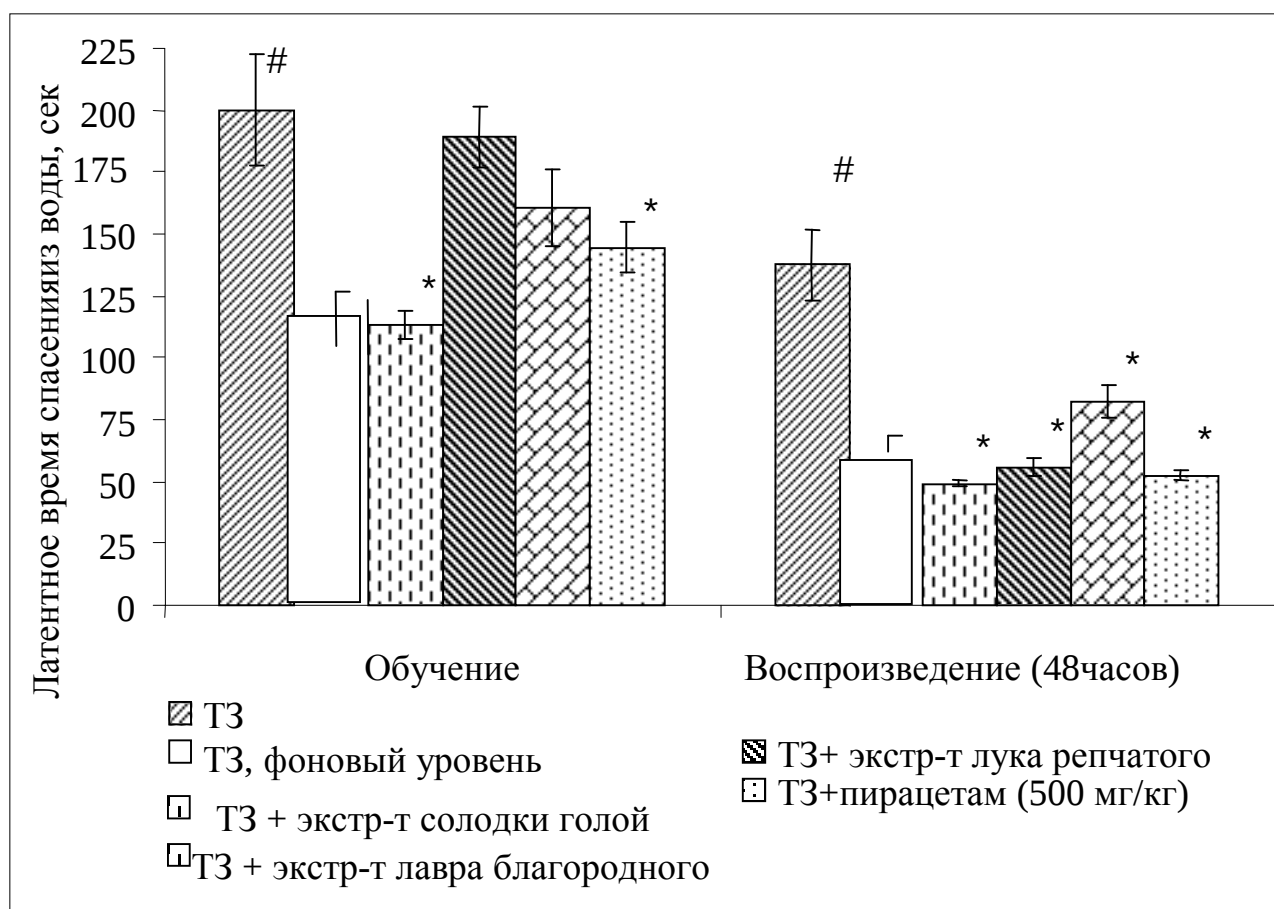


Рис. 7. Влияние растительных экстрактов на память крыс в задаче спасения из воды

* – $p < 0,05$, по сравнению с T3; # - $p < 0,05$ по сравнению с фоновым уровнем

Следует отметить, что у животных опытной группы, потреблявших в составе пищи листья из района с высокой техногенной нагрузкой, менялся характер плавания. Крысы в период неподвижности глубоко погружались в воду, так что на поверхности находился лишь кончик мордочки. Они чаще совершали слабые гребки задними конечностями, т.е. переходили к пассивному плаванию с отчетливым ограничением времени активных плавательных движений (Табл. 5).

Таблица 5. Поведение крыс в задаче спасения из воды

Поведенческие реакции	Группа животных	
	ТЗ, фоновый уровень	ТЗ, максимальное
Обучение		
Выпрыгивания из воды	$8,4 \pm 1,2$	$5,4 \pm 0,5 *$
Пассивное плавание, сек	$22,5 \pm 2,6$	$35,8 \pm 4,3*$
Замирание	$2,4 \pm 0,65$	$3,2 \pm 0,8$
Тестирование		
Выпрыгивания из воды	$4,7 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,7*$
Пассивное плавание, сек	$7,3 \pm 1,5$	$29,8 \pm 3,2*$
Неподвижность	$0,8 \pm 0,23$	$2,73 \pm 1,1*$

* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Введение экстрактов экстракт солодки голой, лавра благородного, лука репчатого в состав диеты животных, подвергаемых действию ТЗ, приводило к улучшению показателя долговременной памяти – уменьшению времени достижения безопасной платформы в сеансе воспроизведения (Рис. 7).

Задача узнавания знакомого предмета. Хроническое введение в организм крыс в составе пищи техногенных загрязнений депонированных в листве липы, произрастающей в районе с высокой техногенной нагрузкой, приводит к нарушению долговременной памяти у крыс в задаче на узнавание знакомого объекта. Нарушения проявились в уменьшении индекса предпочтения нового объекта в сеансе воспроизведения у животных, подвергнутых действию ТЗ (Рис. 8). Введение экстрактов солодки голой, лавра благородного, лука репчатого в состав диеты таких животных, приводило к улучшению показателя долговременной памяти в данной модели – увеличению индекса предпочтения нового предмета в сеансе воспроизведения (Рис. 8).

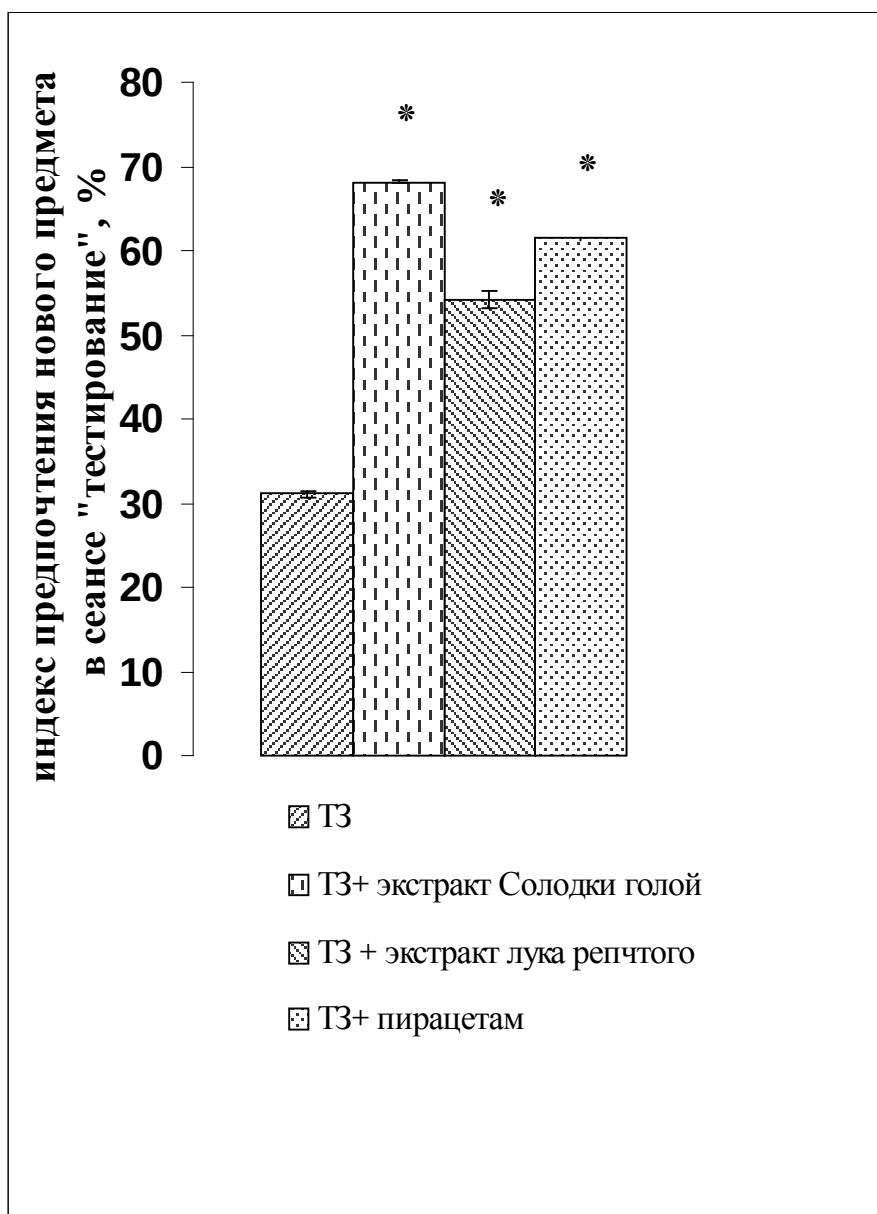


Рис. 8. Показатели памяти крыс в задаче узнавания знакомого предмета

* – $p < 0,05$, по сравнению с ТЗ

Таким образом, можно заключить, что на уровне поведения крыс, отражающего функционирование мозговых процессов участвующих в формировании эмоциональных состояний, исследовательской активности, обучения, памяти четко проявляется поражающее действие примененного нами комплекса ТЗ на организм.

Механизмы могут быть связаны с функционированием систем разного уровня. Нам представляется целесообразным выделить в качестве мишеней действия ТЗ мембранный гомеостаз и нейромедиаторный гомеостаз. В частности для одного из максимально представленных в комплексе

загрязнителя – свинца, показано при его продолжительном поступлении в организм даже в низких дозах поражающее действие на метаболизм серотонина в мозге (Haider, 2005). Показано, что снижение уровня серотонина в мозге может быть причиной снижения когнитивных способностей животных (Hughes, 2002), и нарушения эмоционального состояния животных (Wrase, 2006) и человека (Masters, 1996). Нарушение под действием свинца долговременной потенциации, мембранного механизма формирования долговременной памяти, связывается с нарушением в системе NO (Reddy, 2002).

Результаты представленные в первых двух разделах позволяют заключить, что экспериментальные модели поведения животных являются чувствительными тест-системами пригодными для выявления в спектре адаптогенных свойств растительных экстрактов компонентов, соответствующих условиям техногенного загрязнения среды существования организмов. Исследованные нами растительные экстракты являются эффективными средствами коррекции нарушений функций организма, регистрируемых на уровне поведения.

Из результатов наших исследований очевидно, что действие исследованных экстрактов однонаправлено с действием пирацетама, препарата группы ноотропов. В литературе действие пирацетама связывается, в том числе, с его способностью стабилизировать мембрану за счет увеличения кругооборота фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, а также активации фосфокиназ (Nagy, 1985). К важнейшим свойствам ноотропов относится их влияние на биоэнергетику нервной клетки. Показано, что при действии пирацетама происходит усиление синтеза и кругооборота АТФ в мозге (Боголепов, 1983; Борисюк, Кресюн, 1989), активация аденилатциклазы (Nikolson, 1976), увеличение синтеза протеинов (Tenchewa, 1979), РНК (Tuneva, 1979) и ДНК (Кокаева, Тушмалова, 1991).

В литературе описана антиоксидантная активность исследованных нами экстрактов. Экстракт корня солодки ингибирует перекисное окисление липидов в условиях действия ионизирующего излучения (Naik, 2003) и оксидативного стресса (Haraguchi, 2000). Лук содержащая диета уменьшает показатели оксидативного стресса, вызванного физической нагрузкой (Choi, Cho, 2005). Антиоксидантная активность экспериментально подтверждена у эфирных масел листьев лавра благородного (Simic, 2003; Ferreira, 2005).

Можно предположить, что выявленная в нашей работе способность исследованных экстрактов и композита экстрактов улучшать мнестические и когнитивные функции при воздействии ТЗ может определяться их стабилизирующим влиянием на биомембраны и влиянием на другие механизмы повышения резистентности организма, реализуемые через метаболическую активность мозга.

2. Поведение животных в экспериментальных моделях поведения. О роли липидного компонента в составе диеты в проявлении поражающего действия ТЗ.

В данном фрагменте работы исследована возможная роль различных по степени насыщенности пищевых жиров в модуляции индуцированных техногенными загрязнителями нарушений поведения крыс. С целью изучения такой возможности нами было изучено влияние алиментарных жиров на поведение в открытом поле и в задаче активного двустороннего избегания.

Поведение в задаче активного двустороннего избегания. Техногенные загрязнения нарушают обучение в задаче активного избегания. Тип жиров в составе диеты не влияет на поражающее действие ТЗ. Однако на фоне диеты с растительным маслом поражающее действие регистрируется на более ранних этапах формирования памяти. Различия статистически достоверны уже на этапе сокращения латентного времени реакции избегания и на этапе первых реакций избегания – предъявления с 11-го по 20-е (Табл. 6).

Таблица 6. Влияние типа жиров в составе диеты на динамику формирования реакции избавления в задаче активного избегания

Блоки предъявлений	Латентное время реакции избавления, среднее в блоке, сек			
	Фоновое ТЗ		Максимальное ТЗ	
	Свиной жир (1)	Растительное масло (2)	Свиной жир (3)	Растительное масло (4)
1–5	6,2±0,357	6,0±0,4	10,2±0,9*	8,2±0,75
6–10	7,9±0,8	5,0±0,28	9,5±0,92	7,2±0,9
11–15	5,2±0,35	3,4±0,4	7,4±0,82	5,7±0,5**
16–20	3,3±0,2	2,5±0,5	6,2±0,9	5,5±0,7**

* – $p < 0,05$ различия между группами 1 и 3;

** – $p < 0,01$ различия между группами 2 и 4.

На следующих этапах формирования правильной реакции различия между экспериментальными группами с разным типом жиров в составе диеты возрастают (Таб. 7).

Таблица 7. Влияние типа жиров в составе диеты на динамику обучения в задаче активного двустороннего избегания

Число правильных реакций подряд	Число предъявлений до выполнения последовательных реакций избегания			
	Фоновое ТЗ		Максимальное ТЗ	
	Свиной жир (1)	Растительное масло (2)	Свиной жир (3)	Растительное масло (4)
1	11,7±2,3	7,8±1,6	16,2±3,6	18,3±2,9*
3	16,7±1,4	13,5±2,6	39,2±8,2 [#]	33,0±9,3*
5	20,3±1,35	17,7±3,1	48,3±7,9 [#]	43,6±3,6**

** – $p < 0,01$ между группами 2 и 4; * – $p < 0,05$ между группами 2 и 4;

[#] – $p < 0,05$ между группами 1 и 3.

На основании результатов данного фрагмента исследований можно заключить, что тип жиров в составе диеты может определять характер

выраженности нарушений, индуцируемых ТЗ и регистрируемых на уровне поведения. Это дает основания предполагать в качестве одного из механизмов поражающего действия ТЗ на функционирование систем организации поведения нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза в мозге. Известно, что жирнокислотный состав плазматических, митохондриальных, рибосомальных, ядерных, лизосомальных мембран, в определенной степени зависит от типа жиров, потребляемых с пищей (Lenindger, 1969; Финагин, 1980; Крепс, 1981; Марзоев, 1982; Yamaoka, 1988). Скармливание животным свиного жира, который характеризуется высоким содержанием НЖК и низким содержанием ненасыщенных жирных кислот (ННЖК), приводит к повышению содержания НЖК в биомембранах. И, наоборот, скармливание растительного масла, которое содержит до 51–68 % ННЖК и значительно меньше, чем в свином жире, НЖК (Бренц, 1988), приводит к увеличению в липидном слое мембран доли ненасыщенных жирных кислот (Крепс, 1981; Марзоев, 1982). Известный интерес в связи с вышесказанным, представляло выяснение возможной роли различных по степени насыщенности пищевых жиров в модуляции индуцированных техногенными загрязнителями нарушений поведения крыс. С целью изучения такой возможности нами было изучено влияние алиментарных жиров на поведение в открытом поле и в задаче активного двустороннего избегания. На основании результатов данного фрагмента исследований можно заключить, что тип жиров в составе диеты может определять характер выраженности нарушений, индуцируемых ТЗ и регистрируемых на уровне поведения. Это дает основания предполагать в качестве одного из механизмов поражающего действия ТЗ на функционирование систем организации поведения сдвиги в окислительно-восстановительном гомеостазе.

3. Функциональное состояние митохондриальных мембран. Нарушения, индуцируемые ТЗ, и их коррекция растительными экстрактами

Техногенные загрязнители, поступающие с пищей в течение 40 дней, влияют на функциональное состояние мембран. На это указывают результаты по набуханию митохондрий печени и данные по регистрации уровня липоперекисного окисления в мембранах этих структур.

Во фракции митохондрий из печени крыс, которые получали с диетой листья липы, собранные в районе с высокой техногенной нагрузкой, скорость изменения оптической плотности, а, следовательно, и скорость набухания больше, чем у крыс, получавших листья из района с низкой техногенной нагрузкой (Рис. 9).

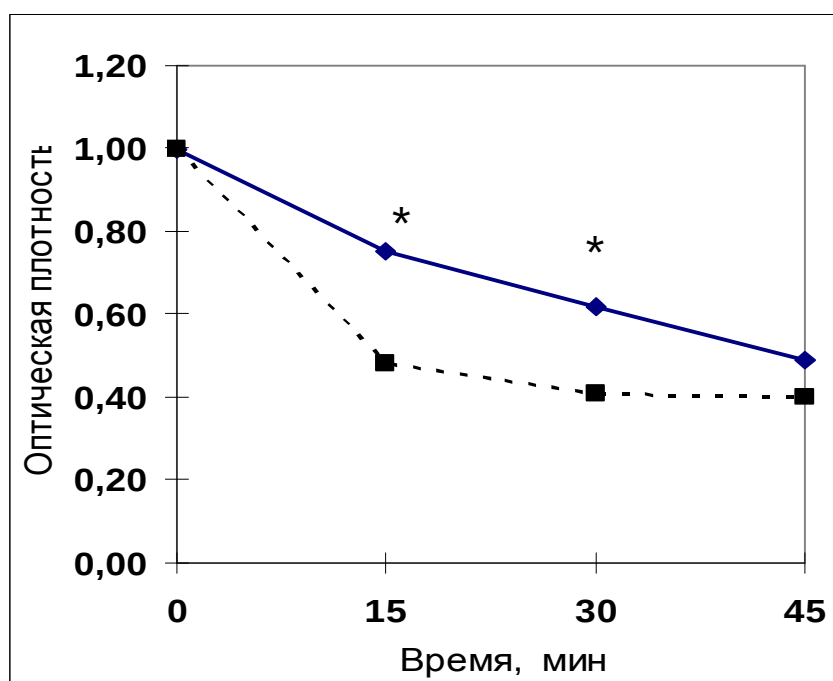


Рис. 9. Динамика изменений оптической плотности суспензии митохондрий, выделенных из печени.

■ – ТЗ, фоновый уровень; ♦ – ТЗ, максимальный уровень; * – $p < 0,05$.

Особенно интенсивно процесс набухания митохондрий печени подопытной группы происходит в первые 15 минут. Об уровне перекисного окисления липидов судили по скорости накопления малонового диальдегида (МДА) в митохондриях печени. Как следует из Рис. 10, количество МДА в начале инкубации и скорость накопления этого метаболита свободнорадикального перекисного окисления липидов в препаратах из печени крыс группы,

получавшей ТЗ в составе диеты, превышали соответствующие показатели контроля.

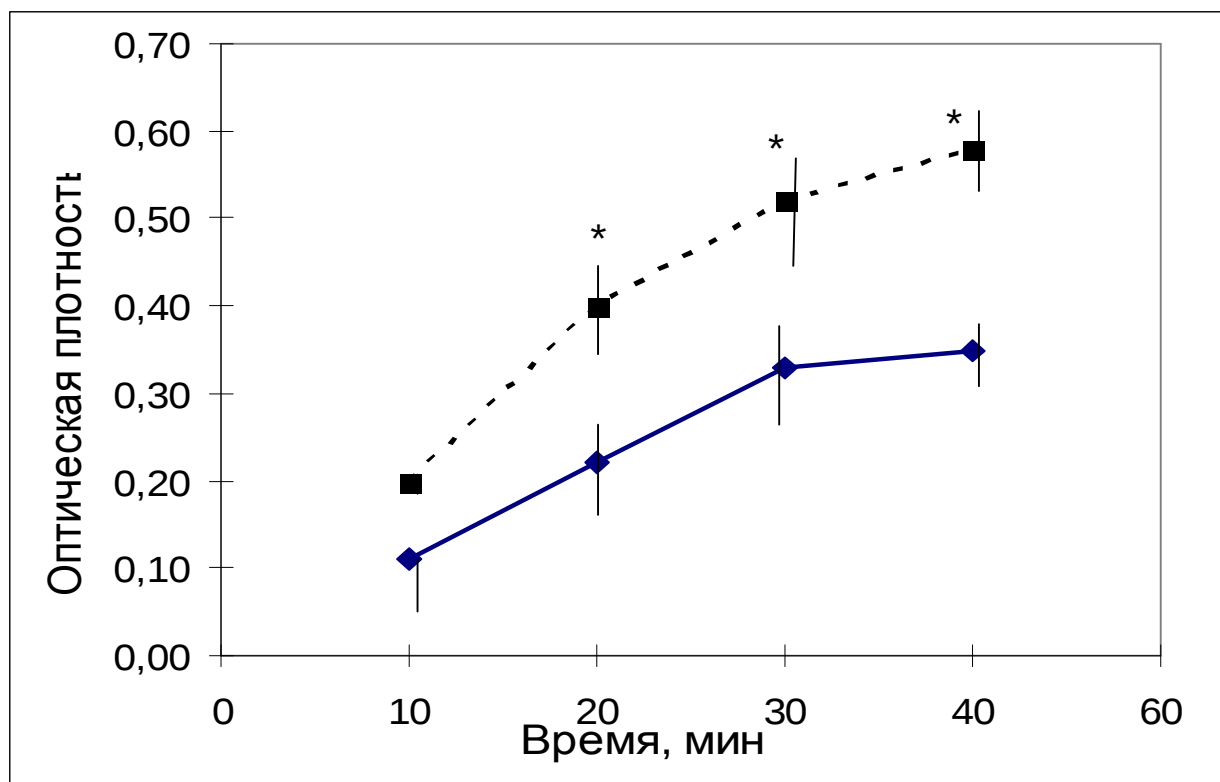


Рис. 10. Влияние техногенных загрязнителей из листьев липы на содержание МДА в изолированных митохондриях печени крыс

■ – ТЗ высокий уровень; ◆ – ТЗ, фоновый уровень

* – $p < 0,05$.

Наблюдаемые различия могут объясняться рядом причин: увеличением содержания перекисей ненасыщенных жирных кислот, снижением содержания в этих органеллах природных антиоксидантов, уменьшением вязкости мембран и другими изменениями, индуцируемыми активацией ПОЛ в мембранах.

Для изучения влияния техногенных загрязнений, депонированных в снежном покрове на мембранные структуры митохондрий, была проведена специальная серия экспериментов.

Как видно на Рис. 11, исходный уровень малонового диальдегида (МДА) в двух исследуемых популяциях был практически одинаковым.

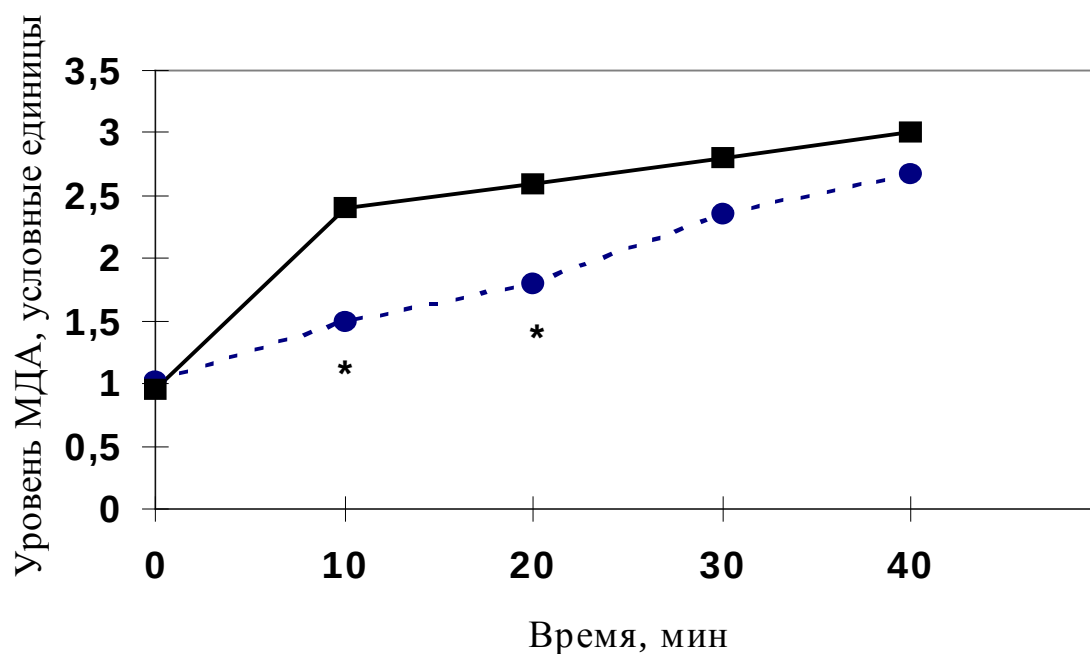


Рис. 11. Показатели ПОЛ митохондрий печени крыс, получающих талую воду из различных по степени техногенной нагрузки районов.

● – ТЗ, фоновый уровень; ■ – ТЗ, максимальный уровень; * – $p < 0.05$.

Известно, что в условиях *in vitro* между процессами перекисного окисления и скоростью гидролиза фосфолипидов митохондрий существует прямая связь (Андрющенко, 1984). Следовательно, при техногенном воздействии вследствие активации ПОЛ наблюдается дискоординация метаболизма липидов.

Как по содержанию исходного уровня МДА, так и по скорости накопления этого продукта за 40 мин инкубации большее значение зарегистрировано в суспензии митохондрий группы крыс, не получавших композит растительных экстрактов. Это количество превышает количество МДА почти в 3 раза по сравнению с группой животных, получавших композит растительных экстрактов.

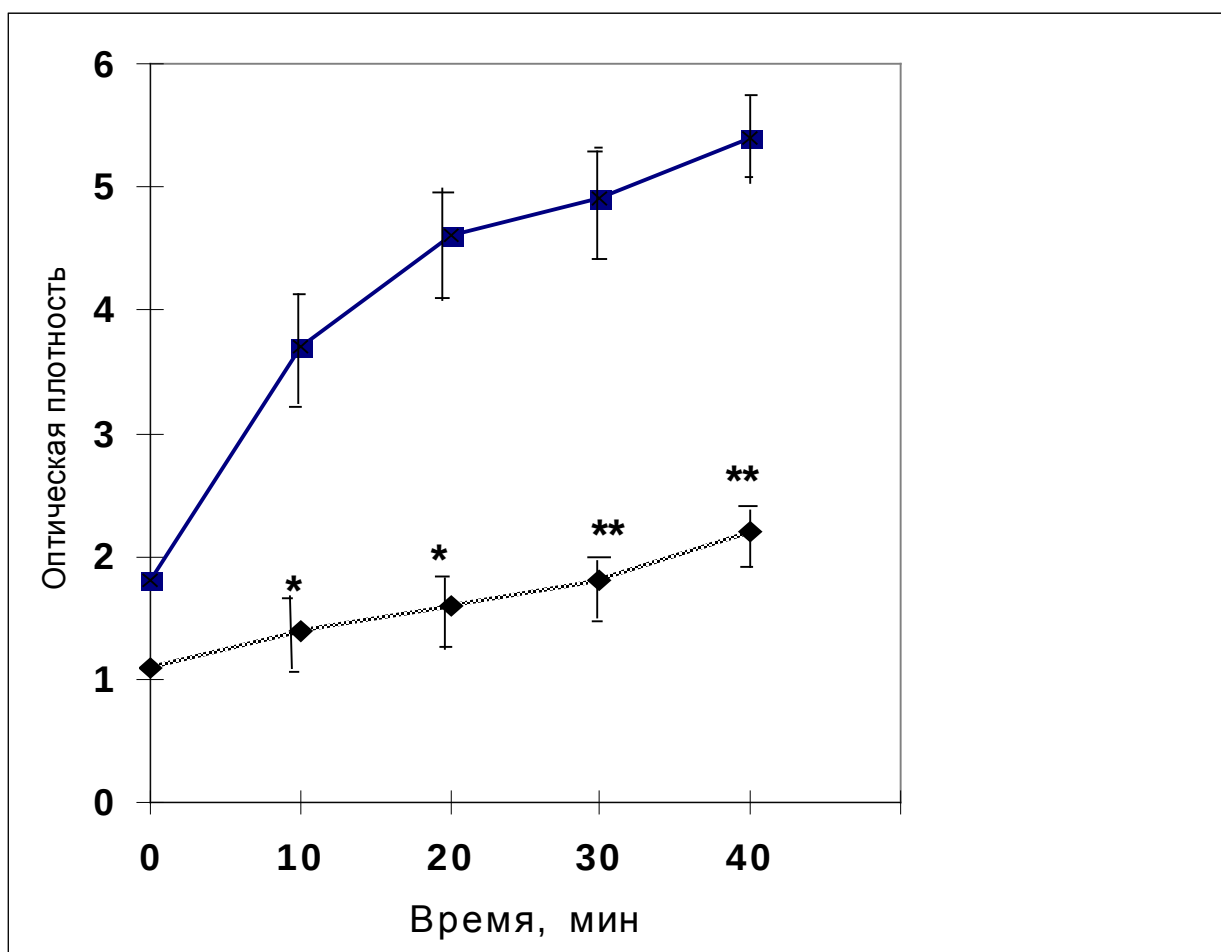


Рис. 12. Динамика изменения МДА в митохондриях печени крыс экспериментальных групп

■ – ТЗ; ◆ – ТЗ + композит растительных экстрактов

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Это говорит о том, что композит растительных экстрактов, получаемый животными в составе диеты, вызывает снижение интенсивности ПОЛ у животных, подвергнутых действию ТЗ.

Таким образом, в эксперименте *in vivo*, техногенные загрязнители, поступающие с пищей в течение 40 дней оказываются способными влиять на функциональное состояние мембран. На это указывают результаты по набуханию митохондрий печени и данные по регистрации уровня липоперекисного окисления в мембранах этих структур. Полученные в этом разделе результаты позволяют предполагать, что нарушение функционального состояния клеточных мембран под действием ТЗ является одним из механизмов индуцируемых ТЗ нарушений в функционировании

систем организации поведения. Также они подтверждают сформулированное в предыдущих разделах предположение о том что корректирующее действие растительных экстрактов на индуцированные ТЗ нарушения связаны со стабилизацией окислительно-восстановительного гомеостаза клеток.

4. Функциональное состояние инфузории *Spirostomum ambiguum*. Нарушения, возникшие под действием ТЗ воды и воздуха

В предыдущих разделах работы исследована и подтверждена возможность применения образцов метеоосадков и листвы для оценки интегральной биотоксичности ксенобиотического профиля среды районов с повышенной техногенной нагрузкой. Результаты экспериментов позволяют связывать механизм поражающего действия комплекса техногенных загрязнителей с механизмом, включающим нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза на уровне плазматических мембран и внутриклеточных мембранных систем. Исследование действия примененного нами интегрального фактора загрязнения среды на одноклеточный организм как тест-систему имеет большое прикладное и научное значение. В настоящем разделе исследована возможность применения инфузории *Spirostomum ambiguum*, организма, который применяется в качестве тест-объекта в исследованиях уровня загрязнения вод, для оценки интегральной биотоксичности комплекса техногенных загрязнений атмосферного воздуха. Исследована возможность применения в качестве тест-критерия как ранее используемого показателя функционального состояния простейшего организма – двигательной активности, так и впервые примененного в подобных исследования показателя – осмотической устойчивости клетки при изменениях тоничности среды. В качестве тест-реакций был исследован ряд вариантов этого показателя.

Выполнены исследования с применением инфузории *Spirostomum ambiguum* в качестве тест-системы для оценки биологического качества среды. Исследована чувствительность к

действию предлагаемого нами интегрального фактора техногенного загрязнения среды общеизвестного показателя функционального состояния инфузории *Spirostomum ambiguum* – двигательной активности. Показано, что экспозиция в пробах метеоосадков из района с высоким уровнем техногенного загрязнения снижает двигательную активность по сравнению со значением данного показателя в соответствующих пробах из района с «фоновым» уровнем загрязнения. (Рис. 13 А)

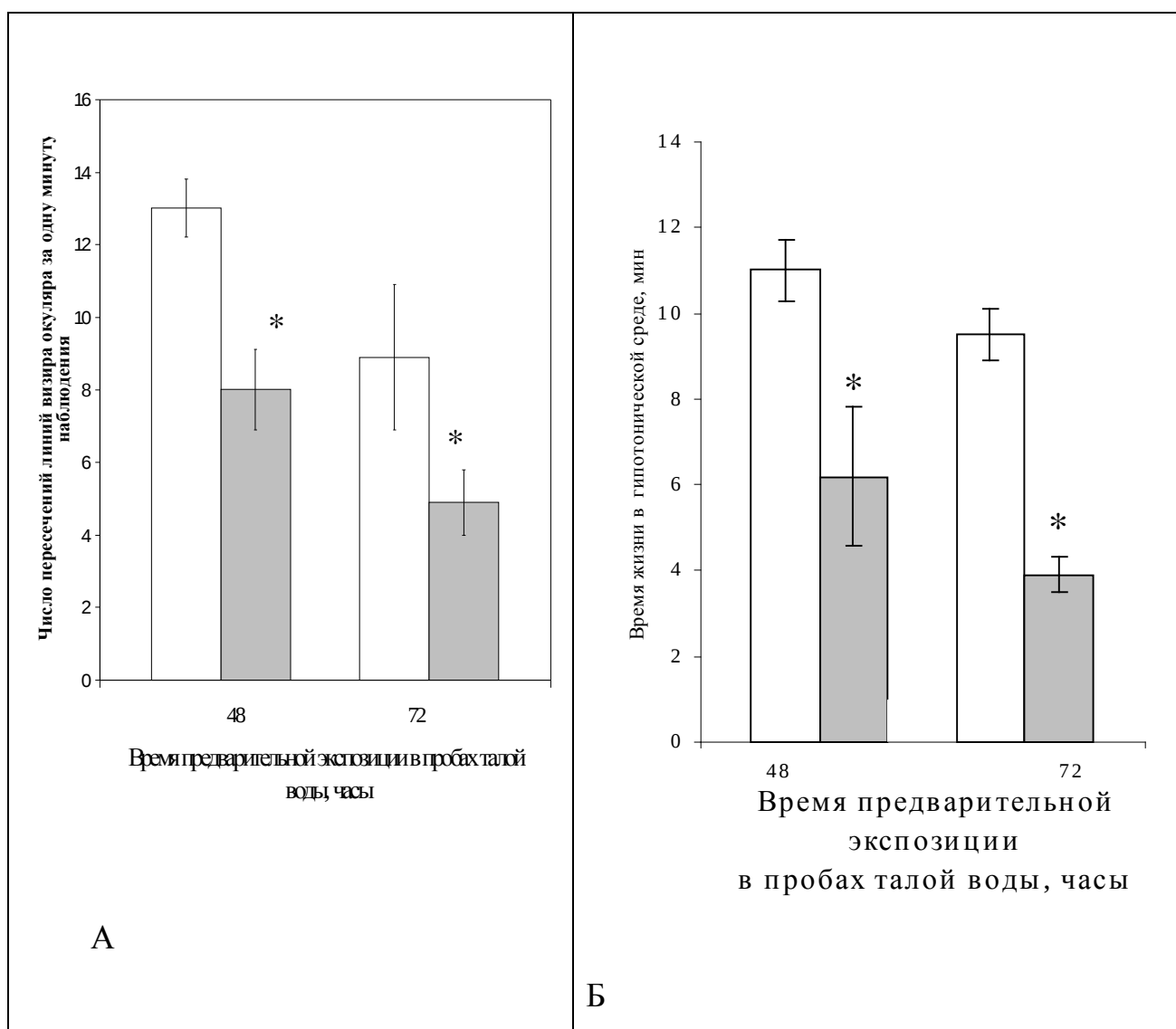


Рис. 13. Влияние экспозиции в талой воде из районов с различной техногенной нагрузкой на двигательную активность (А) инфузорий и время жизни (Б) в условиях осмотического стресса.

□- талая вода из района с низкой техногенной нагрузкой;

■- талая вода из района с высокой техногенной нагрузкой

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что осмотическая устойчивость клетки инфузории в гетеротонических растворах является более чувствительного индикатором. Это подтверждают эксперименты по исследованию депрессивного влияния на этот показатель экспозиции и в образцах метеоосадков (Рис. 13 Б) и в водных экстрактах сухих осадений (Рис. 14) из районов с высоким уровнем техногенного загрязнения.

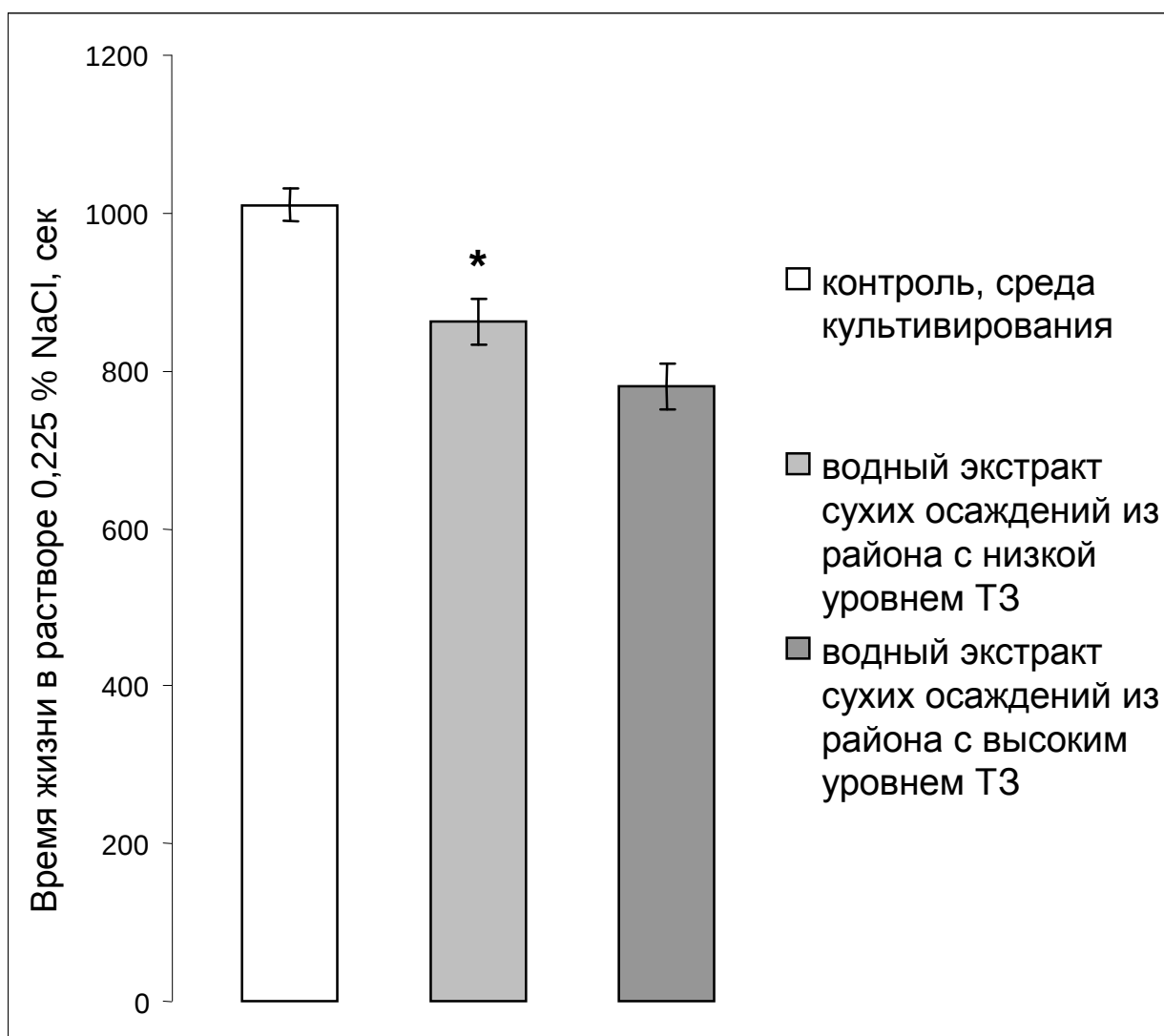


Рис. 14. Влияние экспозиции в водных экстрактах сухих осадений из районов с различной техногенной нагрузкой на осмотическую устойчивость инфузорий.

* – $p < 0,05$, по сравнению с высоким уровнем ТЗ

Таким образом, можно заключить, что простейшие организмы могут быть использованы в качестве тест-систем для интегральной оценки токсичности ксенобиотического профиля среды, что подтверждается однонаправленностью сдвигов в показателях их функционального состояния с соответствующими изменениями в более сложных тест-системах в условиях действия естественного комплекса техногенных загрязнений.

Заключение

Нами исследовано повреждающее действие техногенных загрязнений при их комплексном воздействии на системы различного уровня биологической организации, функции которых с той или иной степенью опосредованности определяются состоянием мембранных структур. Исследования проводились на разных объектах, включающих млекопитающих (крысы), простейших (инфузория *Spirostomum ambiguum*), субклеточные структуры (митохондрии).

В качестве носителей техногенных загрязнителей использованы листья липы сердцевидной – *Tilia cordata* Mill и талая вода снежного покрова. Все сборы проведены в нескольких районах г. Владикавказа с различной степенью техногенной нагрузки, а проще говоря, отличающихся по степени загрязненности промышленными выбросами. Известная плодотворность и удобство такого подхода очевидны: животные в качестве индуктора нарушений получают не комплекс токсических элементов, сгруппированных для эксперимента искусственно, а источник реального загрязнения, отражающего масштабы последнего, по сути – фактор техногенного загрязнения, представляющий некое интегрированное начало всей массы разнообразных загрязнений (Марзоев, 1998). Природные объекты в районах техногенных загрязнений

становятся своеобразным депо различных загрязнителей, действующих на живые системы, что создает состояние антропоэкологического напряжения подопытных объектов. Необходимо подчеркнуть, что в реальной жизни на живые объекты действуют не отдельные токсические вещества, а их комплексы, с присущими им синергичными и антагонистичными свойствами и особенностями взаимодействия. Этот принцип справедлив и для тяжелых металлов – основных токсических компонентов ТЗ. При высоких концентрациях большинство металлов становятся токсичными, что приводит к функциональным нарушениям в организме (Мартин, 1993). Поступление токсичных веществ в организм происходит различными путями – с вдыхаемым воздухом и при кожном контакте, но во всех случаях основные пути поступления связаны с пищей или водой. В связи с этим листья древесных растений и талые воды снежного покрова, использованные в качестве источников техногенных загрязнений, следует признать адекватными носителями, отражающими действительный уровень антропогенного поражения окружающей среды.

Вместе с тем, между этими двумя источниками техногенных загрязнителей имеются и определенные различия. Известно, что снег, пролежавший не более двух-трех суток, способен в значительной степени аккумулировать такие тяжелые металлы как свинец и кадмий (Будников, 1998). В то время как листья, помимо аэросоставляющих ТЗ, могут содержать и метаболиты этих загрязнений (Долобовская, 1975; Москаленко, 1989). К тому же, срок экспозиции листьев в силу естественных причин пролонгированнее, чем у снега.

В наших исследованиях установлено, что хроническое воздействие техногенных загрязнителей, содержащихся как в листьях липы, так и в талой воде снежного покрова, приводит к нарушениям поведенческих реакций животных. Нарушения проявляются по ряду показателей начиная с менее выраженных признаков снижения двигательной, ориентировочно-исследовательской активности и повышения эмоционального

напряжения, и заканчивая увеличением уровня тревожности и чувства страха у животных. Еще более выражены нарушения в задачах связанных с формированием приобретенного поведения в ряду от уменьшения латентного времени совершения подавляемой реакции в задаче пассивного избегания до уменьшения индекса предпочтения нового предмета в когнитивной модели – узнавание знакомого предмета.

Наблюдаемые нами нарушения на физиологических, цито- и субцитологических уровнях могут быть следствием двух относительно самостоятельных механизмов. Это и прямое воздействие комплекса техногенных загрязнителей *in vivo* на структуру клетки (клеток) и опосредованное метаболическими перестройками в организме, индуцированными этим комплексом. Прямое действие ТЗ на клетку подтверждается результатами наших опытов, выполненных на простейших одноклеточных организмах – инфузориях.

Инфузория *Spirostomum ambiguum* оказалась чрезвычайно чувствительным тест-объектом. Поведение инфузории оцениваемое по показателю двигательной активности и осмотическая устойчивость, оцениваемая по времени жизни в гетероосмотических раствора описаны в качестве чувствительных тест-функций пригодных для оценки экологического качества среды.

В условиях воздействия техногенных загрязнителей первым органом-мишенью является печень, в которой происходит обезвреживание попадающих в организм ксенобиотиков. Это обстоятельство послужило основанием для выбора митохондрий печени белых крыс в качестве модели для исследования влияния техногенных загрязнителей на внутриклеточные органеллы и процессы перекисного окисления липидов.

В результате наших исследований выявлено, что техногенные загрязнения при действии *in vivo* индуцируют нарушение структуры и функций мембран митохондрий печени, связанные с нарушением барьерных свойств мембран этих органелл – возрастание скорости их набухания в

изотонических средах, и активацию процессов перекисного окисления липидов.

Анализ результатов влияния ТЗ на обучение и память в экспериментальных моделях показал, что исследованные нами растительные экстракты и композит растительных экстрактов оказывают благоприятное влияние при нарушениях процесса обучения, повышают двигательную и исследовательскую активность, стабилизируют эмоциональное напряжение и понижают уровень тревожности у белых крыс. Можно предполагать, что в основе выявленного нами, с применением экспериментальных моделей поведения животных, влияния исследованных экстрактов на высшие функции мозга лежит улучшение под действием биологически активных веществ, входящих в их состав, адаптационных возможностей организма, повышении резистентности к неблагоприятному воздействию ТЗ. Таким образом, результаты исследований влияния композита растительных экстрактов на субклеточные структуры позволяют сделать заключение о том, что одним из компонентов механизма адаптогенного действия, регистрируемого на уровне поведенческих реакций крыс, может быть и антиоксидантная активность растительных экстрактов. Очевидно, именно это свойство приводит к уменьшению поражения мембран под действием техногенных загрязнений и стабилизации их функций, которые важны для функционирования центральной нервной системы в целом.

Исследование в качестве тест реакций поведения различных по уровню сложности организмов позволяет заключить, что чем выше уровень организмов применяемых в качестве тест систем в экологическом мониторинге тем разнообразнее поведенческие реакции изменением характеристик которых они способны отвечать на ухудшение экологического качества среды и тем выше информативность данных полученных с их применением.

ВЫВОДЫ

1. Современные экологические исследования расширили круг биообъектов, на базе которых моделируются условия экотоксикологических воздействий и оценивается степень их поражающего действия на биосистемы. Такие системы могут применяться для изучения отклика на экотоксикологические воздействия различной природы в экологическом мониторинге.
2. Настоящая работа является приоритетным исследованием, посвященным описанию индуцированных экотоксикологическим воздействием однонаправленных сдвигов в состоянии систем различного уровня организации, от мембранных систем контролирующей поведение простейших организмов до систем организации сложного поведения высших млекопитающих. Результаты работы позволяют утверждать, что живые системы, независимо от уровня организации, отвечают на повреждающие экотоксикологические воздействия универсальным набором реакций на уровне метаболизма, органелл, клеток и, наконец, целого организма, включая разнообразие его поведенческих реакций.
3. Применение функциональной нагрузки на мембрану (осмотический стресс) повышает чувствительность простейших в качестве тест-объекта в исследованиях токсического действия техногенных загрязнений, что позволяет производить оценку биологического качества воды даже в условиях минимального содержания экополлютантов. Простейшие организмы и изолированные митохондрии печени пригодны в качестве тест-объекта при изучении влияния комплекса техногенных загрязнений на клеточном и субклеточном уровнях организации и разработке мер коррекции индуцированных нарушений.
4. Поведение животных в экспериментальных моделях эмоциональных состояний, обучения и памяти является эффективной тест-системой

для оценки экотоксикологической опасности ксенобиотического профиля среды, а также для оценки адаптогенных свойств продуктов природного происхождения в условиях экотоксикологических воздействий

5. Листья растений и метеоосадки могут применяться для интегральной экотоксикологической характеристики ксенобиотического профиля среды и построения континуума экотоксичности в исследованиях с применением в качестве тест-функции поведения животных. Введение с пищей техногенных загрязнителей, депонированных в листьях липы и снежном покрове, в организм животных вызывает увеличение показателей тревожности в “открытом поле” и приподнятом крестообразном лабиринте; нарушение способности к обучению, что проявляется в замедлении процесса выработки реакций активного избегания; ухудшении показателей памяти в задачах на пространственную память и когнитивных моделях памяти.
6. Механизм поражающего действия экотоксикологических факторов на функционирование систем, контролирующих поведение животных, включает нарушение функций мембранных структур. Результаты исследований последствий введения в организм с пищей техногенных загрязнителей, депонированных в листьях липы, на мембраны митохондрий, свидетельствует о том, что повреждающие эффекты связаны с активацией процессов перекисного окисления липидов, протекающих по свободнорадикальному механизму.
7. Результаты исследования влияния растительных экстрактов на процессы перекисного окисления липидов в митохондриях позволяют связать их адаптогенные свойства с их антиоксидантными свойствами.
8. Листья растений и метеоосадки могут применяться для интегральной экотоксикологической характеристики ксенобиотического профиля среды и построения континуума экотоксичности в исследованиях с применением в качестве тест-системы инфузории *Spirostomum*

ambiguum. Экспозиция *Spirostomum ambiguum* в водных извлечениях из листьев липы и талой воде приводит к нарушению функциональных свойств клеточной оболочки, что проявляется в снижении осмотической устойчивости и последующей гибели клеток.

9. Исследование общих закономерностей изменения поведенческих реакций объектов различного уровня сложности (от простейших до высших млекопитающих), позволяет осуществить контроль за экологическим качеством различных биотопов (вода, воздух, почва).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 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. – 1989. –С.34-35.
- Тушмалова Н.А. Кокаева Ф.Ф., Прагина Л.Л. Коррекция условно-рефлекторной памяти с помощью психотропных препаратов // Проблемы нейрокибернетики (Материалы всесоюзной конференции). - Ростов-на-Дону. - 1989. - С.33-34.
- Прагина Л.Л., Воронина Т.А. Кокаева Ф.Ф., Иноземцев А.Н. Влияние пирacetama и ницерголина на условно-рефлекторную память крыс в условиях экстремального воздействия // Фармакология и токсикология.- 1990.-N 3. –С. С. 8-9.
- Иноземцев А.Н., Кокаева Ф.Ф. Козловский И. , Сарычев Е.И., Демидов В.М. Влияние гептапептида группы тафтсина с ноотропным компонентом действия на формирование реакции избегания в норме и при ее нарушении в конфликтной ситуации // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 1990.- N 5. - С.445-446.
- Иноземцев А.Н. Кокаева Ф.Ф. Особенности функционального "сбоя" реакции избегания // Журнал высшей нервной деятельности. - 1990.- Т. 40, N 2. - С.386-388.
- Тушмалова Н.А. З Безлепкин В.Г Кокаева Ф.Ф. Газиев А.И. Влияние пирacetama на синтез ДНК в мозге // Доклады Академии наук СССР.- 1991. Т.320, N 3. – С.761-762.
- Pragina L., Inosemtzev A. , Tushmalova N., Кокаева Ф., Lebedeva N., Change of blood glucose level under the influence of "Failure" of anavoidance reaction // Neuroscience & Behavioral Physiology 1991.- V.21, N 1-6. - С.520-522.

Кокаева Ф.Ф., Дзгоева Т.А., Зейналова Л. Влияние пирасетама на вызванное облучением нарушение рефлекса избегания. - Успехи физиологических наук. - 1994.- N 3. - С.45-46.

Кокаева Ф.Ф., Марзоев А.И., Самбегова Ф. Оценка интегральной биотоксичности почвы методом биотестирования на простейших. Деп. в ВИНТИ 04.08.94 N 2043-B94 – 7 С.

Кокаева Ф.Ф., Марзоев А.И., Интегральная биотоксичность поверхностных слоев почвы некоторых зон города Владикавказа // Государственный доклад "О состоянии окружающей природной среды и деятельности Госкомприроды Республики Северная Осетия в 1993 г." Владикавказ: РИА, 1994. – С. 122-123.

Кокаева Ф.Ф. Введение в биотехнологию. - Владикавказ: Изд-во СОГУ, 1996.- 52С.

Кокаева Ф.Ф., Марзоев А.И., Самбегова Ф., Кораева Б.Х. О комплексном подходе в экологическом образовании // Средства массовой информации в экологическом образовании: Тезисы докладов международной конференции. Владикавказ: Изд-во СОГУ. - 1996. – С.44.

Кокаева Ф.Ф., Кокаева И.Ю. Влияние техногенных загрязнений на заболеваемость студентов г. Владикавказа // Тезисы научной конференции студентов и молодых ученых вузов Юга России. Краснодар. - 1997.- С.186

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.

Кокаева Ф.Ф., Кокаева И.Ю., Марзоев А.И. Биотестирование как метод экологического мониторинга // Устойчивое развитие горных территорий: Тезисы докладов участников III Международной конференции 21-26 сентября 1998. - Владикавказ: Иростон.- 1998 - С.149.

Кокаева И.Ю., *Кокаева Ф.Ф.*, Марзоев А.И. Загрязнение окружающей среды сопровождается нарушением высших функций мозга // Устойчивое развитие горных территорий: Тезисы докладов участников III Международной конференции 21-26 сентября 1998г. - Владикавказ: Иростон.- 1998 - С. 515.

Кокаева И.Ю., Марзоев А.И., *Кокаева Ф.Ф.* Влияние техногенного загрязнения на умственную и физическую работоспособность детей младшего школьного возраста // Тезисы докладов Российской конференции "Атмосфера и здоровье". Санкт-Петербург.-1998.- С.125.

Кокаева И.Ю., *Кокаева Ф.Ф.* Оценка интегральной биотоксичности метеоосадков с применением экспериментальных моделей поведения животных //Вестник Северо-Осетинского отделения Русского географического общества. - 1998. - N 5. - С.54-59.

Кокаева Ф.Ф., Кокаева И.Ю., Марзоев А.И. Экологически чистая пища улучшает обучение крыс // Известия Северо-Кавказского научного центра высшей школы. Серия естественные науки. – 1998. №4. С.92-95.

Кокаева Ф.Ф., Кокаева И.Ю., Алипа Л.В., Бязырова А.А., Марзоев А.И. Различие показателей мышечной силы у детей, проживающих в районах с разным уровнем техногенной нагрузки. Труды Северо-Кавказского Технологического университета. Владикавказ. - 1999. – С.122.

Кокаева Ф.Ф., Феоктистова Е.М. Влияние тимогена на поведение крыс в экспериментальных моделях тревожных состояний // Тезисы докладов конференции по итогам научно-исследовательской работы биологического факультета. Северо-Осетинский государственный университет. Владикавказ: Изд-во СОГУ. 1999. С. 47-48.

Kokaeva F.F., Denmuchametova S.V., Ivanov V.A. The LINE reverse transcriptase is involved in the learning of rats// Procidings of the 2000 Meeting of International Research Scholars of Howard Hughes Medical Institute. Chevy Chase, Maryland, USA, June 21-23, 2000. – Maryland. - 2000. - С.55.

Кокаева Ф.Ф., Марзоев А.И. Разработка новых технологий оценки экологической ситуации в республике Северная Осетия-Алания с применением тест-систем различного уровня биологической организации (Экология и био-тест-системы). Отчет по НИР. – Научно-исследовательский институт медико-биологических проблем Владикавказского научного центра РАН. - Владикавказ. - 2000. - 27 С.

Кокаева Ф.Ф., Кокаева И.Ю., Марзоев А.И. О роли липидного компонента пищи в реализации нейротоксического действия комплекса техногенных загрязнений // Сборник научных трудов. Вып. 5. - Изд-во СКО Академии технологических наук РФ. – 2000. –С.67-71.

Кокаева Ф.Ф., Кокаева И.Ю., Марзоев А.И. Влияние техногенного загрязнения атмосферного воздуха на развитие нервно-мышечного аппарата детей дошкольного возраста // Тезисы докладов конгресса “Биометеорология - 2000”. - Санкт-Петербург. – 2000.-С.120-121.

Кокаева И.Ю., Кокаева Ф.Ф., Марзоев А.И. Интегральные методы оценки нейротоксичности естественного комплекса техногенных загрязнений // Тезисы докладов конгресса “Биометеорология - 2000”. – Санкт-Петербург.–2000.-С.140.

Кокаева И.Ю., Кокаева Ф.Ф., Марзоев А.И. Использование инфузории *Spiristoma Ambiguum* в качестве тест-объекта при изучении степени техногенного загрязнения воды // Владикавказский Медико-биологический вестник. 2001.- Вып.1. –С. 37-42.

Джабанашвили Е.В., Кокаева Ф.Ф. Оценка качества питьевой воды методом биотестирования на простейших // Материалы II Межрегиональной конференции “Студенческая наука экономике России”. Ставрополь: СевКавРГТУ. 2001. – С.116.

Кокаева Ф.Ф., Кокаева И.Ю., Марзоев А.И. Использование инфузории *Spiristoma Ambiguum* в качестве тест-объекта при изучении степени техногенного загрязнения водоемов // Устойчивое развитие горных

территорий: тезисы докладов IV Международной конференции. – Владикавказ: Ремарко, 2001. – Т.1.- С.331.

Кокаева Ф.Ф., Кокаева И.Ю., Марзоев А.И. О возможности оценки экологического качества водопроводной воды методом биотестирования на простейших // Устойчивое развитие горных территорий: тезисы докладов IV Международной конференции. – Владикавказ: Ремарко, 2001. – Т.1.- С.332.

Кокаева И.Ю., Кокаева Ф.Ф., Марзоев А.И. Пути коррекции неблагоприятного воздействия техногенных загрязнителей на организм // Устойчивое развитие горных территорий: тезисы докладов IV Международной конференции. – Владикавказ: Ремарко, 2001. – Т.1.- С.519.

Кокаева Ф.Ф., Деньмухаметова С.В., Канапин А.А., Годухин О.В., Ильин Ю.Е. Антисен олигодезоксинуклеотиды к фрагменту гена обратной транскриптазы LINE-1 элемента крысы нарушает формирование долговременной памяти // Доклады Российской академии наук. – 2002. – Т. 383.- С.93-95.

Гаев В.В., Кокаева Ф.Ф., Марзоев А.И. Изучение возможной коррекции уровня тревожности у животных нарушенного техногенным загрязнением среды // Актуальные проблемы экологии. Сборник научных трудов. - Владикавказ. - 2004. – Т.3.- №3. – С.411-412.

Кокаева Ф.Ф. Поведенческий мониторинг: Концепция и методы. – Витас-К, М. - 2005.- 72 С.

Гаев В.В., Кокаева Ф.Ф., Марзоев А.И. Изучение возможной коррекции действия техногенных загрязнений на память крыс в задаче на распознавание объектов // Вестник Владикавказского научного центра. - Владикавказ. -2005.- Т.5. - №2. - С.59-61.

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.