

ВЛИЯНИЕ СОСТОЯНИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И ПОЛА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ТОТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

Криштоп В.В.¹, Румянцева Т.А.², Пахрова О.А.¹

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново, Россия, e-mail: chrishtop@isma.ivanovo.ru

² Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Ярославский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ярославль, Россия, e-mail: rum-yar@mail.ru

Проанализирована смертность животных при экспериментальной неполной глобальной ишемии головного мозга. Исследованы показатели эмоционально-поведенческой реактивности с помощью теста «открытое поле» и когнитивных функций в водном лабиринте Морриса на 108 крысах обоего пола. Прослежена взаимосвязь частоты летальных исходов с полом, индивидуальной стрессоустойчивостью и развитием когнитивных процессов. Не было обнаружено гендерных особенностей выживаемости крыс как в раннем, так и в отдаленном периоде после операции. Установлено, что число погибших в первые три дня после двусторонней окклюзии общих сонных артерий животных, обладающих низкой устойчивостью к стрессовым нагрузкам, было почти в 3 раза больше, чем стрессоустойчивых. Выявлена зависимость между развитием когнитивных функций у крыс и вероятностью летального исхода после операции. Высокие когнитивные способности у животных ассоциированы с большим процентом смертности (48,1%) в первые 72 часа после неполной глобальной ишемии мозга. В более отдаленные сроки значимых отличий числа летальных исходов у животных с высокими и низкими когнитивными функциями не наблюдалось.

Ключевые слова: тотальная гипоксия головного мозга, смертность, высшая нервная деятельность, половые особенности, крысы.

INFLUENCE OF CONDITION OF HIGHER NERVOUS ACTIVITY AND SEX ON SURVIVAL IN MODELING TOTAL CEREBRAL HYPOXIA IN RATS

Chrishtop V.V.¹, Rumyantseva T.A.², Pakhrova O.A.¹

¹ Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russia, e-mail: chrishtop@isma.ivanovo.ru

² Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia, e-mail: rum-yar@mail.ru

Analyzed mortality in experimental rats incomplete global cerebral ischemia. We studied behavioral indicators of emotional reactivity with the test "open field" and cognitive function in the Morris water maze of 108 rats of both sexes. It traces the relationship of the frequency of deaths with sex, stress tolerance and the development of individual cognitive processes. There was no gender-specific survival rates of rats in both early and late after surgery. Established that the death toll in the first three days after bilateral common carotid artery occlusion animals with low resistance to stress conditions, was nearly 3 times greater than the stress resistant. The dependence between the development of cognitive functions in rats and the likelihood of death after surgery. High cognitive ability in animals are associated with a large percentage of mortality (48.1%) in the first 72 hours after incomplete global cerebral ischemia. In a long-term period of significant differences of deaths in animals with high and low cognitive function was observed.

Keywords: total hypoxia of brain, mortality, higher nervous activity, rats sexual peculiarities

В течение последних десятилетий проблема ишемического инсульта приобретает все большую значимость в связи с широкой распространенностью цереброваскулярной патологии, высоким уровнем летальности, частым развитием инвалидности и социальной дезадаптации перенесших его больных. Одним из центральных звеньев патогенеза нарушения мозгового кровообращения является ухудшение реологических свойств крови,

что влияет на развитие зоны ишемии, вызывая нарушение циркуляции, локальный стаз, снижение транспорта кислорода и гипоксию [5]. Несмотря на активизацию изучения различных аспектов цереброваскулярной патологии в последние годы, инсульт остается основной медико-социальной проблемой неврологии. Последовательно проведенная реабилитация может свести к минимуму и даже совсем избежать неврологических последствий инсульта.

Цель исследования

Выявить частоту смертельных исходов при моделировании тотальной гипоксии головного мозга у крыс в зависимости от пола, стрессоустойчивости и состояния когнитивных функций.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проводился на 108 крысах обоего пола (60 самцов и 48 самок), массой 180-200 грамм, линии Wistar, возраст 3 месяца, содержащихся в группах по 5 особей, в стандартных условиях вивария. Опыты проводили в весенние месяцы: март - апрель.

Эксперимент выполнен в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), а также в соответствии с требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 11.10.1983 г., №267 МЗ РФ от 19.06.2003г.

В качестве модели острого нарушения мозгового кровообращения по типу ишемического инсульта в работе использована двухсторонняя перевязка обеих общих сонных артерий. Операция проводилась под кратковременным внутривенным наркозом золетилом, из расчета 20-40 мг на кг массы подопытного животного, который вводили за 40 минут до начала моделирования. После моделирования за животными наблюдали на протяжении 35 суток.

Перед проведением моделирования нарушения мозгового кровообращения оценивали ориентировочно-исследовательское поведение животных с помощью теста «открытое поле».

«Открытое поле» представляло собой хорошо освещенную камеру 1 м в длину и 1 м в ширину, с высотой стенок 0,5 м, из белого пластика, дно которой было расчерчено на 16 равных квадратов. Крыс помещали в левый угол камеры и в течение 3 мин фиксировали элементы поведения (паттерны): показатель горизонтальной двигательной активности (количество пробежек и число пересеченных квадратов), показатель вертикальной двигательной активности (число вертикальных стоек), определяли латентное время первого движения и латентное время выхода в центр «открытого поля». Уровень дефекации определяли по числу болюсов, оставленных животным во время пребывания в

экспериментальной установке. Определяли число актов груминга. Далее рассчитывали интегральный индекс активности (ИА) [4] по формуле $ИА = GA/ЛП + ЛПц$, где GA – горизонтальная активность, ЛП – латентный период первого перемещения и ЛПц – латентный период выхода в центр поля. На основе показателей поведения в «открытом поле» крысы были разделены на активных и пассивных, в зависимости от индивидуальных значений ИА. Активные животные – прогностически более устойчивы к действию стрессорных нагрузок, пассивные – обладают низкой резистентностью функций организма к стрессорным нагрузкам.

Для оценки состояния когнитивных функций головного мозга (способности к пространственному обучению) использовался тест – водный лабиринт Морриса. Лабиринт представляет собой круглый бассейн диаметром 1,5 м и высотой 0,7 м. На 0,4 м бассейн заполнен замутненной крахмалом водой, температура воды +26-+28°C. На дне бассейна на глубине 1,5 см от поверхности воды располагается невидимая для животного «безопасная платформа» диаметром 10 см. В помещении, где располагается лабиринт, находятся стационарные зрительные ориентиры. В настоящей работе использовалась укороченная (в одном сеансе) версия теста Морриса [6]. Максимальная длительность пробы составила 5 мин. В первый раз животное отпускают в воду у стенки бассейна и включают секундомер, продолжительность попытки – 2 минуты. При первой попытке оно начинает хаотично плавать по бассейну, пока случайным образом не обнаружит на платформу. Регистрируется время, необходимое крысе для достижения платформы. По истечении времени тестирования если животное не находило платформу, экспериментатор помогал ему. Для того чтобы осмотреться и сориентироваться в пространстве (по внешним ориентирам) крыса оставалась на платформе на 20 секунд. После этого животное снимали с платформы и повторно погружали в воду из того же места, что и в первой попытке, засекали время нахождения платформы во второй попытке. Третья попытка проводилась также как вторая. Время четвертой попытки увеличивали до 5 минут. С увеличением количества попыток время прохождения лабиринта сокращалось, что указывает на формирование пространственной памяти. Когнитивные функции у животных оценивались на основании динамики времени достижения платформы в тесте.

После проведения тестирования животные были распределены по стрессоустойчивости на две группы: первую группу составили стрессоустойчивые (48 животных), вторую группу – стрессонеустойчивые (47 животных). По уровню развития когнитивных процессов так же на две группы: с высокими (49 животных) и низкими (46 животных) когнитивными функциями.

Статистическая обработка данных по летальности животных проводилась с помощью пакета программ Statistic for Windows 6.0. Для оценки достоверности различий между

группами использован критерий χ^2 Пирсона, с поправкой Йейтса для малых выборок – непараметрический метод, который позволяющий оценить значимость различий между фактическим количеством исходов, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы об отсутствии влияния фактора.

Результаты исследования и их обсуждение

При моделировании нарушения мозгового кровообращения всего погибло 40 животных, на операционном столе 13 животных (32,5% от всех смертельных исходов), которые в дальнейшем анализе не рассматривались. После операции погибло 27 крыс (67,5%), в первые сутки летальность составила 13 (48,1%) животных, со 2 по 6 сутки – 5 (18,5%) крыс, на 7-8 день – 3 (11,1%) крысы, с 9 по 14 сутки – 2 (7,4%) животных, в более поздние постоперационные сроки на 15-21 сутки – 3 (11,1%) животных и с 22 по 28 день – 1 (3,7%) крыса. Клинические наблюдения показывают, что смертельный исход при инсульте чаще наступает в первые несколько суток, что в основном связано с прогрессированием отёка. Суть ишемического повреждения мозговой ткани состоит в запуске быстрого глутамат-кальциевого каскада: глутаматовая стимуляция приводит к истощению пула АТФ и перегрузке клеток кальцием. Далее происходит практически полная деполяризация мембран клеток и фазный спазмом мелких сосудов, ведущий к увеличению очага некроза. Последний этап глутаматно-кальциевого каскада завершается смертью нейрона в результате активации ряда внутриклеточных ферментов: фосфолипаз, эндонуклеаз и протеинкиназ, и запуска процессов перекисного окисления липидов [10].

Мы не обнаружили гендерных особенностей общей смертности животных после моделирования глобальной ишемии головного мозга (погибло 12 самцов и 15 самок). Не было выявлено достоверных отличий и по количеству летальных исходов как в острый постинсультный период (8 самцов и 10 самок), так и в отдаленные сроки после операции (4 самца и 5 самок).

Проанализировав смертность животных после моделирования острого нарушения мозгового кровообращения в зависимости от устойчивости их к стрессовым нагрузкам, нами установлено, что количество погибших стрессонеустойчивых крыс было значительно больше, чем стрессоустойчивых (17 животных против 10). В первые шесть суток после двусторонней окклюзии сонных артерий, число погибших неустойчивых к стрессу животных в 2,5 раза больше, чем устойчивых (13 против 5). В дальнейшем различия летальности между группами устойчивых и неустойчивых к стрессу животных нивелируются (табл. 1).

Таблица 1

Летальность животных в условиях окклюзии сонных артерий в зависимости от устойчивости к действию стрессорных нагрузок

Показатель	Дни после операции					
	1	2-6	7-8	9-14	15-21	22-28
Число погибших стрессоустойчивых крыс	4 (8%)	1 (2%)	2 (5%)	1 (2%)	2 (5%)	0 (0%)
Число погибших стрессонеустойчивых крыс	9 (19%)*	4 (10,5%)*	1 (3%)	1 (3%)	1 (3%)	1 (3%)
Всего стрессоустойчивых животных	48	44	43	41	40	38
Всего стрессонеустойчивых животных	47	38	34	33	32	31

*– различия достоверны ($p < 0,05$) между количеством погибших стрессоустойчивых и стрессонеустойчивых животных (критерий χ^2 Пирсона)

Известно, что при схожих изменениях сосудистого русла и мозговой ткани возможны различные варианты течения цереброваскулярной недостаточности [7]. Это связано, по-видимому, с различным уровнем компенсаторных возможностей и стрессоустойчивости организма. В работе В.В. Алферовой с соавторами (2011) доказывается необходимость оценки индивидуальных компенсаторных возможностей организма в остром и восстановительном периодах инсульта. При этом подчеркивается ведущая роль нейрогуморальных механизмов в реализации компенсаторно-приспособительных реакций [1].

Имеются многочисленные экспериментальные данные, указывающие на связь силы переживаемого стресса и ишемии мозга. Так, было показано, что особи, характеризующиеся активным типом поведения в открытом поле, в меньшей степени подвержены развитию осложнений при цереброваскулярной патологии [2]. В то же время снижение эффективности центральных механизмов регуляции артериального давления и реактивности крупных артерий мозга у обладающих низкой стрессоустойчивостью животных, приводит к неблагоприятному исходу последующего ишемического инсульта [3].

Оценка влияния уровня развития когнитивных функций на выживаемость крыс, подвергшихся необратимой окклюзии общих сонных артерий головного мозга, показала, что в острейший период (1 сутки) развития ишемического инсульта у крыс с высоким уровнем развития когнитивных функций погибло в 6 раз больше (11 против 2). В острый период и последующие две недели значимых отличий числа летальных исходов у животных с высокими и низкими когнитивными функциями не наблюдалось. Однако в более отдаленные сроки (с 15 по 21 сутки) была отмечена достоверно более высокая летальность в группе с высокими когнитивными способностями (Табл. 2).

Таблица 2

Летальность животных в условиях окклюзии сонных артерий в зависимости от развития когнитивных функций

Показатель	Дни после операции					
	1	2-6	7-8	9-14	15-21	22-28
Число погибших крыс с высокими когнитивными функциями	11 (22%)	3 (8%)	1 (3%)	2 (6%)	3 (9%)	0 (0%)
Число погибших крыс с низкими когнитивными функциями	2 (4%)*	2 (5%)	2 (5%)	0 (0%)	0 (0%)*	1 (3%)
Всего крыс с высокими когнитивными функциями	49	38	35	34	32	29
Всего крыс с низкими когнитивными функциями	46	44	42	40	40	40

*– различия достоверны ($p < 0,05$) между количеством погибших животных с высоким и низким уровнем когнитивных процессов (критерий χ^2 Пирсона)

При ишемическом повреждении в мозговой ткани формируется нарастающий дисбаланс между тормозными и возбуждающими нейротрансмиттерными системами. Этот дисбаланс в первую очередь связан с угнетением системы ГАМК, который проявляется уже в первые минуты формирования ишемического очага. При ишемии происходит увеличение содержания ГАМК, это повышение также является следствием прироста внутриклеточного глутамата. По мере активации систем энергообеспечения содержание ГАМК снижается вследствие усиления ее утилизации в реакциях ГАМК-шунта. Таким образом, этот шунт представляет собой эффективный компенсаторный механизм распределения пулов и функцию субстратов в процессе метаболизма в мозговой ткани. По-видимому, от соотношения между потоками метаболитов зависит степень повреждающего действия ишемии на мозг. Известно, что ГАМК-ергическая система (уровни ферментов синтеза и деградации, ГАМК-рецепторы разных типов и их распределение по отделам мозга) участвует и в определении когнитивных способностей животных. Возможно, что «включенность» ГАМК-ергических нейронов в системы, обеспечивающие когнитивное поведение [9] может быть причиной разной выживаемости при гипоксии, вызванной двусторонней окклюзией общих сонных артерии.

Многочисленные исследования показывают, что ведущая роль в адаптационно-компенсаторных реакциях структур головного мозга принадлежит глиальным клеткам. Взаимодействие между нейронами и астроглией является важным условием поддержания структурно-функциональной целостности ЦНС и имеет важное значение в нейрорегенераторных процессах, определяя морфологические основы когнитивных функций [8].

Заключение

Таким образом, состояние высшей нервной деятельности у крыс может оказывать значимое влияние на адаптационно-приспособительные процессы на фоне тотальной гипоксии

головного мозга, более выраженные в ранние сроки. Высокая стрессоустойчивость организма уже в острейший и острый периоды экспериментального ишемического инсульта головного мозга обеспечивает формирование более адекватного комплекса структурно-функциональных перестроек. В тоже время, высокий исходный уровень развития когнитивных способностей сопровождается более высокой летальностью. Животные этой группы в отличие от крыс с низкой стрессоустойчивостью характеризовались двумя интервалами достоверно высокой смертности (в первые 24 часа и на протяжении третьей недели эксперимента).

Список литературы

1. Алферова В. В., Узбеков М. Г., Мисионжник Э. Ю. и др. Клиническое значение гуморальных компенсаторных реакций в остром периоде ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. — 2011. — № 8. — С. 36-40.
2. Ганнушкина И. В., Коплик Е. В., Антелава А. Л. и др. Особенности мозгового кровотока у крыс с различной устойчивостью к эмоциональному стрессу / Руководство по реабилитации лиц, подвергшихся стрессорным нагрузкам [Под ред. В. И. Покровского]. — М.: Медицина, 2004. — С. 370-380.
3. Конорова И. Л., Мацневский Д. Д. Снижение коллатерального цереброваскулярного резерва при эмоциональном стрессе ухудшает исход последующего ишемического инсульта в эксперименте // Материалы X Всерос. съезда неврологов с междунар. участием. — Нижний Новгород, 2012. — С. 91.
4. Коплик Е. В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу // Вестник новых медицинских технологий. — 2002. — Т. IX, № 1. — С. 16-18.
5. Криштоп В.В., Пахрова О. А., Стрельников А. И. Основы системной гемореологии. Иваново / Ивановская государственная медицинская академия, 2015, 128 с.
6. Подольский И. Я., Щеглов И. В. Влияние подавления синтеза белка в центральной нервной системе на формирование долговременной памяти при решении некоторых поведенческих задач // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова,— 2004.—№ 1.—С. 59-67.
7. Allers M. A new method of selective, rapid cooling of the brain: An experimental study // Cardiovasc. Intervent. Radiol. — 2006. — V.29. — P. 260-263.
8. Fields R. Douglas. Myelination: An Overlooked Mechanism of Synaptic Plasticity? // Neuroscientist. —2005.—V.11, № 5. —P. 528–531.

9. Prut L., Prenosil G., Willadt S. et al. A reduction in hippocampal GABAA receptor alpha5 subunits disrupts the memory for location of objects in mice // *Genes Brain Behav.* —2010. —V.9, № 5. —P. 478-488.
10. Ted Weita Lai, Shu Zhang, Yu Tian Wang. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection // *Progress in Neurobiology.*— 2014.— № 115.— P. 157-188.

Рецензенты:

Ястребцева И.П., д.м.н., профессор кафедры неврологии и нейрохирургии, ГБОУ ВПО ИвГМА Минздрава России, г. Иваново;

Маслюков П.М., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой, ГБОУ ВПО ЯГМУ Минздрава России, г. Ярославль.