

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЫРАЖЕННОСТИ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА У КРЫС С ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ГЕНЕЗА И СОПУТСТВУЮЩЕЙ ГИПОКСИЕЙ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ

Инчина В.И.¹, Коробков Д.М.¹, Петрунин А.О.¹

¹*Национальный исследовательский Мордовский государственный университет, Саранск, e-mail: v.inchina@ya.ru*

Головной мозг – уникальный орган, обладающий интенсивным метаболизмом, не имея при этом собственных энергетических запасов. Главным субстратом образования энергии для мозга является глюкоза. Системная мозговая циркуляция осуществляет доставку глюкозы, обеспечивая метаболизм мозга. У лиц с черепно-мозговой травмой тяжелой степени зачастую причиной смерти становится сопутствующее ишемическое повреждение головного мозга. К настоящему времени изучение механизмов травм и их лечения достигло колоссальных успехов, однако многие аспекты остаются не изученными, поэтому исследования в этой области остаются по-прежнему актуальными. В ходе эксперимента мы изучали особенности неврологического дефицита у крыс при черепно-мозговой травме с сопутствующей гипоксией. Результаты нашего исследования показали, что 30-минутный период острой нормобарической гипоксической гипоксии с гиперкапнией не вызывает неврологического дефицита. Комбинация гипоксии и черепно-мозговой травмы статистически значимо ведет к стойким неврологическим нарушениям, чем просто черепно-мозговая травма. Представленная модель ЧМТ с нормобарической гипоксической гипоксией с гиперкапнией поможет улучшить представление о механизмах развития посттравматических изменений, а также, возможно, может оказаться полезной в оценке эффективности фармакологической коррекции травм головного мозга в эксперименте.

Ключевые слова: неврологический дефицит, черепно-мозговая травма, гипоксия, гиперкапния, ишемия.

STUDYING THE PECULIARITIES OF THE EXPRESSION OF NEUROLOGICAL DEFICIENCY IN RATS WITH A CEREBRAL PATHOLOGY OF TRAUMATIC GENESIS AND RELATED HYPOXIA IN ACUTE PERIOD

Inchina V.I.¹, Korobkov D.M.¹, Petrunin A.O.¹

¹*National Research Mordovia State University, Saransk, e-mail: v.inchina@ya.ru*

The brain is a unique organ with an intense metabolism. The main substrate of energy production for the brain is glucose. Systemic cerebral circulation is a glucose delivery, brain metabolism. A severe degree, often leading to death, is accompanied by ischemic brain damage. However, many aspects remain unstudied, and therefore research in this area remains relevant. During the experiment, we studied the characteristics of neurological deficiency in rats with traumatic brain injury with concomitant hypoxia. The results of our study showed that a 30-minute period of acute normobaric hypoxic hypoxia with hypercapnia does not cause a neurological deficit. The combination of hypoxia and traumatic brain injury, statistically significantly leads to persistent neurological disorders than just a brain injury. The presented TBI model with normobaric hypoxic hypoxia with hypercapnia will help to improve the understanding of the mechanisms of development of post-traumatic changes, and may also be useful in assessing the effectiveness of the pharmacological correction of brain injuries in the experiment.

Keywords: neurological deficit, traumatic brain injury, hypoxia, hypercapnia, ischemia.

Головной мозг – уникальный орган, обладающий интенсивным метаболизмом, при этом не имеет собственных энергетических запасов. Главным субстратом образования энергии для мозга является глюкоза. Утилизация глюкозы в основном происходит в результате аэробного гликолиза, поэтому для нормальной работы мозга необходимо стабильное поддержание напряжения кислорода в крови. Системная мозговая циркуляция осуществляет доставку глюкозы, обеспечивая метаболизм мозга. Гипоксия и гипотония приводят к увеличению смертности лиц с тяжелой черепно-мозговой травмой (ЧМТ). По

данным статистики, летальность у лиц с ЧМТ средней степени тяжести варьирует от 1,5 до 4%, и в случае утяжеления летальность достигает 60–70%. На сегодняшний день в Российской Федерации заболеваемость ЧМТ, по данным Минздрава, составляет 4‰. У лиц с черепно-мозговой травмой тяжелой степени зачастую причиной смерти становится сопутствующее ишемическое повреждение головного мозга [1, с. 102086]. Факторы, которые могут способствовать ишемическому повреждению головного мозга, включают анемию, гипоксию, гипотензию, повышенное внутричерепное давление, дислокацию мозга, спазм мозговых артерий вследствие субарахноидального кровоизлияния, длительные судорожные припадки и сердечно-легочную недостаточность. Наличие гипоксии ($P_{O_2} < 60$ мм рт. ст.), гипотонии (систолическое артериальное давление < 90 мм рт. ст.) и гиперкапнии ($PCO_2 > 45$ мм рт. ст.) коррелирует с наступлением коматозных состояний в 37, 16 и 8% случаев соответственно [2, с. 7115]. К настоящему времени изучение механизмов травм и их лечения достигло колоссальных успехов, однако многие аспекты остаются не изученными, поэтому исследования в этой области остаются по-прежнему актуальными.

Целью нашего исследования было изучение особенностей неврологического дефицита у крыс при черепно-мозговой травме с сопутствующей гипоксией в 1-е сутки с момента повреждения.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 40 нелинейных белых крысах обоего пола массой 250-300 г. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [3]. Животным проводилось анестезиологическое пособие, включающее интраперитонеальное введение препаратов: «Золетил 100» (из расчета 8 мг/кг) и «Ксилазин» (из расчета 0,5 мл/кг). Модель острой нормобарической гипоксической гипоксии с гиперкапнией заключалась в помещении каждого животного в герметичный контейнер объёмом 1 л на 30 мин. [4, с. 16]. Моделирование черепно-мозговой травмы (ЧМТ) наркотизированным животным проводилось по следующей методике: в надорбитальной области слева над черепом производился разрез кожи, мышцы отделялись от кости, костная ткань очищалась от крови, стоматологическим бором производилось высверливание трепанационного окна диаметром 5 мм (локализация отверстия – на 5 мм ростральнее и 2,5 мм медиальнее брегмы). Устанавливался ударник, затем на ударник оказывал воздействие свободнопадающий груз в металлической трубке с заданной энергией, равной 0,07 Дж. После чего трепанационное окно закрывалось цементом для пломбирования, кожа подшивалась. Животные были разделены на четыре группы: группа 1 - только гипоксия ($n = 10$); группа 2 - только ЧМТ ($n =$

10); группа 3 – гипоксия +ЧМТ (n = 10), а также контрольная группа (n=10) – животные в этой группе не подвергались оперативным вмешательствам.

На аппаратном комплексе ВЮРАС проводилось измерение парциального давления кислорода (P_{O_2}), углекислого газа (PCO_2) и среднего артериального давления в соответствии со стандартными методиками [5]. С целью оценки выраженности неврологического дефицита в 1-е сутки были применены тесты: «Открытое поле», «Стимулирование конечностей», «Приподнятый крестообразный лабиринт» [6] и тест Rota rod для оценки моторной координации (при постоянной скорости вращающего стержня $V=20$ об/мин.). В тесте Rota-rod мы фиксировали временной период 1-го падения животного со стержня и суммарное время удержания по результатам 3 попыток. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0. Был применен параметрический t-критерий Стьюдента и критерий Манна-Уитни. Результаты представлены следующим образом, $M \pm m$ (M - среднее, m - ошибка среднего). Различия принимались за статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

До начала эксперимента контрольный уровень среднего артериального давления был равен $102,24 \pm 11,76$ мм рт. ст., $p < 0,05$. Нанесение черепно-мозговой травмы вызывало апноэ в течение 15–45 секунд в группе животных № 2, что сопровождалось статистически значимым повышением САД на 23%, $p < 0,05$. В условиях травматического повреждения головного мозга, при котором происходит выброс биологически активных пептидов, возникают различные эффекты, в т.ч. и вазоактивные. В группе № 2 САД достигло контрольного уровня через 1,5 часа после травмы. На данном примере можем увидеть, что нарастающая гиперактивность протеолиза при повреждении мозговой ткани, как триггер системного воспалительного ответа, протекает с высвобождением вазодилатирующих веществ из разрушенных клеток и приводит к нарушению кровообращения. Прогрессирующие ишемические изменения быстро затрагивают и непораженные участки мозговой ткани, так, у крыс в группе № 3 САД статистически значимо снижалось до уровня $81,31 \pm 15,21$ мм рт. ст., $p < 0,05$, в течение всего периода гипоксии.

Ключевой показатель обмена веществ – потребление кислорода. Динамика изменений индикаторов кислородтранспортной функции, собственно, и позволяет определить характер метаболических сдвигов, что особенно важно в условия нашего эксперимента. Анализ результатов показал, что во всех группах достижение нормоксии сопровождалось стабилизацией САД. Уровень P_{O_2} и PCO_2 в контрольной группе составляли $87,4 \pm 6,2$ и $38,5 \pm 4,2$ мм рт. ст. соответственно, $p < 0,05$. Уровень потребления кислорода отражает степень тяжести состояния, особенно это актуально в условиях травматического шока. В группе

животных № 2 статистически значимое снижение P_{O_2} на 36% до уровня $55,8 \pm 3,1$ мм рт. ст., $p < 0,05$, возможно, обусловлено нарушением адекватной тканевой перфузии. Нами установлено, что нанесение контролируемого ударного повреждения в сенсомоторную область через трепанационное окно у крыс приводит к стойкому неврологическому дефициту, наиболее выраженные клинические проявления отмечаются в первые 24 часа с момента повреждения (табл. 1).

Таблица 1

Поведенческие показатели у крыс в тесте «Открытое поле» совместно с показателями САД, P_{O_2} , PCO_2

Показатель	1 сутки			
	Контроль (n=10)	1 группа. Гипоксия (n=10)	2 группа. ЧМТ (n=10)	3 группа. Гипоксия +ЧМТ (n=10)
Тест «Открытое поле»				
Время в центре, с	3,3±0,51	3,03±0,17*	1,5±0,73*	0,5±0,1
Число пересеченных квадратов, шт.	12,9±1,33	12,3±1,45*	7,3±2,2	5,9±0,5*
Число дефекаций, шт.	1,7±0,75	1,6±0,7	1,9±0,4*	2,3±0,5*
Число уринаций, шт.	0,5±0,55	0,4±0,5	0,2±0,1	0,1±0,1
Время груминга, с	6,3±1,55	5,4±1,07*	3,4±1,5	0,7±0,67*
Число вертикальных стоек, шт.	4,1±0,65	3,9±0,6*	2,89±0,6*	1,8±0,8
Число заглядываний, шт.	3,2±0,46	3,3±0,5	2,6±0,2*	1,5±0,5*
Время обнюхивания, с	151,2±2,97	156,12±3,62*	174,5±8,23*	186,12±11,62*
САД, мм рт. ст.	102,24 ± 11,76	82,57 ± 9,96*	123,45 ± 17,04*	81,31 ± 7,21*
P_{O_2} , мм рт. ст.	87,4 ± 6,2	74,9 ± 7,2*	55,8±3,1*	42,7±3,2*
PCO_2 , мм рт. ст.	38,5 ± 4,2	43,5 ± 5,2*	48,8±8,0*	59,5 ± 4,2*

Примечание: * - статистическая значимость отличия по отношению к показателям группы контроля при $p < 0,05$.

У животных в 3-й группе выраженность неврологического дефицита напрямую связана с нарастанием расстройств в моторной и рефлекторной сферах. Большинство животных из этой группы находились в состоянии ступора, сохранялся экзофтальм и отсутствие фотореакции. Время груминга у животных 3-й группы было статистически значимо ниже на 90% в сравнении с группой контроля, $p < 0,05$, а у 10% животных груминг отсутствовал, отмечено выраженное брадикапноэ и нарастание гипоксии (цианоз конечностей). Зафиксированная нами переходящая артериальная гипотензия после травмы головного мозга приводит к вазодилатации, повреждению эндотелия, нарушению метаболизма в мышечной стенке сосудов головного мозга, что в свою очередь снижает чувствительность сосудов к гипотонии, гипоксии и гиперкапнии.

В тесте Rota rod в группах животных № 2 и № 3 зафиксировано проявление нарушений координации и силы (табл. 2). Статистически значимое снижение латентного периода 1-го падения у грызунов в группе № 3 составило уровень в $11 \pm 0,97$ секунды, $p < 0,05$. Менее выраженные изменения были выявлено у грызунов в группе № 1 (гипоксия).

Таблица 2

Время удержания животных на вращающемся стержне в тесте Rota rod

Группа Показатель	Контроль (n=10)	1 группа. Гипоксия (n=10)	2 группа. ЧМТ (n=10)	3 группа. Гипоксия +ЧМТ (n=10)
Время удержания на вращающемся стержне за 1 попытку, с	$79 \pm 2,67$	$65 \pm 7,46$	$37 \pm 2,54^*$	$11 \pm 0,97^*$
Время удержания на вращающемся стержне за 3 попытки, с	$165 \pm 5,34$	$135 \pm 4,78^*$	$71 \pm 2,87^*$	$44 \pm 2,05^*$

Примечание: *- статистическая значимость отличия по отношению к показателям группы контроля при $p < 0,05$.

В тесте «Стимулирование конечностей» показатели группы № 1 имели лучшие результаты, практически не имели выраженных двигательных нарушений передних и задних конечностей, двигательные функции конечностей восстановились в полном объеме спустя 1 час (табл. 3).

Таблица 3

Результаты теста «Стимулирование конечностей»

Показатель	1 сутки			
	Контроль (n=10)	1 группа. Гипоксия (n=10)	2 группа. ЧМТ (n=10)	3 группа. Гипоксия +ЧМТ (n=10)
Тест «Стимулирование конечностей», балл	$14,00 \pm 0,00$	$12,00 \pm 0,00^*$	$4,3 \pm 0,57^*$	$0,9 \pm 0,1^*$

Примечание: *- статистическая значимость отличия по отношению к показателям группы контроля при $p < 0,05$.

Все крысы реагировали на защемление хвоста легким движением конечности перед травмой. Травматическое повреждение приводило к кратковременной ригидности конечностей. Только у 20% крыс с ударной травмой спустя 6 часов с момента травмы было выявлено сгибание передних конечностей, на противоположной стороне тела относительно участка повреждения.

Первым признаком восстановления после удара было спонтанное дыхание, которое возобновлялось в течение 60 секунд после удара. Неврологический дефицит был более

Контроль (n=10)	4,3 ±0,21	4,7 ±0,29	110,8 ±4,95	145,4± 6,41	-	4,21 ±0,31	-	7,63 ±0,43
1 группа. Гипоксия (n=10)	3,9 ±0,43	6,5 ±0,49	93,8 ±7,94*	155,4± 7,46*	-	4,29 ±0,43	-	5,63 ±0,56*
2 группа. ЧМТ (n=10)	2,1±1,07 *	5,3±1,5 7*	103,8 ±8,94*	165,4± 9,4	-	5,21 ±0,43*	-	2,7 ±0,71*
3 группа. Гипоксия +ЧМТ (n=10)	2,3 ±0,2*	5,9 ±0,2*	53,8 ±7,9*	185,4± 7,2*	-	6,87 ±0,43*	-	1,09 ±0,3*

Примечание: *- статистическая значимость отличия по отношению к показателям группы контроля при $p < 0,05$.

Период нахождения в темных отсеках лабиринта и количество заходов в них характеризуется как тревожное расстройство, возможно, данные реакции обусловлены сочетанным влиянием стрессовой ситуации и травматического повреждения головного мозга.

Оценка неврологического дефицита при черепно-мозговой травме у крыс позволяет предположить, что ранняя гипоксия значительно ухудшает исход после повреждения головного мозга. Травма, вызванная ударным повреждением, сильно ослабляет способность мозгового кровотока компенсаторно увеличиваться во время гипоксии; это нарушение продолжает сохраняться в течение нескольких часов с момента возникновения ЧМТ. Наличие гипотонии (САД у животных в группе № 3 $81,31 \pm 7,21$ мм рт. ст., $p < 0,05$) во время гипоксии, возможно, способствует прогрессирующему ишемическому повреждению, хотя только нормобарическая гипоксическая гипоксия с гиперкапнией не вызывает стойкого неврологического дефицита. При черепно-мозговой травме в условиях нормобарической гипоксической гипоксии с гиперкапнией происходит активация анаэробного гликолиза. Анаэробный гликолиз, как 1-й этап патологической реакции, сопряжен с метаболическим ацидозом, способствует формированию локальных участков инфаркта мозга. Скорость метаболических процессов и ионного транспорта в условиях ацидоза снижается до минимума. Ионный гомеостаз клеток и процессы окисления энергетических субстратов нарушены и вызывают «субстратный голод». В условиях «субстратного голода» и энергодефицита (прекращение окислительного фосфорилирования) инициируется процесс накопления Ca^{2+} в клетке и отток K^{+} из клетки, и собственно запуск механизмов запрограммированной клеточной гибели нейронов, что и объясняет вышеописанные нарушения.

Заключение

Гипоксия диагностируется у 30-50% пациентов, поступивших в медицинские организации с диагнозом черепно-мозговая травма тяжелой степени, с последующим

развитием комы, а ишемизированные участки головного мозга были обнаружены более чем у половины пациентов с ЧМТ, несовместимой с жизнью [1]. Результаты нашего исследования показали, что 30-минутный период острой нормобарической гипоксической гипоксии с гиперкапнией не вызывает стойкого неврологического дефицита. Комбинация гипоксии и черепно-мозговой травмы статистически значимо ведет к стойким неврологическим нарушениям, чем просто черепно-мозговая травма. Представленная модель ЧМТ с нормобарической гипоксической гипоксией с гиперкапнией поможет улучшить представление о механизмах развития посттравматических изменений, а также, возможно, может оказаться полезной в оценке эффективности фармакологической коррекции травм головного мозга в эксперименте.

Список литературы

1. Amyot F., Kenney K., Spessert E., Moore C., Haber M., Silverman E., Gandjbakhche A., Diaz-Arrastia R. Assessment of cerebrovascular dysfunction after traumatic brain injury with fMRI and fNIRS. *Neuroimage Clinical*. 2020. vol. 25. P. 102086. DOI: 10.1016/j.nicl.2019.102086.
2. Patchana T., Wiginton J. 4th, Brazdzionis J., Ghanchi H., Zampella B., Toor H., Dorkoski R., Mannickarottu A., Wacker M., Sweiss R., Miulli D.E. Increased Brain Tissue Oxygen Monitoring Threshold to Improve Hospital Course in Traumatic Brain Injury Patients. *Cureus*. 2020. vol. 27. no.12. P. 7115. DOI: 10.7759/cureus.7115.
3. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS № 123). Appendix A - Guidelines for accomodation and care of animals (Article 5 of the Convention). [Электронный ресурс]. URL: <http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/PDF/123-Arev.pdf> (дата обращения: 11.04.2020).
4. Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств: метод. рекомендации МР 21.44 – 2017 // М-во здравоохранения РФ (Минздрав России), Федер. медико-биол. агентство (ФМБА России); исп. Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов [и др.]. М., 2017. 98 с.
5. Reference Manual for AcqKnowledge® 4.4 Software & MP150/MP36R, BioHarness, B-Alert Mobita or Stellar Hardware/Firmware on Windows® 10, 8, 7 or Vista, or Mac OS® X 10.5-10.9 [Электронный ресурс]. URL: https://www.biopac.com/wp-content/uploads/BSL-PRO-3_7-Manual.pdf (дата обращения: 20.04.2020).
6. Сысоев Ю.И., Дагаев С.Г., Кубарская Л.Г., Гайкова О.Н., Узуегбунам Б.Ч., Модисе К., Маквана Т.Л., Оковитый С.В. Нейропротекторная активность агониста альфа-2

адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс // Биомедицина.
2019. Т. 15. №1. С. 62-77.