

УДК 612.014.41.59: 591.505: 591.182

<http://dx.doi.org/10.22328/2413-5747-2023-9-1-52-57>

МОДУЛИРУЮЩИЕ ВЛИЯНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ КИСЛОРОДНОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА КРЫС ПОРОДЫ WISTAR НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ АЗОТНОГО НАРКОЗА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

^{1,2}А.Н. Вётош^{ORCID}, ¹О.С. Алексеева^{ORCID}*¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия²Национальный государственный университет им. П.Ф. Лесгафта, Санкт-Петербург, Россия

ЦЕЛЬ: Выяснить влияние изменений кислородного статуса организма животных на проявления токсического действия азота под давлением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Использовали гипербарическую камеру для создания нормотермического действия гипербарического азота вплоть до 4,1 МПа на фоне изменения концентрации кислорода от 0,03 до 0,004 МПа, регистрировали двигательную активность и рефлексы позы крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ: Уменьшение содержания кислорода в дыхательной газовой среде от 0,021 до 0,004 МПа на фоне компрессии азотом двухфазно увеличивало чувствительность крыс породы Wistar к токсическому действию азота. При этом в зоне некомпенсируемой гипоксии чувствительность к действию гипербарического азота возрастала в 4,5 раза. Предварительное экспонирование беременных крыс в условиях гипоксии приводило к уменьшению в среднем на 35 % чувствительности потомков по достижении ими половозрелого возраста, к токсическому действию гипербарического азота.

ОБСУЖДЕНИЕ: Полученные данные позволяют считать токсическое действие гипербарического азота кислородзависимым процессом. При этом гипоксия в сочетании с действием гипербарического азота усиливает азотный наркоз, а гипоксия, предшествующая компрессии азотом, уменьшает интоксикацию этим газом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: морская медицина, азотный наркоз, гипоксический стимул, наркоз инертным газом

*Для корреспонденции: Алексеева Ольга Сергеевна, e-mail: osa72@inbox.ru

*For correspondence: *Olga S. Alekseeva*, e-mail: osa72@inbox.ru

Для цитирования: Вётош А.Н., Алексеева О.С. Модулирующие влияния изменения кислородного статуса организма крыс породы wistar на поведенческие проявления азотного наркоза: экспериментальное исследование // Морская медицина. 2023. Т. 9, № 1. С. 52–57, doi: <http://dx.doi.org/10.22328/2413-5747-2023-9-1-52-57>.

For citation: Vjotosh A.N., Alexeeva O.S. Modulating influence of wistar rats' oxygen status on behavioural manifestations of nitrogen narcosis: experimental study // *Marine medicine*. 2023. Vol. 9, No. 1. P. 00–00, doi: <http://dx.doi.org/10.22328/2413-5747-2023-9-1-52-57>.

MODULATING INFLUENCE OF WISTAR RATS' OXYGEN STATUS ON BEHAVIOURAL MANIFESTATIONS OF NITROGEN NARCOSIS: EXPERIMENTAL STUDY

^{1,2}Alexander N. Vjotosh^{ORCID}, ¹Olga S. Alekseeva^{ORCID}*¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia²Lesgaft National State University of Physical Education, Sport and Health, St. Petersburg, Russia

OBJECTIVE of the study is to determine the influence of changing oxygen status in the animal's body on nitrogen toxic effect under pressure.

© Авторы, 2023. Издательство ООО «Балтийский медицинский образовательный центр». Данная статья распространяется на условиях «открытого доступа», в соответствии с лицензией ССВУ-NC-SA 4.0 («Attribution-NonCommercial-ShareAlike» / «Атрибуция-Некоммерчески-Сохранение Условий» 4.0), которая разрешает неограниченное некоммерческое использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии указания автора и источника. Чтобы ознакомиться с полными условиями данной лицензии на русском языке, посетите сайт: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.ru>

MATERIALS AND METHODS: A hyperbaric chamber was used to create normothermic effect of hyperbaric nitrogen up to 4,1 MPa amid changing oxygen concentration from 0,03 to 0,004 MPa, recording rats' motor activity and posture reflexes. **RESULTS:** Oxygen decrease in the respiratory gas medium from 0,021 to 0,004 MPa due to nitrogen compression raised biphasic sensitivity of Wistar rates to nitrogen toxic effect. Yet in the sites of non-compensable hypoxia sensitivity to hyperbaric nitrogen effect increased 4,5 times. Preliminary exposure of pregnant rats in hypoxia led to decrease in the offspring's sensitivity to toxic effect of hyperbaric nitrogen by 35% on average after reaching puberty. **DISCUSSION:** The obtained data allows to regard toxic effect of hyperbaric nitrogen as oxygen-dependent process. While hypoxia along with hyperbaric nitrogen effect enhances nitrogen narcosis, hypoxia, prior to nitrogen compression, reduces intoxication of this gas.

KEYWORDS: marine medicine, nitrogen narcosis, hypoxic stimulus

Введение. Интерес специалистов к причинам, механизмам и методам профилактики азотного наркоза с начала 1970-х годов остается неизменным, а в последние годы даже возрастает. В настоящее время принято учитывать пять факторов, сопутствующих действию на организм азота под давлением. Это действие барометрического давления *per se*, гипоксия в связи с нарастающей плотностью дыхательной газовой среды (ДГС), гипербарическая гипотермия, гиперкапния под влиянием увеличивающейся плотности ДГС и токсическое действие повышающейся концентрации молекул азота в клетках организма. Последняя причина является доминирующей [1]. Авторы предполагают, что исследование сочетанного действия основной и второстепенных причин развития азотного наркоза обеспечит дальнейший прогресс научного поиска в данной области. Особую актуальность полиэтиологическим исследованиям придает отсутствие сведений на эту тему в последних авторитетных обзорах по проблеме действия гипербарического азота [2, 3]

Материалы и методы. Исследования проводили на крысах-самцах массой тела 274 ± 34 г. В первую серию исследований отобрали 35 животных. Они экспонировались в барокамере объемом 107 л. Давление азотом повышалось со скоростью 0,1 МПа/мин в нормотермических и нормокапнических условиях. Парциальное давление кислорода в ДГС составляло в этой серии исследований поочередно 0,021 (нормоксия), 0,012, 0,08, 0,06 и 0,04 МПа. В качестве основных поведенческих признаков наркотического действия азота использовались: атаксия задних конечностей, атаксия передних конечностей и потеря выпрямительных рефлексов. Появление самого раннего признака азотного наркоза – атаксии задних конечностей при нормоксии и давлении азота 1,2 МПа авторы рассматривали как количественную меру чувствительности

организма интактных крыс к наркотическому действию азота. Разницу давлений азота между появлением самого раннего и самого позднего признаков азотного наркоза мы считали количественной мерой устойчивости к наркотическому действию азота. В условиях нормоксии она составляла $4,1 - 1,2 = 2,9$ МПа.

Вторую серию исследований – постнатальное гипоксическое прекондиционирование с последующим измерением чувствительности и устойчивости животных к действию гипербарического азота проводили в той же барокамере ($n = 6$). Интактных крыс подвергали ежедневным интервальным нормобарическим гипоксическим тренировкам в течение 4 дней при концентрации кислорода в ДГС, равной $6 \pm 0,2$ %. После завершения последнего сеанса выполняли компрессию животных азотом в нормоксической среде со скоростью 0,1 МПа/мин. Определяли изменение чувствительности и устойчивости крыс к токсическому действию азота по величине давления этого газа в камере при проявлении признаков двигательной активности и рефлексов позы.

Третью серию исследований – пренатальное гипоксическое прекондиционирование ($n = 28$) проводили по методике, детально описанной в работе Н.М. Дубровской [4]. Беременные самки крыс с фиксированной датой зачатия были разделены на две группы. Одна из групп подвергалась нормотермическому и нормокапническому гипоксическому воздействию при $pO_2 = 7 \pm 0,2$ % в течение 3 ч на 11-й день гестации ($n = 6$), а вторая – на 14-й ($n = 8$). Из новорожденных отбирали самцов и доразвивали их в условиях вивария Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (ИЭФБ) РАН до трехмесячного возраста. После этого проводили компрессию азотом в нормоксических, нормотермических и нормокапнических условиях, попарно сравнивая изменения двигательной активности и рефлексов позы у контрольных и

пренатально гипоксически прекондиционированных животных.

Полученные данные обрабатывали стандартными методами математической статистики с вычислением текущих, средних значений, среднеквадратических отклонений и достоверности различий по Стьюденту.

Результаты. Процесс развития азотного наркоза на фоне гипоксии в первой серии опытов исследовали при парциальном давлении кислорода в ДГС, равном 0,021; 0,012; 0,008; 0,006 и 0,004 МПа. В условиях нормоксии признаки наркотического действия азота впервые проявлялись при давлениях 1,2 МПа (атаксия задних конечностей), 2,0 МПа (атаксия передних конечностей) и 3,4 МПа (потеря выпрямительных рефлексов). При умеренной компенсируемой гипоксии (0,012 и 0,008 МПа кислорода в ДГС) все основные поведенческие признаки впервые проявлялись при меньших давлениях. При этом повышалась чувствительность и уменьшалась устойчивость животных к действию гипербарического азота.

В условиях жесткой декомпенсированной гипоксии (0,006 и 0,004 МПа кислорода в ДГС) ее

влияние на процесс развития азотного наркоза усиливалось. Более быстрыми темпами росла чувствительность и падала устойчивость крыс к наркотическому действию азота. При 0,004 МПа кислорода в ДГС весь спектр поведенческого репертуара укладывался в диапазон давлений азота от 0,08 до 1,1 МПа. В условиях нормоксии в этом диапазоне давлений азота отсутствовал любой, даже самый ранний признак азотного наркоза.

Таким образом, данные, приведенные на рис. 1, убедительно свидетельствуют о том, что процесс развития азотного наркоза является кислородозависимым в диапазоне концентраций кислорода в ДГС 0,021–0,004 МПа. При этом двухфазно увеличивалась чувствительность и уменьшалась устойчивость организма млекопитающих к наркотическому действию азота.

Гипоксическое прекондиционирование (тренировка) во второй серии опытов позволила изменить кислородный статус организма за счет активизации физиологических и биохимических резервов основных этапов массопереноса и утилизации кислорода. Было применено интер-

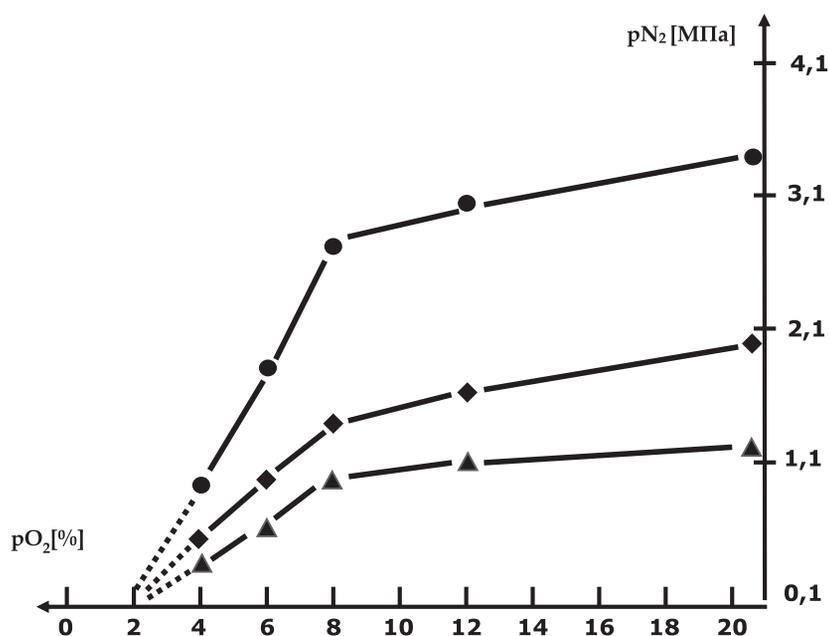


Рис. 1. Изменения двигательной активности и рефлексов позы крыс в ходе развития азотного наркоза на фоне нарастающего гипоксического стимула. По горизонтальной оси – концентрация кислорода в дыхательной газовой среде (ДГС). По вертикальной оси – парциальное давление азота в ДГС. ▲ – атаксия задних конечностей. ◆ – атаксия передних конечностей. ● – потеря выпрямительных рефлексов.

Fig.1. Changes in motor activity and postural reflexes in rats during the development of nitrogen anesthesia against the background of an increasing hypoxic stimulus. On the horizontal axis - the concentration of oxygen in the respiratory gas environment (RGE). The vertical axis is the partial pressure of nitrogen in the RGE.

▲ – ataxia of the hind limbs. ◆ – ataxia of the forelimbs. ● – loss of rectifying reflexes.

вальное гипоксическое воздействие. Для этого экспонировали крыс в условиях нормотермии и нормокапнии при $pO_2 = 6\%$ по схеме (20 мин гипоксия, 5 мин нормоксия, 20 мин гипоксия, 5 мин нормоксия, 20 мин гипоксия, возврат животных в нормальную воздушную атмосферу). Четырехдневная интервальная гипоксическая тренировка позволила увеличить устойчивость животных к действию повышенного давления азота на 67,2 %. Это является дополнительным доказательством кислородозависимости механизмов развития азотного наркоза у животных.

Еще один способ влияния на кислородный статус организма состоял в изменении вентиляторной реакции на гипоксию на этапе пренатального развития [5]. На предварительном этапе исследования установлено, что трехчасовой сеанс гипоксического воздействия ($[O_2] = 7\%$) на беременных крысах на 11-й день гестации приводил у рожденного ими потомства к уменьшению вентиляторной реакции на гипоксию (ВРНГ) на 40 %, а аналогичное воздействие на 14-й день после зачатия увеличивало ВРНГ на 26 %. В третьей серии опытов исследовали

реакцию крыс на действие повышенного давления азота у обеих групп (11-го и 14-го дня пренатального кондиционирования). Результаты представлены в табл. 1.

Два из трех зарегистрированных нами поведенческих признака развития азотного наркоза у крыс достоверно изменили свои значения для прекодиционированных на пренатальном периоде индивидуального развития животных. Ранний признак токсического действия гипербарического азота – атаксия задних конечностей – проявлялся на 30 % позже у крыс, чьи матери подверглись гипоксическому прекодиционированию на 11-й день гестации, и на 58 % позже для 14-дневного срока гипоксической коррекции. Такой признак проявления азотного наркоза, как атаксия передних конечностей, был зарегистрирован нами на 20 % позже для животных, чье пренатальное развитие подверглось гипоксической коррекции на 11-й день, и на 35 % позже для группы, в которой гипоксическое вмешательство осуществляли на 14-й день пренатального развития. Финальная часть поведенческого паттерна проявления азотного

Таблица 1

Параметры двигательной активности и рефлексов позы крыс в ходе компрессии азотом

Table 1

Parameters of rats motor activity and posture reflexes during nitrogen compression

Измеряемый параметр	Группа экспериментальных животных		
	Контрольная (n = 12)	Гипоксическое воздействие на 11-й день гестации (n = 6)	Гипоксическое воздействие на 14-й день гестации (n = 8)
Величина давления азота, при котором появляются признаки атаксии задних конечностей [МПа]	1,2	1,56	1,9
± б [МПа]	0,12	0,13*	0,17**
Величина давления азота, при котором появляются признаки атаксии передних конечностей [МПа]	2,0	2,4	2,7
± б [МПа]	0,11	0,19*	0,16**
Величина давления азота, при котором теряются выпрямительные рефлекссы [МПа]	4,1	4,0	4,1
± б [МПа]	0,09	0,163	0,35

Примечание. * – Достоверность различий с данными контрольной группы: * $p < 0,1$; ** $p < 0,07$

Note. * – The reliability of differences with the data of the control group: * $p < 0.1$; ** $p < 0.07$

наркоза – потеря выпрямительных рефлексов – во всех трех группах происходила практически при одном и том же давлении.

Обсуждение. В доступной литературе удалось найти сведения о сравнении системных и клеточных реакций организма на последовательное применение только гипероксического воздействия и действия повышенного давления азота [6, 7]. В нашем случае мы использовали гипоксические воздействия для коррекции кислородного статуса организма методом пренатального пре кондиционирования и показали влияние токсического действия азота на чувствительность крыс породы Wistar. Это еще раз подтверждает, что механизм наркотического действия гипербарического азота имеет кислородзависимый компонент. По нашему мнению, локациями молекулярных механизмов взаимодействия кислорода и повышенных концентраций молекул азота в ходе развития азотного наркоза являются IV комплекс в цепи окислительного фосфорилирования митохондрий и фермент гемоксигеназа-2 примембран-

ного комплекса кислородной чувствительности клеток, в особенности в тахитрофных органах.

Заключение. Коррекция кислородного статуса организма крыс породы Wistar несколькими способами позволяет изменять чувствительность и устойчивость к действию гипербарического азота. Это означает, что азотный наркоз является кислородзависимым процессом. Можно ожидать, что в ходе развития процесса токсического действия гипербарического азота нарушаются как энергетические, так и регуляторные механизмы. Эти альтерации происходят во многих, если не всех клетках организма, но их ранние признаки проявляются в нарушении функционирования тахитрофных органов. Эпизоды кратковременной гипоксии, пережитые беременными крысами во втором триместре гестации, могут быть одним из факторов, объясняющих различную индивидуальную чувствительность к действию гипербарического азота у их потомков.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН (рег. № 075-01052-22-00).

Сведения об авторах:

Вётош Александр Николаевич – доктор биологических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, 194223, г. Санкт-Петербург, проспект Мориса Тореза, д. 44; федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный государственный университет им. П.Ф. Лесгафта», e-mail: vjotnn@yahoo.com; ORCID 0000-0003-38-54-0320; SPIN 2436-5282;

Алексеева Ольга Сергеевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории «Клеточные механизмы гомеостаза крови» федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, 194223, г. Санкт-Петербург, проспект Мориса Тореза, д. 44, e-mail: osa72@inbox.ru, ORCID 0000-0001-5688-347X, SPIN 4281-3091,

Information about the authors:

Alexander N. Vjotosh – Dr. of Sci. (Biol.), Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, 194223, Saint Petersburg, Moris Torez Ave., 44; P.F. Lesgaft National State University of Physical Culture, Sports and Health, Saint Petersburg, e-mail: vjotnn@yahoo.com ; ORCID 0000-0003-38-54-0320; SPIN 2436-5282;

Olga S. Alekseeva – Cand. of Sci. (Biol.), Leading researcher of the Laboratory “Cellular Mechanisms of Blood Homeostasis” of the I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, 194223, Saint Petersburg, 44 Moris Torez Ave., 44, e-mail: osa72@inbox.ru; ORCID 0000-0001-5688-347X; SPIN 4281-3091,

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства, согласно международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Наибольший вклад распределен следующим образом.

Вклад в концепцию и план исследования — *А.Н. Вётош, О.С. Алексеева*. Вклад в сбор данных — *А.Н. Вётош, О.С. Алексеева*.

Вклад в анализ данных и выводы — *А.Н. Вётош, О.С. Алексеева*. Вклад в подготовку рукописи — *А.Н. Вётош, О.С. Алексеева*.

Author contribution. All authors according to the ICMJE criteria participated in the development of the concept of the article, obtaining and analyzing factual data, writing and editing the text of the article, checking and approving the text of the article.

Special contribution: ANV, OSA contribution to the concept and plan of the study. ANV, OSA contribution to data collection. ANV, OSA contribution to data analysis and conclusions. ANV contribution to the preparation of the manuscript.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare that they have no competing interests.

Соответствие принципам этики: Исследование было одобрено на заседании комиссии по биоэтике, утвержденной приказом директора ИЭФБ РАН № 6 от 20.01.2022 г.

Протокол заседания № 1 от 27.01.2022. Исследования на животных проводились в соответствии с требованиями Международной декларации о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Adherence to ethical standards: The study was approved at the meeting of the Bioethics Commission approved by the Order of the Director of the IEFB RAS No. 6 dated 20.01.2022.

Minutes of the meeting No. 1 dated 27.01.2022. Animal studies were conducted in accordance with the requirements of the International Declaration on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes.

Поступила/Received: 22.12.2022

Принята к печати/Accepted: 05.02.2023

Опубликована/Published: 30.03.2023

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Вётош А.Н. *Биологическое действие азота*. СПб.: 2003. 232 с. [Vjotosh A.N. *Biological action of nitrogen*. Saint Petersburg. 2003. 232 p. (In Russ.)].
2. Bove A.A. Diving medicine. *American J. Respir. Crit. Care Medicine*. 2014, Vol.189, № 12, pp. 1479–1486. doi: 10.1164/rccm.201309-1662Cl.
3. Edge C.J., Wilmshurst P.T. The pathophysiology of diving diseases. *British J. of Anaesthesia*, 2021, Vol. 21, № 9, pp. 343–348. doi: 10.1016/j.bjae.2021.05.003.
4. Дубровская Н.М., Журавин И.А. Онтогенетические особенности поведения крыс, перенесших гипоксию на 14-е и 18-е сутки эмбриогенеза // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2009. Т. 58, № 5. С. 616–625 [Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A. Ontogenetic features of the behavior of rats that underwent hypoxia on the 14th and 18th days of embryogenesis. *Journal of Higher Nervous Activity named after I.P. Pavlov*, 2009, Vol. 58, № 5, pp. 616–625 (In Russ.)].
5. Teppema L., Dahan A. The Ventilatory Response to Hypoxia in Mammals: Mechanisms, Measurement, and Analysis. *Physiological Reviews*, 2010, Vol. 90, No. 2, pp. 675–754. doi:10.1152/physrev.00012.2009.
6. Dean J.B., Mulkey D.K., Garcia A.J. III, et al. Neuronal sensitivity to hyperoxia, hypercapnia, and inert gases at hyperbaric pressures. *J. Applied Physiology*, 2003, Vol. 95, pp. 883–909. doi: 10.1152/jappphysiol.00920.2002.
7. Vrijdag X.C., van Waart H., Sames C., et al. Does hyperbaric oxygen cause narcosis or hyperexcitability? A quantitative EEG analysis. *Physiological Reports*, 2022, Vol. 12, № 10, e15386. doi: 10.14814/phy2.15386.