

НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

© Бонь Е.И., Максимович Н.Е.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь
E-mail: e_bon@list.ru

Изучение патологии головного мозга при экспериментальной ишемии обуславливает потребность в адекватных способах оценки возникающего у лабораторных животных неврологического дефицита, включающего сенсомоторные и поведенческие нарушения. Целью работы явилось сравнительное изучение двигательных и поведенческих нарушений у крыс с частичной и субтотальной церебральной ишемией. Для избегания высокой летальности животных с субтотальной ишемией головного мозга при одномоментной перевязке общих сонных артерий использовали авторскую модель ступенчатой (с перерывом 7 суток) перевязки общих сонных артерий. Изучение состояния сенсомоторных и двигательных функций осуществляли в тестах «открытое поле», «мышечная сила», «плавательная проба». Крысы с церебральной ишемией в обеих моделях обладали меньшей мышечной силой, были менее устойчивы к гипоксии нагрузки (в плавательной пробе), проявляли меньшую двигательную и эмоциональную активность. У животных с субтотальной церебральной ишемией, моделируемой ступенчатым способом, наблюдались более выраженные сенсомоторные и поведенческие нарушения по сравнению с крысами, которым моделировали частичную церебральную ишемию.

Ключевые слова: церебральная ишемия, сенсомоторные и поведенческие нарушения, крысы.

CHARACTERISTICS OF SENSOMOTOR AND BEHAVIORAL DISORDERS IN EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

Bon E.I., Maksimovich N.E.

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Studies of the pathology of the brain in experimental ischemia necessitate adequate methods of assessing the neurological deficit that occurs in laboratory animals, including sensory and behavioral disorders. The purpose of the research was a comparative study of motor and behavioral disorders in rats with partial and incomplete experimental cerebral ischemia. To avoid high mortality of animals with subtotal cerebral ischemia, the author's model of a stepwise (with a break of 7 days) dressing of common carotid arteries was used for simultaneous bandaging of common carotid arteries. The study of the state of sensomotor and motor functions was carried out in the "open field" test, "muscle strength" test, "swimming test". It was found that rats after experimental cerebral ischemia had less muscle strength, were less resistant to hypoxia, and showed less motor and emotional activity. In animals with incomplete cerebral ischemia, more pronounced sensomotor and behavioral disorders were observed as compared to rats with the modeled partial cerebral ischemia and, especially, as compared to control animals.

Keywords: cerebral ischemia, sensomotor and behavioral disorders, rats.

Ишемические поражения головного мозга лидируют в качестве основной причины его патологии (85% всех инсультов обусловлено ишемией головного мозга) и как одна из причин смертности (около 6 миллионов человек в мире ежегодно) и утраты трудоспособности [21]. Даже кратковременная ишемия головного мозга (ИГМ) ведет к глубоким повреждениям нервной ткани по причине недостаточной оксигенации нейронов, снижения энергообразования, нарушения транспорта потенциально-определяющих ионов, изменения кислотно-основного состояния, эксайтотоксичности, окислительного стресса и апоптоза [7, 11, 13, 14, 15, 18, 23].

Целесообразность изучения патологии головного мозга при экспериментальной ишемии обуславливает потребность в адекватных способах оценки возникающего у лабораторных животных неврологического дефицита, включающего сенсомоторные и поведенческие нарушения. Для

изучения степени сенсомоторных и поведенческих расстройств у взрослых животных может быть использован ряд методов: плавательная проба, тест оценки модифицированных показателей глубины неврологического дефицита, тест «мышечная сила», тест «открытое поле» [4].

Имеются данные литературы о результатах изучения сенсомоторных и поведенческих нарушений на разных моделях ИГМ [6, 8, 9, 10], однако эти данные не систематизированы, в сравнительном аспекте не изучены.

Существует ряд способов моделирования экспериментальной церебральной ишемии. Фокальную ишемию воспроизводят путем филаментной окклюзии средней мозговой артерии (СМА), перевязки или коагуляции СМА и сонных артерий (СА) в различных модификациях (транзиторная и перманентная фокальная ишемия), эмболизации СМА, фототромбоза (с бенгальским розовым), вазоспастической окклюзии отдельного сосуда

(ангиокация эндотелина-1). Тотальную (глобальную) церебральную ишемию у крыс моделируют окклюзией четырех магистральных артерий (двух вертебральных и двух внутренних сонных), экстракраниальной окклюзией сосудов, кровоснабжающих головной мозг (плечевого ствола, левой подключичной артерии и левой общей сонной артерии (ОСА)), а также путем декапитации, остановки сердца или окклюзии аорты и полой вены [12].

Наиболее часто для изучения последствий ишемии на головной мозг используются модели частичной и субтотальной ишемии путем перевязки одной из ОСА – частичная ИГМ или обеих ОСА – субтотальная ИГМ. Односторонняя перевязка ОСА приводит лишь к снижению кровоснабжения головного мозга вследствие наличия у крыс замкнутого виллизиева круга. Одновременная двусторонняя перевязка ОСА (субтотальная ИГМ), несущих до 90% крови к головному мозгу, приводит к нарушению кровообращения в бассейне внутренней СА и СМА, а летальность животных при двусторонней перевязке ОСА, по сведениям различных авторов, достигает 60-70% [20].

В литературе, посвященной исследованию последствий церебральной ишемии, указывается на ряд сенсомоторных нарушений, в том числе снижение двигательной активности при подвешивании животного за хвост, ходьбе по кругу на горизонтальной плоскости, дискоординация движений при хождении по балке, снижение выраженности безусловных рефлексов, неспособность животного ориентироваться в части пространства (неглект). Локальное ишемическое повреждение передних отделов лобной коры головного мозга крысы приводит к нарушению выработки, сохранения и воспроизведения условных рефлексов, а повреждение задних отделов лобной коры сопровождается потерей способности к правильной ориентировке в Т-образном лабиринте [8, 9, 10].

Целью работы явилось сравнительное изучение двигательных и поведенческих нарушений у крыс с частичной и субтотальной экспериментальной ИГМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 30 самках беспородных белых крыс массой 230 ± 20 г. При проведении экспериментов соблюдались все требования Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей [16]. Животных содержали в кондиционируемом помещении (22°C) при смешанном освещении на

стандартном рационе вивария и свободном доступе к корму и воде, группами не более 5 особей в клетке вивария.

Выбор экспериментальных животных обусловлен сходством ангиоархитектоники головного мозга крыс и человека.

Перед проведением исследований соблюдены необходимые условия: животные за 60 минут до тестирования находились в тихом, слабо освещенном месте, не проводилась перегруппировка животных, их кормление и другие активные манипуляции [4].

С целью избежания высокой летальности животных при одномоментной перевязке ОСА моделирование субтотальной ишемии головного мозга (СИГМ) осуществлялось путем их ступенчатой перевязки, что способствовало 100% выживаемости животных.

Частичную ИГМ (ЧИГМ) моделировали путем перевязки одной ОСА. В условиях внутривенного тиопенталового наркоза ($40-50$ мг/кг) по средней линии вентральной поверхности шеи делали разрез, выделяли, а затем лигировали левую ОСА (группа 1). Вторую группу составили крысы, которым через 7 суток после ЧИГМ [5] моделировали СИГМ путем перевязки второй (правой) ОСА. Контрольную группу (контроль) составили ложнопериоперированные животные.

Проведение тестов осуществляли через 5 суток после операционного вмешательства.

Для оценки степени ишемического повреждения головного мозга эмоциональное состояние, поведение и двигательную активность изучали в тесте «открытое поле», с помощью теста «мышечная сила» и «плавательная проба» [4, 17, 19, 22].

Тест «открытое поле» был предложен для регистрации поведения животных в ответ на «новые, потенциально опасные стимулы» [17]. Он проводится на плоской поверхности, расчерченной линиями, образующими 36 квадратов одинакового размера и загороженной по периметру. В «открытом поле» исследуют время выхода животных из центра площадки, активность в горизонтальной и вертикальной плоскостях пространства, груминг (умывание), изучение животным углублений и дыр, количество дефекаций. Нарушения двигательных функций проявляются дискоординацией, дрожанием, парезом, параличом. Горизонтальная двигательная активность животных включает бег по разным направлениям, хождение по кругу. При этом оценивается участие в движениях всех конечностей крысы. За единицу перемещения при визуальной регистрации активности принимается один пересеченный сектор.



Рис. 1. Оценка мышечной силы.

Показатели сенсомоторных и поведенческих тестов, Me(LQ;UQ)

Таблица 1

| Группы | Показатели | | | | | |
|----------|----------------|--------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------|
| | Мышечная сила | Плавательная проба | Тест «открытое поле» | | | |
| | | | Количество пересеченных квадратов | Количество коротких умываний | Количество стоек типа «climbing» | Количество актов дефекации и мочеиспускания |
| Контроль | 20 (15; 24) | 21 (18; 23) | 67 (64; 72) | 6 (5,1; 7,2) | 9 (8; 9,4) | 5 (4,6; 6,5) |
| ЧИГМ | 5 (4,7; 5,9)* | 12 (15; 12,3)* | 54 (52; 59)* | 4 (3,5; 4,3)* | 6 (5,8; 6,4)* | 3 (2,5; 3,6)* |
| СИГМ | 1 (0,5; 1,2)*# | 5,3 (4,5; 5,7)*# | 24 (22; 28)* # | 2 (1,6; 2,4)*# | 3 (2,6; 3,2)* # | 2 (1,2; 2,3)* # |

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # – $p < 0,05$ по сравнению с ЧИГМ.

Моторная активность крысы в вертикальной плоскости представлена двумя видами стоек. В стойках типа «climbing» (восхождение) задние лапы животного остаются на полу поверхности, а передние упираются в стенку «открытого поля», в стойках типа «tearing» (от «tear» – «становиться на дыбы») передние конечности остаются на весу. Груминг (умывание) используется для изучения эмоционального состояния животных, его разделяют на короткий и длительный. Короткий груминг представляет собой быстрые круговые движения передних лап вокруг носа и вибрисс, а длительный – умывание глаз, области позади ушей, умывание всей головы, лап, боков, спины, аногенитальной области, хвоста. Исследование отверстий в полу заключается в обнюхивании их краев или засовывании животным мордочки внутрь отверстий. Количество актов дефекации считается маркером «эмоциональности» животного [4, 17, 19].

Мышечная сила оценивалась путем помеще-

ния крысы на горизонтально расположенную металлическую сетку длиной 60 см с нанесенной сантиметровой шкалой делений и определения времени удержания животного после поворота сетки вертикально (на 90°) (рисунок 1).

Для проведения «плавательной пробы» животных помещали в стеклянный резервуар с водой (21°C) и определяли время удержания животного на поверхности воды.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Полученные значения анализировали методами непараметрической статистики. Количественные данные представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между контрольной и опытной группами считали достоверными при $p < 0,05$ (тест Крускаллы-Уоллиса и Манна-Уитни с поправкой Бонферони) [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных обеих групп с ИГМ отмечается значительное снижение мышечной силы по сравнению с контрольной группой – в группе с ЧИГМ – на 75% ($p < 0,05$), в группе с СИГМ – на 95% ($p < 0,05$). Мышечная сила у крыс с ЧИГМ была в 5 раз более выраженной, чем у крыс с СИГМ (таблица 1).

Также крысы с ЧИГМ проявили большую устойчивость к гипоксии «нагрузки» в тесте «плавательная проба». Время удержания их на воде превысило данный показатель животных с СИГМ на 58% ($p < 0,05$). По сравнению с контрольной группой продолжительность плавания в группе с ЧИГМ была меньше на 57% ($p < 0,05$), а в группе с СИГМ – на 76% ($p < 0,05$).

Оценка двигательной активности в тесте «открытое поле» также выявила наличие моторного дефицита у крыс с ИГМ. У крыс с ЧИГМ по сравнению с контрольной группой количество пересеченных квадратов было меньше на 20% ($p < 0,05$), а в группе с СИГМ – на 64% ($p < 0,05$). Двигательная активность в горизонтальной плоскости была выше у крыс с ЧИГМ на 44% ($p < 0,05$) по сравнению с группой СИГМ.

Количество коротких умываний у крыс с ЧИГМ было меньше на 33% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, а в группе с СИГМ – на 67% ($p < 0,05$). Крысы с ЧИГМ совершали больше умываний по сравнению с группой СИГМ на 50% ($p < 0,05$).

Количество стоек типа «climbing» по сравнению с контрольной группой у крыс с ЧИГМ было меньше на 33% ($p < 0,05$), а в группе с СИГМ – на 67% ($p < 0,05$). Крысы с ЧИГМ делали стойки по сравнению с группой СИГМ на 50% ($p < 0,05$).

Количество актов дефекации и мочеиспускания у крыс с ЧИГМ было на 40% меньше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), а в группе с СИГМ – меньше на 60% ($p < 0,05$). По данному показателю крысы с ЧИГМ отличались от животных с СИГМ на 33% ($p < 0,05$).

Длительные умывания и стойки rearing наблюдались только у интактных животных ($p < 0,05$).

Таким образом, крысы после экспериментальной ИГМ обладали меньшей мышечной силой, были менее устойчивы к гипоксии, проявляли меньшую двигательную активность. У животных с СИГМ наблюдались более выраженные сенсомоторные и поведенческие нарушения по сравнению с крысами, которым моделировали частичную ИГМ.

Морфологической основой выявленных нарушений является повреждение нейронов го-

лового мозга, разрушение физиологических функциональных связей и возникновение патологических систем, что приводит к дестабилизации нервных процессов (соотношения реакций возбуждения и торможения) [2]. Последнее сказывается на осуществлении когнитивных функций мозга. В основе данных нарушений лежит дисбаланс уровня нейромедиаторов и биогенных аминов в структурах мозга, что в качестве эндогенных патогенных факторов определяет характер и степень тяжести ишемического повреждения [2, 3, 8, 9].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных : учеб.-метод. пособие. – Минск : Ин-т подгот. науч. кадров НАН Беларуси, 2008. – 160 с. [Batin N.V. Computer statistical analysis of the data: the educational-methodical guide. Minsk : In-t podgot. nauch. kadrov NAN Belarusi; 2008: 160 (in Russ.).]
2. Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М. Морфофункциональные нарушения в гиппокампе крыс после субтотальной ишемии // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 24-29. [Bon L.I., Maksimovich N.Ye., Zimatkin S.M. Morphofunctional disorders in the hippocampus of rats after subtotal ischemia. Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii. 2018; 17 (1): 24-29 (in Russ.).]
3. Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М. Цитохимические нарушения в парietальной коре и гиппокампе крыс после субтотальной ишемии // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 43-49. [Bon L.I., Maksimovich N.Ye., Zimatkin S.M. Cytochemical disturbances in the parietal cortex and hippocampus of rats after incomplete ischemia. Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2018; 17 (1): 43-49 (in Russ.).]
4. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высшая школа, 1991. – 345 с. [Buresh Ya., Bureshova O., Kh'yuston Dz. Techniques and basic experiments on the study of the brain and behavior. – M.: Vysshaya shkola; 1991: 345 (in Russ.).]
5. Бутин А.А. Закономерности изменений сосудисто-капиллярной сети коры большого мозга в ответ на острую церебральную ишемию // Омский научный вестник. – 2004. – № 26, приложение. – С. 46-57. [Butin A.A. Patterns of changes in the cerebrovascular capillary network of the cerebral cortex in response to acute cerebral ischemia. Omskiy nauchnyy vestnik. 2004; (26): 46-57 (in Russ.).]
6. Ганцгорн Е.В., Хлопонин Д.П., Макляков Ю.С. Анализ выживаемости и частотно-пространственного распределения электроэнцефалографических показателей крыс при глобальной ишемии головного мозга // Кубанский научный медицинский вестник. – 2017. – № 2 (163). – С. 43-49.

12. *Caumichne S.T.* Redox modes of action of nitric oxide mechanism, and purpose (*NeuroRx* - 2005 - Vol. 2, N 3, - P. 396-409 - DOI: 10.1093/neuro/nri015).
13. *Chalmers G.R., Ray R.R.* *Editor in Chief* Mechanisms of the oxidative capacity of mitochondria (*Brain Res.* - 1992 - Vol. 570, N -2, - P. 25-33).
14. *Chan P.H.* Mitochondria and neuronal death: signaling pathways in cerebral ischemia (*Stroke chem. Res.* - 2004, - Vol. 29, N 10, - P. 1043-1048).
15. *Chen H., Sun D.* The role of Na⁺/K⁺ cotransporter in cerebral ischemia (*Neuro. Res.* - 1995 - Vol. 27, N 5, - P. 280-286, - DOI: 10.1179/016164105X25243).
16. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS № 123, - Strasbourg, 1986 - P. 34-42.
17. *Hall C.S.* Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity (*J. comp. physiol. Psychol.* - 1936, - Vol. 22, N 3, - P. 345-352, - DOI: 10.1037/h0059253).
18. *Hao C.H., Ding W.X., Sun Q., Li X.X., Wang W.T., Zhao Z.Y., Tang L.D.* Effect of human recombinant prothrombinase (dipro-UK) on thrombotic stroke in rats (*Eur J Pharmacol.* - 2018, - Vol. 818, - P. 429-434, - DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.11.026).
19. *Hatori K., Lee H., Han P.D., Gavin B.J., Travençolo R.J., DeVries A.C.* Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice (*Stroke*, - 2009, - Vol. 40, N 8, - P. 1939-1944).
20. *Mrocskó E., Fugyecz M., Istótvári A., Farkas E., Borzi F.* Changes in pro-oxidant and antioxidant enzyme levels during cerebral hyperperfusion in rats (*Brain Res.* - 2010, - Vol. 1321, - P. 13-19, - DOI: 10.1016/j.brainres.2009.11.080).
21. *Sacco S.E., Whisnant J.P., Broderick J.P., Phillips S.J., O'Fallon W.M.* Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population (*Stroke*, - 1991, - Vol. 22, N 10 - P. 1236-241).
22. *Schallert T., Woodlee M.T.* Orienting and placing. In: *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests.* - Oxford: Oxford University Press, 2005, - P. 129-140.
23. *White B.C., Sullivan J.M., DeGrazia D.J., O'Neil B.J., Neumar R.W., Grossman L.L., Rafols J.A., Krause G.S.* Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury (*J. Neurol. Sci.* - 2000 - Vol. 179, S. 1-2, - P. 1-33).
8. *Борисова Е.И., Митрохин Д.Р., Макляков Ю.С.* Аспекты survival and frequency-spatial distribution in electroencephalographic indices of rats with global cerebral ischemia // *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik*. 2017; 7: 24-33: 45-49 (in Russ.).
9. *Борисова Е.И.* Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений головного мозга // *Труды ГрГМУ*, 2004. - 305 с. [*Maksimovich M.E.* Role of nitric oxide in the pathogenesis of ischemic and reperfusion injury of the brain // *Encephalograph.* Grodno: GrGMU: 2004: 178 (in Russ.).]
10. *Романова Г.А.* Дизрегуляторные нарушения интегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры // *Дизрегуляторная патология*. - М.: Феликс, 2002. - С. 605-615. [*Romanova G.A.* Disregulatory disorders of brain integrative activity in focal coronary ischemia. Disregulation pathology. *Mos. Meditsina* 2002: 605-615. (in Russ.)]
11. *Романова Г.А., Шахова Ф.М., Гудачева Т.А., Островская Р.У.* Нарушения обучения и памяти; вызванные фототромбозом префронтальной коры головного мозга крыс: эффекты дооперативной экспериментальной биологии и медицины. - 2002 - Т. 134, № 12. - С. 614-616. [*Romanova G.A., Shaikova F.M., Gudacheva T.A., Ostrovskaya R.U.* Disturbances in learning and memory caused by photo thrombosis of the prefrontal cerebral cortex of rats: effects of preoper. // *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2002; 134: 614-616. (in Russ.)]
12. *Суфианов Г.З., Усов Л.А., Суфианов А.А., Шапкин А.П., Рувейков Л.Ю., Голубев С.С., Мурик С.Э.* Минимальная модель фокальной ишемии головного мозга у крыс // *Эксперим. и клинич. фармакология*. 2001. - Т. 64, № 4. - С. 63-67. [*Sufianov G.Z., Usor L.A., Sufianov A.A., Shapkin A.P., Ruvejkov L.Yu., Golubev S.S., Murik S.E.* Minimal-invasive model of focal brain ischemia in rats. *Exsperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2001; 64(4): 63-67. (in Russ.)]
13. *Andrade A., Zindovski M.* Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury (*Cell Mol. Life Sci.* - 2006, - Vol. 61, N 2, - P. 657-668, - DOI: 10.1007/s00018-003-1319-x).

РЕПОЗИТОРИЙ ГРГМУ