

Амромина А.М., Шаихова Д.Р., Берёза И.А., Тажигулова А.В., Минигалиева И.А.,
Соловьева С.Н., Бутакова И.В., Гурвич В.Б., Сутункова М.П.

Влияние наночастиц свинца на экспрессию генов глутаматного рецептора NMDA и поведенческие реакции у крыс породы Wistar

ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промышленных предприятий» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 620014, Екатеринбург, Россия

Введение. Промышленное загрязнение воздуха рабочей зоны и окружающей среды наночастицами оксида свинца (НЧ PbO) представляет реальную угрозу возникновения и развития нейродегенеративных заболеваний у рабочих свинцовых и медеплавильных производств, а также у населения, проживающего вблизи этих предприятий. Различные исследования указывают на участие экспрессии рецептора N-метил-D-аспартата (NMDA) в механизмах токсичности свинца.

Материалы и методы. В течение двух месяцев аутобредные самки крыс подвергались воздействию наночастиц свинца (НЧ PbO) с концентрацией 0,2 мг/м³ в ингаляционной установке типа «только нос». Поведенческие реакции крыс оценивали в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Количественную экспрессию генов рецептора NMDA (GRIN1, GRIN2A, GRIN2B) в гиппокампе крыс оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Статистический анализ данных проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Результаты. Нейротоксический эффект НЧ PbO проявлялся в подавлении экспрессии гена GRIN2A в гиппокампе крыс опытной группы. Экспрессия гена GRIN1 у крыс также показала тенденцию к снижению под влиянием НЧ PbO, а экспрессия гена GRIN2B не изменялась. Результаты теста «открытое поле» не выявили различий между опытной и контрольной группами крыс. Анализ поведенческих реакций в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» выявил достоверное снижение у крыс из опытной группы количества выглядываний из тёмных рукавов лабиринта.

Ограничения исследования. Данная работа была выполнена на самках крыс породы Wistar и не учитывает возможных межполовых различий.

Заключение. Результаты эксперимента продемонстрировали нейротоксическое действие НЧ PbO, которое выражалось в подавлении уровня экспрессии гена GRIN2A рецептора NMDA и в снижении количества выглядываний в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».

Ключевые слова: наночастицы; свинец; экспрессия генов; рецептор NMDA; нейротоксичность; тест «приподнятый крестообразный лабиринт»; тест «открытое поле»; поведение

Соблюдение этических стандартов. Заключение локального этического комитета ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора: содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и «International guiding principles for biomedical research involving animals», разработанными the Council for International Organizations of Medical Sciences and the International Council for Laboratory Animal Science (2012). Исследования были одобрены локальным этическим комитетом ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора (протокол № 4 от 12.07.2022 г.).

Для цитирования: Амромина А.М., Шаихова Д.Р., Берёза И.А., Тажигулова А.В., Минигалиева И.А., Соловьева С.Н., Бутакова И.В., Гурвич В.Б., Сутункова М.П. Влияние наночастиц свинца на экспрессию генов глутаматного рецептора NMDA и поведенческие реакции у крыс породы Wistar. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(12): 1581-1587. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-12-1581-1587> <https://elibrary.ru/rcwafq>

Для корреспонденции: Амромина Анна Михайловна, мл. науч. сотр. отд. молекулярной биологии и электронной микроскопии ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург. E-mail: amrominaam@umrc.ru

Участие авторов: Амромина А.М. — сбор материала и обработка данных, статистическая обработка, написание текста, редактирование; Шаихова Д.Р. — сбор материала и обработка данных, написание текста, редактирование; Берёза И.А. — сбор материала и обработка данных, написание текста, редактирование; Тажигулова А.В. — сбор материала, редактирование; Минигалиева И.А. — концепция и дизайн исследования, редактирование; Соловьева С.Н. — сбор материала, редактирование; Бутакова И.В. — обработка данных, редактирование; Гурвич В.Б. — концепция и дизайн исследования; Сутункова М.П. — концепция и дизайн исследования. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 11.10.2022 / Принята к печати: 08.12.2022 / Опубликовано: 12.01.2023

Anna M. Amromina, Daria R. Shaikhova, Ivan A. Bereza, Anastasiya V. Tazhigulova,
Ilzira A. Minigalieva, Svetlana N. Solovyeva, Inna V. Butakova, Vladimir B. Gurvich,
Marina P. Sutunkova

Some neurotoxic effects of lead nanoparticles on NMDA glutamate receptor gene expression and behavioral responses in Wistar rats

Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation

Introduction. Industrial pollution of the workplace air and the environment with lead oxide nanoparticles (PbO NPs) poses the risk of neurodegenerative diseases in workers of lead and copper smelters and the population living around these enterprises. Various studies showed the involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor expression in the mechanisms of lead toxicity.

Materials and methods. During two months, outbred female rats were exposed to lead nanoparticles (PbO NPs) at a concentration of 0.2 mg/m³ in a “nose-only” inhalation exposure system. The behavioral responses of the rats were assessed using the open field and the elevated plus maze tests. Quantitative expression of the NMDA receptor genes (GRIN1, GRIN2A, GRIN2B) in the rat hippocampus was assessed using a real-time PCR. Statistical data analysis was carried out using the Mann–Whitney U test.

Results. The neurotoxic effect of PbO NPs manifested itself in the suppression of *GRIN2A* gene expression in the hippocampus of experimental rats. The expression of the *GRIN1* gene also showed a tendency to decrease in rats under effect of PbO NPs, while the expression of the *GRIN2B* gene did not change. The results of the open field test did not reveal any differences between the experimental and control groups of rats. The elevated plus maze test revealed a significant decrease in the number of entries into the open arms of the maze in rats from the experimental group.

Limitations. This work was performed on female Wistar rats and does not take into account possible inter-gender differences.

Conclusion. The results of the experiment demonstrated the neurotoxic effect of PbO NPs including the reduced expression level of the *GRIN2A* gene of the NMDA receptor and a decrease in the proportion of time spent in the open arms in the elevated plus maze test.

Keywords: nanoparticles; lead; gene expression; NMDA receptor; neurotoxicity; elevated plus maze; open field; behavior

Compliance with ethical standards. Conclusion of the local ethics committee of the Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers: the maintenance, nutrition, care of animals and their removal from the experiment was carried out in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki and “International guiding principles for biomedical research involving animals”, developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences and the International Council for Laboratory Animal Science (2012). The studies were approved by the Local Ethics Committee of the Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers (protocol No. 4 dated July 12, 2022).

For citation: Amromina A.M., Shaikhova D.R., Bereza I.A., Tazhigulova A.V., Minigalieva I.A., Solovyeva S.N., Butakova I.V., Gurvich V.B., Sutunkova M.P. Some neurotoxic effects of lead nanoparticles on NMDA glutamate receptor gene expression and behavioral responses in Wistar rats. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(12): 1581-1587. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-12-1581-1587> <https://elibrary.ru/rctwafq> (In Russian)

For correspondence: Anna M. Amromina, Junior Researcher, Department of Molecular Biology and Electron Microscopy, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation. E-mail: amrominaam@ymrc.ru

Information about authors:

Amromina A.M., <https://orcid.org/0000-0001-8794-7288>
Bereza I.A., <https://orcid.org/0000-0002-4109-9268>
Minigalieva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-1871-8593>
Butakova I.V., <https://orcid.org/0000-0002-9871-9712>
Sutunkova M.P., <https://orcid.org/0000-0002-1743-7642>

Shaikhova D.R., <https://orcid.org/0000-0002-7029-3406>
Tazhigulova A.V., <https://orcid.org/0000-0001-9384-8550>
Solovyeva S.N., <https://orcid.org/0000-0001-8580-403X>
Gurvich V.B., <https://orcid.org/0000-0002-6475-7753>

Contribution: Amromina A.M., Shaikhova D.R., Bereza I.A. — data collection and processing, statistical analysis, draft manuscript preparation and editing; Tazhigulova A.V., Solovyeva S.N. — data collection, manuscript editing; Minigalieva I.A. — research conception and design, manuscript editing; Butakova I.V. — data processing, manuscript editing; Gurvich V.B., Sutunkova M.P. — research conception and design. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received: October 10, 2022 / Accepted: December 8, 2022 / Published: January 12, 2023

Введение

Свинец является одним из сильнодействующих токсических веществ и поступает в атмосферу из различных бытовых и промышленных источников, среди которых значительное место занимают медеплавильные и свинцовоплавильные заводы. На производстве наночастицы свинца составляют значительную долю попадающих в нанодиапазон от всего объёма промышленного аэрозоля. Вредному воздействию свинцовых наночастиц подвергаются как рабочие этих производств, так и люди, проживающие на близлежащих территориях [1, 2]. Наночастицы оксида свинца (НЧ PbO), загрязняющие воздух, представляют реальную угрозу возникновения и развития ряда заболеваний, так как свинец поражает практически все основные системы органов. По имеющимся данным, одной из наиболее чувствительных мишеней свинцовой токсичности является нервная система [3]. Известно, что гиппокамп — часть лимбической системы головного мозга, отвечающая за обучение и память. Исследования показали, что у животных, подвергшихся воздействию свинца, наблюдались структурные повреждения гиппокампа, такие как неправильные ядра, повреждённые нейроны и денатурация миелина [1, 4]. Различные исследования указывают на участие экспрессии и функции рецептора N-метил-D-аспартата (NMDA) в механизмах токсичности свинца, преимущественно в гиппокампе [5, 6]. NMDA представляют собой ионотропные рецепторы, которые активируются глутаматом и участвуют в различных процессах, включая развитие и пластичность нейронов, обучение и память, а также долговременную потенциацию. Отличительной чертой рецепторов NMDA-класса является регуляция проводимости ионных каналов для Ca^{2+} . Свинец способен блокировать NMDA-рецепторы и ингибировать приток Ca^{2+} , что приводит к развитию неврологических и нейродегенеративных расстройств [6]. Рецепторы NMDA состоят из четырёх субъединиц, и известно, что в гиппокампе взрослых особей преобладающими субъединицами рецептора являются GluN2A и GluN2B, которые кодируются генами *GRIN2A*

и *GRIN2B*, а также обязательная субъединица GluN1, кодируемая геном *GRIN1*. Поскольку подавляющее большинство нейронов обладают глутаматергической активностью, а рецепторы глутамата играют ключевую роль в функционировании центральной нервной системы, любая дисфункция рецепторов NMDA из-за изменённой экспрессии, локализации или активности может способствовать неврологическим нарушениям [7–9]. Поэтому важно было определить влияние НЧ PbO при ингаляционном воздействии, являющемся основным способом попадания НЧ в условиях промышленных производств, на экспрессию генов рецептора NMDA, который участвует в физиологических и патологических процессах в нервной системе. Одновременно было необходимо выявить клинические проявления нейротоксичности НЧ PbO на крысах с помощью тестов «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», которые хорошо зарекомендовали себя при анализе поведенческих и неврологических нарушений у крыс [10].

Цель работы — исследование нейротоксических эффектов наночастиц оксида свинца на экспрессию генов глутаматного рецептора NMDA (*GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*) и поведенческие реакции у крыс.

Материалы и методы

Эксперимент на животных. Задачей эксперимента было изучение нейротоксического эффекта НЧ PbO на грызунах без различий по гендерному признаку. В эксперименте использовали самок крыс, поскольку самки большинства животных более чувствительны к вводимым веществам. Белых половозрелых самок крыс породы Wistar с начальной массой тела $160 \pm 10\%$ г случайным образом разделили на 2 группы, по 14 крыс в каждой: опытная («НЧ PbO») и контрольная группы. Крысы содержались в соответствии с общепринятым законодательством в стандартных условиях: температура плюс 22 ± 2 °C, цикл «свет — темнота» 12/12 ч, специально оборудованное помещение вивария. Условия содержания соответствовали ГОСТ 33215–2014 «Руководство

Таблица 1 / Table 1

Последовательность праймеров [12]

Sequence of primers [12]

Ген Gene	Направление Direction	Последовательность / Sequence 5' → 3'
GRIN1	Forward	GTTCTCCGCTCAGGCTTTG
	Reverse	AGGGAAACGTTCTGCTTCCA
GRIN2A	Forward	GCTACACACCCTGCACCAATT
	Reverse	CACCTGGTAACCTTCCTCAGTGA
GRIN2B	Forward	CCCAACATGCTCTCTCCCTTAA
	Reverse	CAGCTAGTCGGCTCTCTTGGTT
GAPDH	Forward	TGCACCACCAACTGCTTAG
	Reverse	GGATGCAGGGATGATGTTT

по содержанию и уходу за лабораторными животными» и «International guiding principles for biomedical research involving animals», разработанными CIOMS и ICLAS (2012).

Субхронические ингаляционные экспозиции проводились по 4 ч в день, 5 раз в неделю в ингаляционной системе типа «только нос» (CN Technologies, USA) с автоматической регулировкой всех параметров экспозиции. Аналогичную установку использовали для экспозиции контрольных крыс. При проведении ингаляционной экспозиции в камере типа «только нос» витающие металлооксидные НЧ генерировались с помощью электрического искрения между соответствующими исследуемыми металлическими стержнями 99,99%-й чистоты в атмосфере азота, разбавлялись увлажнённым воздухом и подавались его потоком в ингаляционную установку с пеналами для крыс. Контрольные животные подвергались воздействию той же смеси газов, что и группа опытных животных, но без добавления свинцовых НЧ.

Средняя концентрация НЧ PbO для животных опытной группы составляла 0,2 мг/м³, экспозиции проводили в течение 2 мес. Концентрация была выбрана исходя из данных предварительного ингаляционного эксперимента, по результатам которого эту концентрацию снизили до близкой к пороговому значению.

Поведенческое тестирование. Тесты для оценки поведения крыс проводили на базе Клиники экспериментальных животных ФБУН «Екатеринбургский медицинский – научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промышленных предприятий» Роспотребнадзора.

«Открытое поле». Оценку ориентировочно-исследовательского поведения и уровня тревожности крыс проводили в тесте «открытое поле» (ОП). Используется горизонтальная платформа, расчерченная на 16 равных квадратов (8 × 8) с отверстием посередине каждого квадрата. Крысу помещали в центр платформы и в течение 3 мин вели наблюдение. Во время теста фиксировали следующие параметры: число пересечённых квадратов, заглядываний в «норку», свешиваний и эпизодов груминга.

«Приподнятый крестообразный лабиринт». Тревожность и исследовательское поведение животных также оценивали в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), который состоял из двух светлых (открытых) и двух темных (закрытых) рукавов, расположенных перпендикулярно. Крыс помещали на пересечение светлого и тёмного рукавов, в центре лабиринта, мордочкой к светлому рукаву. При этом регистрировали следующие показатели: число посещений тёмного и светлого рукавов, время пребывания в каждом рукаве, свешивание головы с платформы, выглядывания из закрытого рукава, стойка на задних лапах, эпизоды груминга и число центровых пересечений. Исследование проводили в течение 5 мин.

Для анализа экспрессии генов случайным образом отбирали по 10 животных из каждой группы. По окончании эксперимента (воздействия НЧ PbO) крыс умерщвляли пу-

тём быстрой неполной декапитации. Мозг выделяли и извлекали гиппокамп, от которого отрезали небольшую часть, быстро помещали в жидкий азот, гомогенизировали и заливали 1 мл реагента ExtractRNA («Евроген», Россия), после чего хранили при температуре минус 80 °С для дальнейших исследований.

Экстракция тотальной РНК и синтез комплементарной ДНК. Тотальную РНК из ткани гиппокампа выделяли с использованием реагента ExtractRNA, согласно протоколу производителя. Концентрацию и чистоту выделенной РНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop-ONE (Thermo Fisher Scientific, США) по соотношению оптической плотности при 260 и 280 нм (A 260 / A 280).

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов MMLV-RH («Диаэм», Россия) в соответствии с инструкциями производителя в амплификаторе Bio-Rad T100 (Bio-Rad Laboratories, США).

Количественная ПЦР в реальном времени с использованием SYBR Green. Амплификацию исследуемых генов (*GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*) проводили в режиме реального времени с использованием амплификатора QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific, США). Смесь для ПЦР включала в себя БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue («Биолабмикс», Россия), прямой и обратный праймеры по 7,5 пмоль каждого, деионизированную воду и образец кДНК. Последовательности праймеров для определения уровня экспрессии выбранных генов приведены в табл. 1. Ген домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*GAPDH*) использовали в качестве гена сравнения.

Условия амплификации оптимизировали следующим образом: предварительная денатурация при плюс 95 °С в течение 5 мин; затем 40 циклов: денатурация при плюс 95 °С в течение 10 с, отжиг при плюс 60 °С в течение 15 с и элонгация при плюс 72 °С в течение 1 мин со снятием флуоресцентного сигнала. Специфичность продуктов ПЦР подтверждали, наблюдая один пик при анализе кривой плавления. Данные амплификации анализировали методом 2^{-ΔΔCt} с использованием *GAPDH* в качестве внутреннего контроля [11].

Статистический анализ. Нормальность распределения выборочных данных проверяли с применением критерия Колмогорова–Смирнова. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни для сравнения двух независимых групп в программе Statistica (StatSoft). Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В результате проведённых исследований было выявлено изменение уровней экспрессии генов *GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B* в гиппокампе крыс, подвергавшихся воздействию НЧ PbO.

Анализ экспрессии гена *GRIN1*, кодирующего субъединицу GluN1 в рецепторе NMDA, показал, что в гиппокампе мозга крыс произошло снижение экспрессии данного гена в опытной группе по сравнению с контролем: $FC_{\text{НЧ PbO}} = 0,74$; $FC_{\text{контроль}} = 1,04$ (рис. 1, а), которое тем не менее не было статистически достоверно ($p = 0,13$).

Экспрессия гена *GRIN2A*, кодирующего субъединицу GluN2A, также изменялась в опытной группе по сравнению с контрольной. Обнаружено, что в результате воздействия НЧ PbO уровень экспрессии гена *GRIN2A* был снижен в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой крыс: $FC_{\text{НЧ PbO}} = 0,34$ и $FC_{\text{контроль}} = 0,86$ (рис. 1, б). Изменение экспрессии гена в опытной группе по сравнению с контрольной было статистически достоверно ($p = 0,02$).

Уровень экспрессии гена *GRIN2B* (рис. 1, в) в гиппокампе крыс, как и в случае с экспрессией гена *GRIN1*, не показал значимых различий между опытной и контрольной группами ($p = 0,49$).

Поведенческие тесты. Результаты тестирования крыс в тесте «открытое поле» представлены в табл. 2. Они сви-

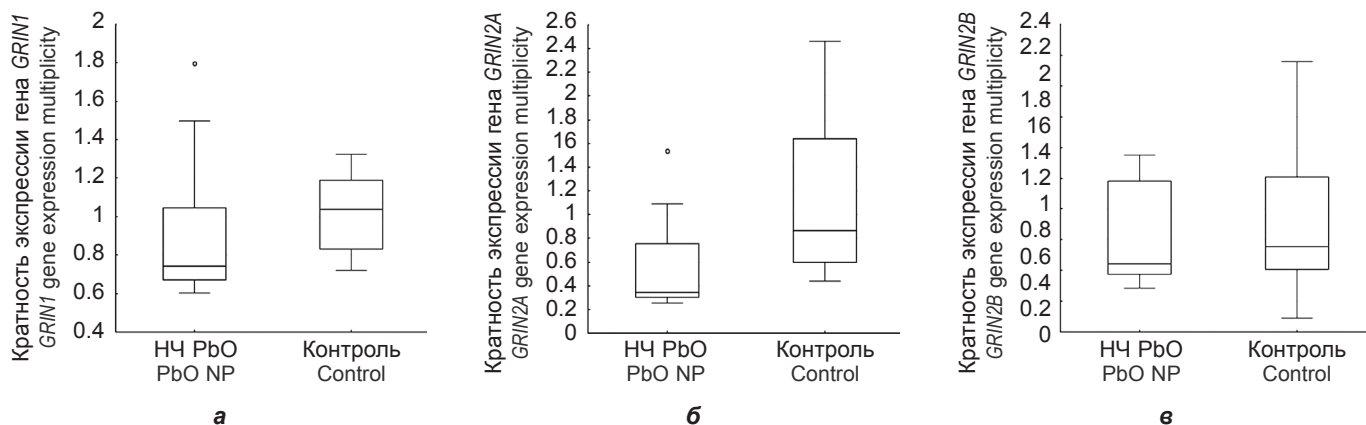


Рис. 1. Кратность изменения экспрессии генов *GRIN1* (а), *GRIN2A* (б) и *GRIN2B* (в) в гиппокампе крыс в контрольной группе ($n = 9$) и группе животных, подвергавшихся воздействию НЧ PbO ($n = 10$).

На графиках указаны медианы, 25–75% квантили, минимальные и максимальные значения, выбросы.

Fig. 1. Multiplicity of changes in *GRIN1* (a), *GRIN2A* (б) and *GRIN2B* (в) genes expression in the hippocampus of rats in the control group ($n = 9$) and that exposed to PbO NPs ($n = 10$).

The graphs show medians, 25–75% quartiles, minimum and maximum values, and outliers.

Таблица 2 / Table 2

Показатели поведенческих реакций крыс в тесте «открытое поле», $M \pm SE$

Characteristics of behavioral reactions of rats in the open field test, $M \pm SE$

Группы животных Groups of rats	Количество пересечённых квадратов Number of squares crossed	Количество заглядываний в «норку» Number of head dipping	Количество свешиваний Number of hangings down	Эпизоды груминга Grooming episodes
НЧ PbO PbO NP exposure group ($n = 14$)	14.36 ± 2.33	6.29 ± 1.14	2.86 ± 0.69	0.71 ± 0.30
Контроль Control ($n = 14$)	10.93 ± 1.28	6.79 ± 1.09	2.71 ± 0.56	0.71 ± 0.16

детельствуют, что достоверных различий в поведенческих реакциях крыс, получавших НЧ PbO в концентрации 0,2 мг/м³, и крыс контрольной группы выявлено не было. Наблюдалось лишь незначительное увеличение двигательной активности по числу пересечённых квадратов у крыс, подвергавшихся воздействию НЧ PbO ($14,36 \pm 2,33$), по сравнению с контрольной группой ($10,93 \pm 1,28$).

По результатам теста «приподнятый крестообразный лабиринт» были выявлены статистически достоверные различия в числе выглядываний из закрытых рукавов между крысами контрольной группы и крысами, получавшими НЧ PbO ($p = 0,008$) (рис. 2, а). Крысы опытной группы на 72% реже выглядывали из тёмных рукавов лабиринта по сравнению с крысами группы контроля. Также мы наблюдали тенденцию снижения количества свешиваний с края открытого рукава у крыс, получавших НЧ PbO, по сравнению с контрольной группой, однако эти результаты не были статистически достоверны ($p = 0,06$) (рис. 2, б). Результаты исследования других поведенческих реакций, анализируемых в ПКЛ, представлены в табл. 3. Количество посещений тёмного рукава и время, проведённое в тёмном рукаве, снижались в опытной группе крыс по сравнению с контрольной на 39 и 43% соответственно, однако эти различия не были статистически достоверными. Количество посещений светлого рукава, время, проведённое в светлом рукаве, количество центральных пересечений, стойки и груминг также не различались у крыс, получавших НЧ PbO, и крыс контрольной группы.

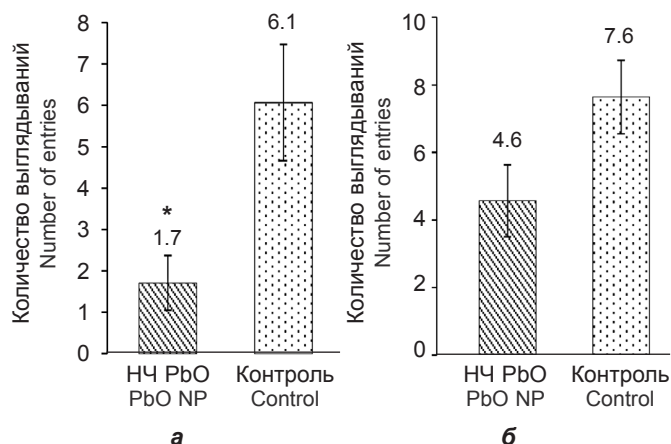


Рис. 2. Результаты показателей теста «приподнятый крестообразный лабиринт» в контрольной ($n = 14$) и опытной группах ($n = 14$) крыс ($M \pm SE$): а – количество выглядываний из закрытого рукава; б – количество свешиваний с края открытого рукава.

* – статистически значимое различие с группой «контроль», $p < 0,05$.

Fig. 2. Results of the elevated plus maze test for the control ($n = 14$) and experimental group ($n = 14$) of rats ($M \pm SE$): а – the number of entries into the open arms; б – the number of hangings down over the edge of open arms. * – statistically different from the control group, $p < 0.05$.

Таблица 3 / Table 3

Показатели поведенческих реакций крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», $M \pm SE$
Characteristics of behavioral reactions of rats in the elevated plus maze test, $M \pm SE$

Поведенческие реакции Behavioral reactions	НЧ PbO PbO NP exposure group $n = 14$	Контроль Control group $n = 14$
Количество посещений светлого рукава / Number of entries into the open arms	1.93 ± 0.46	1.79 ± 0.45
Количество посещений тёмного рукава / Number of entries into the closed arms	1.57 ± 0.34	2.57 ± 0.68
Время в светлом рукаве, с / Time spent in the open arm, s	123.36 ± 33.67	106.93 ± 32.45
Время в тёмном рукаве, с / Time spent in the closed arm, s	84.43 ± 32.4	148.79 ± 32.05
Количество центральных пересечений / Number of center crossings	2.86 ± 0.76	4.21 ± 0.91
Количество стоек / Number of rearings	4.14 ± 1.11	5.93 ± 1.16
Эпизоды груминга / Grooming episodes	1.5 ± 0.27	1.64 ± 0.36

Обсуждение

Рецептор NMDA необходим для функционирования мозга и играет важную роль в синаптической пластичности, обучении и памяти [13]. Рецепторы NMDA являются гетеротетрамерами, состоящими из четырёх субъединиц, которые кодируются семью различными генами: ген *GRIN1* кодирует GluN1, четыре гена *GRIN2* кодируют GluN2A-D и два гена *GRIN3* кодируют GluN3A-B [14]. Учитывая критическую роль рецепторов NMDA в различных нервных и поведенческих процессах, а также способность свинца блокировать рецепторы NMDA, изучение этих рецепторов необходимо для полного понимания механизмов воздействия НЧ свинца на головной мозг и поведение крыс.

В гиппокампе взрослых особей крыс преобладающими субъединицами рецептора глутамата NMDA являются GluN2A и GluN2B, и их экспрессия строго регулируется во время развития мозга [15]. В настоящей работе авторами показано достоверное снижение уровня экспрессии гена *GRIN2A*, который кодирует субъединицу GluN2A у крыс, подвергавшихся воздействию НЧ PbO. Данные согласуются и с результатами, полученными на клеточной модели, где воздействие свинца подавляло экспрессию гена *GRIN2A* [16]. Результаты исследований нейротоксичности на крысах, подвергавшихся воздействию ацетата свинца в различных концентрациях через питьевую воду, также согласуются с нашими данными о снижении экспрессии гена *GRIN2A* из-за воздействия НЧ PbO при вдыхании [17, 18]. Авторы показывают, что наночастицы обладают более выраженным токсическим действием по сравнению с частицами микрометрового размера благодаря своим уникальным физическим характеристикам. Так, в одной из работ было продемонстрировано, что частицы размером 10 нм являются более цитотоксичными по сравнению с частицами размером 1 мкм [19]. Возможно, НЧ PbO изменяют экспрессию *GRIN2A*, взаимодействуя с регуляторным сайтом цинка, который присутствует именно в субъединице GluN2A рецептора NMDA, но не в субъединицах GluN1 и GluN2B [20].

Экспрессия двух других генов *GRIN1* и *GRIN2B* не имела статистически значимых различий. Тем не менее экспрессия гена *GRIN1* продемонстрировала тенденцию к снижению в опытной группе по сравнению с контрольной. Ген *GRIN1* кодирует GluN1 – обязательную субъединицу во всех функциональных рецепторах NMDA. Экспрессия двух генов *GRIN1* и *GRIN2B*, возможно, является критической для построения рецептора NMDA и его нормального функционирования. Так, в работе Forrest и соавт. было показано, что мыши с нокаутом GluN1 и GluN2B погибают перинатально [21]. На трансгенных мышах со сверхэкспрессией субъединицы рецептора NMDA *GRIN2B* было продемонстрировано улучшение функций обучения и памяти [22], что также указывает на жизненно важную роль субъединицы *GRIN2B* в функ-

ционировании рецептора NMDA. Но следует учитывать, что не только гипофункциональные рецепторы негативно влияют на функционирование NMDA, но и гиперфункциональные рецепторы могут негативно сказываться на функциях рецептора и даже вызывать гибель клеток [23].

Наши результаты также согласуются с исследованием Тао Wang и соавт., которые подвергли крыс воздействию ацетата свинца перорально. Авторы показали, что свинец подавляет уровень экспрессии мРНК *GRIN2A* больше, чем генов *GRIN1* и *GRIN2B*, по сравнению с контрольными животными. Кроме того, в статье описано снижение концентрации белка GluN2A, что авторы связывают с уменьшением эффективности синаптической передачи рецептора NMDA. Поскольку для индукции долговременной потенциации необходима активация рецепторов, содержащих именно GluN2A, предполагается, что их подавление частично способствует нарушению долговременной потенциации [17]. Наши результаты выявили способность НЧ PbO изменять экспрессию генов, кодирующих субъединицы рецептора NMDA, и, возможно, таким образом воздействовать на состав ионотропных рецепторов глутамата и их функционирование.

Проявление клинических признаков нейротоксического воздействия НЧ PbO устанавливали с помощью двух поведенческих тестов: «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». При тестировании в условиях эксперимента важным аспектом является изучение исследовательского поведения этих животных. В нашем эксперименте исследовательское поведение крыс в тесте ОП, учитывающем такой показатель, как заглядывание в «норки», существенно не изменялось под воздействием НЧ PbO в концентрации 0,2 мг/м³. Крысы, получавшие НЧ PbO, демонстрировали увеличение двигательной активности на 24% по сравнению с контрольной группой, однако данный результат не был статистически достоверным. Наши результаты согласуются с данными, полученными в другом исследовании, где в тесте «открытое поле» не было обнаружено влияния ацетата свинца на двигательную активность, проявляющуюся во время исследования новой среды [24].

Существующие экспериментальные данные показывают, что исследовательская активность связана с усилением способности к обучению, в том числе и к обучению иностранным навыкам [25, 26]. Следовательно, можно сделать вывод о том, что в условиях нашего эксперимента НЧ PbO не снижали у крыс способности к обучению, несмотря на подавленную экспрессию гена *GRIN2A*, функцию субъединицы которого связывают с нарушением долговременной потенциации. Возможно, наши результаты объясняются относительно низкой концентрацией наночастиц и непродолжительностью времени вредного воздействия, которое необходимо для проявления клинических признаков когнитивных нарушений, связанных с обучением.

Считается, что исследовательское поведение животных находится в обратной зависимости от уровня страха и тревожности [27]. Но следует отметить, что эта зависимость, наблюдаемая во многих экспериментах, не является однозначной. По результатам теста «открытое поле» нам не удалось подтвердить увеличения эмоциональной реактивности и повышенной тревожности у крыс, подвергавшихся воздействию НЧ РbO. Число эпизодов груминга, которое трактуется исследователями как показатель тревожности крыс в новой обстановке, не изменялось в опытной группе по сравнению с контрольной. Однако по результатам теста ПКЛ было установлено снижение выглядываний из тёмного рукава лабиринта у крыс опытной группы по сравнению с контрольной. Кроме того, была выявлена тенденция к снижению количества свешиваний с края открытого рукава у крыс опытной группы. Реакции «выглядывания» и «свешивания» в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» связываются исследователями с когнитивным свойством нервной системы, а именно с оценкой риска перед принятием решения, и свидетельствуют о проявлении тревожного поведения [28, 29]. Тем не менее мы не обнаружили различий во времени, проведённом в тёмном и светлом рукавах лабиринта, между крысами опытной и контрольной групп. Считается, что крысы с высоким уровнем тревожности проводят больше времени в тёмном рукаве лабиринта, избегая светлых участков [30]. Результаты других исследований установили, что воздействием Рb увеличивало уровень тревожности у крыс [18, 24]. При этом в работе, посвященной воздействию свинца, у крыс с повышенным уровнем тревожности было отмечено увеличение экспрессии белка GluN2A в мозге, что косвенно противоречит нашим результатам о подавлении экспрессии гена, кодирующего этот белок [24]. Различия

могут быть связаны как с размерами частиц свинца, его концентрацией и способом введения, так и с разными линиями крыс, используемых в экспериментах, и ранее проведёнными поведенческими тестами. Кроме того, наше исследование проводилось только на самках крыс породы Wistar, и в данной работе не учитываются возможные межполовые различия в экспрессии генов рецептора NMDA и в поведенческих реакциях, что является ограничением исследования.

Таким образом, в результате проведённого эксперимента было установлено токсическое воздействие НЧ РbO на поведение крыс, однако оно проявилось в изменении только одного показателя в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», а именно в снижении количества выглядываний из тёмного рукава лабиринта у животных опытной группы.

Заключение

В результате проведённого исследования выявлено статистически достоверное снижение уровня экспрессии гена *GRIN2A* ионотропного рецептора глутамата NMDA в гиппокампе мозга крыс при воздействии наночастиц оксида свинца в концентрации 0,2 мг/м³. Это позволяет подтвердить предположение о нейротоксическом воздействии НЧ РbO через изменение экспрессии генов рецептора NMDA. Кроме того, авторами установлено снижение количества выглядываний в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, подвергавшихся воздействию НЧ РbO. Предположительно снижение экспрессии гена *GRIN2A* при ингаляционном воздействии НЧ РbO является одним из первых проявлений нейротоксического действия наночастиц свинца и может быть использовано как биомаркер нейротоксичности.

Литература

(п.п. 1–11, 13–18, 20–26, 30 см. References)

12. Трофимов А.Н., Ротов А.Ю., Вениаминова Е.А., Фомалонт К., Шварц А.П., Зубарева О.Е. Изменение поведения и экспрессии генов ионотропных рецепторов глутамата в мозге взрослых крыс после неонатальных введений бактериального липополисахарида. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2020; 106(3): 356–72. <https://doi.org/10.31857/S0869813920030097>
19. Качнельсон Б.А., Привалова Л.И., Дегтярева Т.Д., Кузьмин С.В., Сутункова М.П., Минигалиева И.А. и др. К сравнительной характеристике токсичности и опасности частиц разного размера в нано- и микрометровом диапазоне. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНСО*. 2011; (5): 32–6.
27. Шилова О.Б., Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Гиченок И.В., Корочкин Л.И., Полетаева И.И. Неонатальные инъекции препарата

- семакс и физиологического раствора вызывают изменения поведения взрослых мышей разных генотипов в тесте «открытое поле». *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2004; 54(6): 785–94.
28. Богданова С.А., Фролова Г.А. Влияние фармакологического стимулирования активности дофаминергической системы «депренилом» на поведение низкотревожных крыс. В кн.: *Донецкие чтения 2019: образование, наука, инновации, культура и вызовы современности: материалы IV Международной научной конференции*. Донецк; 2019: 364–6.
29. Павлова И.В., Рысакова М.П. Проявления тревожности крыс Вистар при выработке условнорефлекторного страха. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2015; 65(6): 720. <https://doi.org/10.7868/S0044467715050123>

References

1. Dumková J., Smutná T., Vrlíková L., Le Coustumer P., Večeřa Z., Dočekal B., et al. Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. *Part. Fibre Toxicol.* 2017; 14(1): 55. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0236-y>
2. Sutunkova M.P., Solovyeva S.N., Chernyshov I.N., Klinova S.V., Gurvich V.B., Shur V.Ya., et al. Manifestation of systemic toxicity in rats after a short-time inhalation of lead oxide nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(3): 690. <https://doi.org/10.3390/ijms21030690>
3. Wani A.L., Ara A., Usmani J.A. Lead toxicity: a review. *Interdiscip. Toxicol.* 2015; 8(2): 55–64. <https://doi.org/10.1515/intox-2015-0009>
4. Xu J., Yan H.C., Yang B., Tong L.S., Zou Y.X., Tian Y. Effects of lead exposure on hippocampal metabotropic glutamate receptor subtype 3 and 7 in developmental rats. *J. Negat. Results Biomed.* 2009; 8: 5. <https://doi.org/10.1186/1477-5751-8-5>
5. Rocha A., Trujillo K.A. Neurotoxicity of low-level lead exposure: History, mechanisms of action, and behavioral effects in humans and preclinical models. *Neurotoxicology*. 2019; 73: 58–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.02.021>
6. Neal A.P., Guilarte T.R. Molecular neurobiology of lead (Pb(2+)): effects on synaptic function. *Mol. Neurobiol.* 2010; 42(3): 151–60. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8146-0>
7. Lau C.G., Zukin R.S. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007; 8(6): 413–26. <https://doi.org/10.1038/nrn2153>
8. Mony L., Kew J.N., Gunthorpe M.J., Paoletti P. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 157(8): 1301–17. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00304.x>
9. Endeley S., Rosenberger G., Geider K., Popp B., Tamer C., Stefanova I., et al. Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat. Genet.* 2010; 42(11): 1021–6. <https://doi.org/10.1038/ng.677>
10. Ramos A., Pereira E., Martins G.C., Wehrmeister T.D., Izidio G.S. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav. Brain Res.* 2008; 193(2): 277–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.06.007>
11. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001; 25(4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
12. Trofimov A.N., Rotov A.Yu., Veniaminova E.A., Fomalont K., Shvarts A.P., Zubareva O.E. Behavioral alterations of adult rats evoked by neonatal LPS injections are associated with changes of ionotropic glutamate receptors gene expression in the brain. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2020; 106(3): 356–72. <https://doi.org/10.31857/S0869813920030097> (in Russian)
13. Hansen K.B., Yi F., Perszyk R.E., Furukawa H., Wollmuth L.P., Gibb A.J., et al. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* 2018; 150(8): 1081–105. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812032>
14. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 2010; 62(3): 405–96. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>

Original article

15. Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B., Seeburg P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 1994; 12(3): 529–40. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90210-0)
16. Wu Y., Wang Y., Wang M., Sun N., Li C. GRIN2A polymorphisms and expression levels are associated with lead-induced neurotoxicity. *Toxicol. Ind. Health*. 2016; 33(4): 332–39. <https://doi.org/10.1177/0748233716647636>
17. Wang T., Guan R.L., Liu M.C., Shen X.F., Chen J.Y., Zhao M.G., et al. Lead exposure impairs hippocampus related learning and memory by altering synaptic plasticity and morphology during juvenile period. *Mol. Neurobiol*. 2016; 53(6): 3740–52. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9312-1>
18. Zhu X., Liu X., Wei F., Wang F., Merzenich M.M., Schreiner C.E., et al. Perceptual training restores impaired cortical temporal processing due to lead exposure. *Cereb. Cortex*. 2016; 26(1): 334–45. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu258>
19. Katsnel'son B.A., Privalova L.I., Degtyareva T.D., Kuz'min S.V., Sutunkova M.P., Minigalieva I.A., et al. Comparative characterization of the biological aggressivity of particles having different dimensions in nano- and micrometric ranges. *Zdorov'e naseleeniya i sreda obitaniya – ZNiSO*. 2011; (5): 32–6. (in Russian)
20. Gavazzo P., Zanardi I., Baranowska-Bosiacka I., Marchetti C. Molecular determinants of Pb²⁺ interaction with NMDA receptor channels. *Neurochem. Int*. 2008; 52(1–2): 329–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.07.003>
21. Forrest D., Yuzaki M., Soares H.D., Ng L., Luk D.C., Sheng M., et al. Targeted disruption of NMDAR receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron*. 1994; 13(2): 325–38. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90350-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90350-6)
22. Tang Y.P., Shimizu E., Dube G.R., Rampon C., Kerchner G.A., Zhuo M., et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*. 1999; 401(6748): 63–9. <https://doi.org/10.1038/43432>
23. Zhou Q., Sheng M. NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology*. 2013; 74: 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.030>
24. Tartaglione A.M., Serafini M.M., Raggi A., Iacoponi F., Zianni E., Scalfari A., et al. Sex-dependent effects of developmental lead exposure in Wistar rats: evidence from behavioral and molecular correlates. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(8): 2664. <https://doi.org/10.3390/ijms21082664>
25. Kazlauskas V., Schuh J., Dall'Igna O.P., Pereira G.S., Bonan C.D., Lara D.R. Behavioral and cognitive profile of mice with high and low exploratory phenotypes. *Behav. Brain Res*. 2005; 162(2): 272–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.03.021>
26. Griffin A.S., Guillette L.M., Healy S.D. Cognition and personality: an analysis of an emerging field. *Trends Ecol. Evol*. 2015; 30(4): 207–14. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.01.012>
27. Shilova O.B., Markina N.V., Perepelkina O.V., Gichenok I.V., Korochkin L.I., Poletaeva I.I. Neonatal semax and saline injections induce open-field behavior changes in mice of different genotypes. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova*. 2004; 54(6): 785–94. (in Russian)
28. Bogdanova S.A., Frolova G.A. Effect of pharmacological stimulation of the activity of the dopaminergic system by “deprenyl” on the behavior of low-anxiety rats. In: *Donetsk Readings 2019: Education, Science, Innovations, Culture and Challenges of Our Time: Proceedings of the Fourth International Scientific Conference [Donetskie chteniya 2019: obrazovanie, nauka, innovatsii, kul'tura i vyzovy sovremennosti: materialy IV Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii]*. Donetsk; 2019: 364–66. (in Russian)
29. Pavlova I.V., Rysakova M.P. Features of conditioned reflex fear in active and passive rabbits. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova*. 2015; 65(6): 720. <https://doi.org/10.7868/S0044467715050123> (in Russian)
30. Kraeuter A.K., Guest P.C., Sarnyai Z. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents. *Methods Mol. Biol*. 2019; 1916: 69–74. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4