

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НА НЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ ДЕФИЦИТ ПРЕВЕНТИВНОГО ВВЕДЕНИЯ ИНСУЛИНА НА МОДЕЛИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Инчина В.И.<sup>1</sup>, Ерина М.С.<sup>1</sup>, Носирова Ш.А.<sup>1</sup>, Гурская О.А.<sup>1</sup>, Айтмухамбетов Э.Р.<sup>1</sup>, Киржиманов А.С.<sup>1</sup>, Рахманова С.А.<sup>1</sup>, Тарасова Е.А.<sup>1</sup>, Лебасова А.А.<sup>1</sup>, Ендолова Т.А.<sup>1</sup>, Дидяева В.О.<sup>1</sup>, Чаров Д.А.<sup>1</sup>, Емельянов А.А.<sup>1</sup>, Кошманова Я.С.<sup>1</sup>

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

На сегодняшний день по-прежнему не до конца ясно, как влияет превентивное введение инсулина на неврологический дефицит в условиях церебральной ишемии. Это обусловило проведение данного исследования. Цель исследования: оценить влияние на неврологический дефицит превентивного введения инсулина на модели церебральной ишемии у крыс в эксперименте. В эксперимент были включены 64 нелинейных белых крыс обоего пола. Животным выполнялась окклюзия средней мозговой артерии. У животных в 1-й группе неврологический дефицит был обусловлен нарастанием расстройств преимущественно в моторной и рефлекторной сферах, а также расстройств чувствительности. При анализе общей выживаемости в группах животных № 2, № 3, № 4 максимальная выживаемость отмечена в группе животных, получавших инсулин короткого действия в дозировке 1,7 ЕД/кг массы тела, затем она уменьшилась по мере увеличения дозы инсулина. В нашем исследовании мы постарались показать, что умеренная гипогликемия и/или нормогликемия в условиях церебральной ишемии оказывает нейропротективное действие. Увеличение выживаемости может быть результатом снижения выраженности неврологического дефицита, но мы не исключаем возможные положительные эффекты и на другие системы.

Ключевые слова: неврологический дефицит, инсульт, ишемия, инсулин.

## EVALUATION OF THE EFFECT OF PREVENTIVE INSULIN INTRODUCTION ON NEUROLOGICAL DEFICIENCY IN THE MODEL OF CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS IN THE EXPERIMENT

Inchina V.I.<sup>1</sup>, Erina M.S.<sup>1</sup>, Nosirova Sh.A.<sup>1</sup>, Gurskaya O.A.<sup>1</sup>, Aitmukhambetov E.R.<sup>1</sup>, Kirzhimanov A.S.<sup>1</sup>, Rakhmanova S.A.<sup>1</sup>, Tarasova E.A.<sup>1</sup>, Lebasova A.A.<sup>1</sup>, Endolova T.A.<sup>1</sup>, Didyaeva V.O.<sup>1</sup>, Charov D.A.<sup>1</sup>, Emelyanov A.A.<sup>1</sup>, Koshmanova Ya.S.<sup>1</sup>

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

To date, it is still not completely clear how the preventive administration of insulin affects the neurological deficit in conditions of cerebral ischemia, which actually prompted us to conduct this study. The aim of the study was to evaluate the effect of preventive insulin administration on neurological deficit in the model of cerebral ischemia in rats in the experiment. The experiment included 64 non-linear white rats of both sexes, the animals underwent occlusion of the middle cerebral artery. In animals in the 1st group, the neurological deficit was due to an increase in disorders mainly in the motor and reflex areas, as well as sensitivity disorders. Analyzing the overall survival in groups of animals № 2, № 3, № 4, the maximum survival was noted in the group of animals treated with short-acting insulin at a dosage of 1.7 U/kg of body weight and then decreased as the dose of insulin increased. In our study, we tried to show that moderate hypoglycemia and/or normoglycemia in conditions of cerebral ischemia has a neuroprotective effect. The increase in survival may be the result of a decrease in the severity of neurological deficit, but we do not exclude possible positive effects on other systems.

Keywords: neurological deficit, stroke, ischemia, insulin.

Цереброваскулярные заболевания на сегодняшний день, пожалуй, занимают лидирующие места среди причин, приводящих к стойкой нетрудоспособности и инвалидизации, а как следствие – и к смерти. Доказанным фактом является то, что гипергликемия усугубляет неврологический дефицит в условиях ишемии головного мозга, о

чем свидетельствуют многочисленные клинические наблюдения (у больных сахарным диабетом, перенесших инсульт, исходы значительно хуже, чем у аналогичных пациентов, не имеющих диабета) [1]. В условиях стационара гипергликемия, возникшая в результате экзогенного введения глюкозы, потенциально предотвратима, более сложная ситуация возникает при эндогенном повышении концентрации глюкозы в крови у пациентов с риском ишемического повреждения головного мозга. В современной клинической практике существенно недооцениваются неблагоприятные эффекты гипергликемии в условиях ишемии. Обычно считается, что гипергликемия от легкой до умеренной степени практически безвредна. Теоретически, инсулин можно использовать для поддержания концентрации глюкозы в крови в диапазоне от нормального до нижнего предела нормы и таким способом обеспечить защиту от гипергликемически опосредованных неврологических нарушений.

На сегодняшний день по-прежнему не до конца ясно, как влияет превентивное введение инсулина на неврологический дефицит в условиях церебральной ишемии, это и обусловило проведение данного исследования.

**Цель исследования** – оценить влияние на неврологический дефицит превентивного введения инсулина на модели церебральной ишемии у крыс в эксперименте.

#### **Материалы и методы исследования**

Эксперимент проводился на 64 животных (нелинейных белых крысах обоего пола массой 210–360 г). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [2]. Животным выполнено анестезиологическое пособие (наркоз), включающее интраперитонеальное введение (и/п) препаратов: «Ксилазин» (из расчета 0,5 мл/кг массы тела) и «Золетил 100» (из расчета 8 мг/кг массы тела). Выполнялась респираторная поддержка. На аппаратном комплексе «ВЮРАС» в соответствии со стандартными методиками производился непрерывный мониторинг температуры тела, ЭЭГ, среднего артериального давления. Концентрацию глюкозы в крови определяли с помощью дополнительного модуля-анализатора Super GL compact (Dr. Muller, Германия) по стандартной методике [3, 4]. Затем проводили взятие крови из хвостовой вены в объеме 0,3 мл для определения уровня гликемии перед окклюзией средней мозговой артерии (СМА). Животные были разделены на 4 группы:

1-я группа (n=16) – внутрибрюшинное введение (в/б) 1 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида за 60 минут до окклюзии СМА.

2-я группа (n=16) – внутрибрюшинное введение 0,4 ЕД (1,7 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия («АктрапидНМ») за 60 минут до окклюзии СМА.

3-я группа (n=16) – внутрибрюшинное введение 0,5 ЕД (2,1 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия («АктрапидНМ») за 60 минут до окклюзии СМА.

4-ая группа (n=16) – внутрибрюшинное введение 0,6 ЕД (2,5 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия («АктрапидНМ») за 60 минут до окклюзии СМА.

Затем всем животным выполнялась 45-минутная окклюзия СМА по методике J. Koizumi (1986) [5] с последующей реперфузией. На следующем этапе оценивали неврологический дефицит, подвергая каждую крысу через 1, 4, 18, 24 часа после моделирования окклюзии СМА тестам «Бедерсон-тест» и «Открытое поле» [6, с. 68]. Общую выживаемость оценивали через 26 часов после окклюзии. Для статистической обработки были применены t-критерий Стьюдента и критерий Манна–Уитни. Результаты представлены следующим образом:  $M \pm m$  (M – среднее, m – ошибка среднего). Данные принимались за статистически значимые при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

До начала эксперимента контрольный уровень среднего артериального давления во всех группах животных равен  $112,24 \pm 10,68$  мм рт. ст., статистически значимых различий между группами по данному показателю не выявлено. В группе № 1 зафиксировано увеличение концентрации глюкозы в крови непосредственно перед окклюзией СМА, предположительно это обусловлено дополнительным стрессом, связанным с выполнением анестезиологического пособия и операции интактным животным (табл. 1). У крыс в группе № 2, получивших 0,4 ЕД инсулина короткого действия, концентрация глюкозы в крови была статистически значимо ниже – в 1,46 раза ( $p < 0,05$ ) – в сравнении с крысами из группы № 1 на протяжении 4 часов с момента окклюзии. У одной крысы (6%) в группе животных № 1 в период реперфузии отмечено прогрессирующее снижение артериального давления. Несмотря на проводимую респираторную поддержку, эта крыса умерла через 90 минут с момента окклюзии СМА.

Таблица 1

Концентрация глюкозы в крови и выживаемость у крыс на фоне церебральной ишемии

Группы животных	n	Уровень глюкозы (ммоль/л)				Выживаемость, %
		Исходный уровень глюкозы крови до эксперимента	Уровень глюкозы перед окклюзией СМА	Уровень глюкозы через 1 час после окклюзии СМА	Уровень глюкозы через 4 часа после окклюзии СМА	
Группа № 1 (в/б 1 мл 0,9%-ного р-ра NaCl за 60 минут до окклюзии СМА)	16	$8,06 \pm 0,8$	$11,21 \pm 0,41$	$8,38 \pm 0,57$	$8,69 \pm 0,57$	39%

Группа № 2 (в/б 0,4 ЕД (1,7 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия за 60 минут до окклюзии СМА	16	7,79±0,28	4,63±0,45*	3,40±0,32*	5,01±0,49*	94%
Группа № 3 (в/б 0,5 ЕД (2,1 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия за 60 минут до окклюзии СМА	16	7,89±0,41	3,34±0,34*	2,47±0,35	5,28±1,74	75%
Группа № 4 (в/б 0,6 ЕД (2,5 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия за 60 минут до окклюзии СМА	16	7,88±0,61	2,78±0,33*	2,14±0,24*	4,84±0,43*	0%

Примечание: \* – статистическая значимость отличия по отношению к показателям группы № 1 при  $p < 0,05$ .

Время с момента окклюзии до появления изоэлектрической ЭЭГ колебалось от 20 до 40 секунд, и ЭЭГ оставалась изоэлектрической в течение всего периода окклюзии СМА (рис. 1).

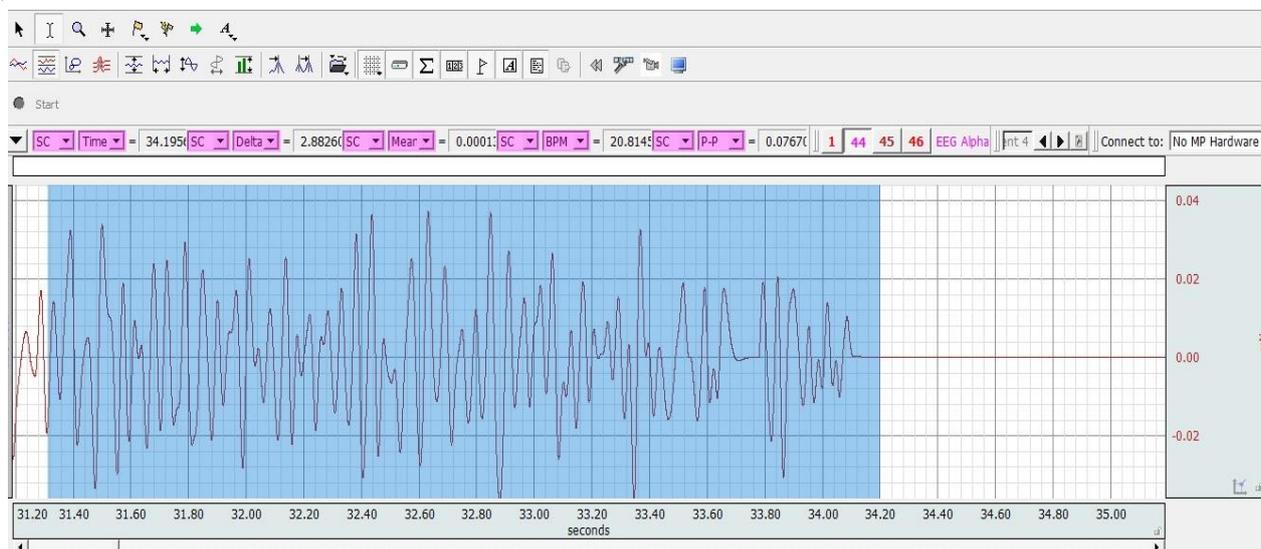


Рис. 1. Пример записи ЭЭГ после окклюзии СМА

У всех 64 животных с момента начала ишемии головного мозга зафиксировано полное расширение зрачка, которое сохранялось на протяжении всего периода окклюзии СМА. Размер зрачка вернулся к норме в течение 1 минуты после снятия лигатуры; на ЭЭГ в период реперфузии не отмечалось никаких патологических «ЭЭГ паттернов». Общая выживаемость через 26 часов после окклюзии была статистически значимо выше у крыс в группе № 2 в сравнении с группой № 1 – в 1,41 раза ( $p < 0,05$ ). В группе животных № 1 количество умерших особей составило 61% ( $n=10$ , с учетом включения крысы, умершей спустя 90 минут с момента окклюзии СМА). Пять крыс из группы животных № 1, несмотря на проведение респираторной поддержки, умерли спустя 120 минут с момента окклюзии; еще 5 крыс из этой же группы скончались спустя 20 часов с момента окклюзии, смерть была обусловлена выраженным судорожным синдромом. Среди животных в группе № 2 у 12 особей из 16 отмечен судорожный синдром в периоде между 17 и 26 часами с момента окклюзии СМА, но ни одна

из этих крыс не умерла. Судорожная активность состояла из пароксизмальных приступов генерализованных тонико-клонических судорог с выраженными беспокойными движениями конечностей. Стоит учесть и тот факт, что введение высоких доз инсулина может привести к чрезмерно низким концентрациям глюкозы в плазме, что, в свою очередь способно негативно сказаться на исходе. При анализе общей выживаемости в группах животных № 2, № 3, № 4 максимальная выживаемость отмечена в группе животных, получавших инсулин короткого действия в дозировке 1,7 ЕД/кг массы тела = 0,4 ЕД (группа № 2), затем она уменьшилась по мере увеличения дозы инсулина. Важным наблюдением является то, что степень гипогликемии во многом обуславливает исход. При увеличении дозы инсулина до 2,1 и 2,5 ЕД/кг массы тела выживаемость снижалась.

Наиболее выраженный неврологический дефицит был отмечен у животных в группе № 1. У животных в 1-й группе неврологический дефицит был обусловлен нарастанием расстройств преимущественно в моторной и рефлекторной сферах, а также расстройств чувствительности (табл. 2).

Таблица 2

Поведенческие показатели у крыс в тесте «Открытое поле» и оценка неврологического дефицита по «Бедерсон-тесту»

Показатель	Спустя 24 часа с момента окклюзии СМА			
	Группа № 1 (в/б 1 мл 0,9%-ного р-ра NaCl за 60 минут до окклюзии СМА)	Группа № 2 (в/б 0,4 ЕД (1,7 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия за 60 минут до окклюзии СМА)	Группа № 3 (в/б 0,5 ЕД (2,1 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия за 60 минут до окклюзии СМА)	Группа № 4 (в/б 0,6 ЕД (2,5 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия за 60 минут до окклюзии СМА)
<b>Тест «Открытое поле»</b>				
Время в центре, с	1,1±0,3	3,02±0,2	2,99±0,4	3,01±0,4
Число пересеченных квадратов, шт.	5,4±0,6	11,3±1,65*	11,3±1,7	10,9±1,98
Время груминга, с	2,1±0,87	3,4±1,4	2,98±0,97	3,02±1,16
Число вертикальных стоек, шт.	1,9±0,9	3,87±0,5	3,99±0,48	3,77±0,41
Число заглядываний, шт.	2,1±0,5	3,7±0,4*	4,21±0,6	3,7±0,5
Время обнюхивания, с	166,42±12,82	146,22±5,92*	158,12±6,62	150,12±7,12
Число дефекаций, шт.	2,9±0,6	1,6±0,7	1,73±0,7	1,6±0,7
Число уринаций, шт.	0,5±0,2	0,4±0,6	0,4±0,45	0,6±0,31

Бедерсон-тест (баллы)				
	2,6±0,47	2,45±0,15*	2,87±0,4	2,71±0,51

Примечание: \* – статистическая значимость отличия по отношению к показателям группы № 1 при  $p < 0,05$ .

Число пересеченных квадратов животными в группе № 2 была статистически значимо выше (на 91,5%) в сравнении с группой животных № 1 ( $p < 0,05$ ). При применении Бедерсон-теста наименее выраженные неврологические нарушения отмечены в группе животных № 2, так, показатели в этой группе были статистически значимо ниже (на 5,7%) в сравнении с группой № 1 ( $p < 0,05$ ). Тотальная церебральная ишемия, вызванная окклюзией СМА, носила временный характер, но, тем не менее, сопровождалась последующим стойким неврологическим дефицитом, который приводит к высокой смертности.

Гипергликемия является одним из факторов, который, как известно, усугубляет повреждение, но точный механизм повреждения, связанный с глюкозой, до конца не изучен. В результате расщепления основного субстрата-глюкозы в условиях гликолиза на фоне интенсивного метаболизма головного мозга происходит накопление лактата в тканях, что, пожалуй, сегодня рассматривается как ключевое метаболическое событие, отягчающее ишемически обусловленный неврологический дефицит. Теоретически гипогликемия легкой степени, вызванная инсулином, может уменьшить доступность глюкозы в качестве субстрата и, следовательно, уменьшить образование лактата, который будет накапливаться в анаэробных условиях ишемии. Несмотря на то что влияние инсулина на нервную ткань остается спорным (бытует точка зрения, что в условиях тотальной ишемии можно ожидать побочных эффектов от введения инсулина из-за локального накопления лактата в нервной ткани на фоне интенсивного расщепления глюкозы), в нашем эксперименте на модели церебральной ишемии инсулин в дозе 1,7 ЕД/кг массы тела оказывает нейропротективное воздействие. У крыс из группы № 2, которым вводили 0,4 ЕД инсулина (1,7 ЕД/кг массы тела), неврологический дефицит был менее выраженным в сравнении с крысами из группы № 1, получавшими раствор натрия хлорида 0,9%-ный 1 мл и/п (табл. 3).

Таблица 3

Сравнение компонентов оценки неврологического дефицита в модели церебральной ишемии у крыс

Компоненты	Через 1 час с момента окклюзии СМА		Через 4 часа с момента окклюзии СМА		Через 18 часов с момента окклюзии СМА		Через 24 часа с момента окклюзии СМА	
	Группа № 1 (в/б 1 мл 0,9%-ного р-ра NaCl за 60 минут до окклюзии СМА)	Группа № 2 (в/б 0,4 ЕД (1,7 ЕД/кг массы тела инсулина короткого действия за 60 минут до окклюзии СМА)	Группа № 1 (в/б 1 мл 0,9%-ного р-ра NaCl за 60 минут до окклюзии СМА)	Группа № 2 (в/б 0,4 ЕД (1,7 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия за 60 минут до окклюзии СМА)	Группа № 1 (в/б 1 мл 0,9%-ного р-ра NaCl за 60 минут до окклюзии СМА)	Группа № 2 (в/б 0,4 ЕД (1,7 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия за 60 минут до окклюзии СМА)	Группа № 1 (в/б 1 мл 0,9%-ного р-ра NaCl за 60 минут до окклюзии СМА)	Группа № 2 (в/б 0,4 ЕД (1,7 ЕД/кг массы тела) инсулина короткого действия за 60 минут до окклюзии СМА)
Сознание	7,7±0,51	6,0±0,48*	6,0±0,71	2,4±0,45#	4,0 ±0,97	0,4±0,21#	4,2±1,2	0,1±0,13#
Двигательная функция	14,7±0,21	14,0±0,41	11,2±0,9	7,6±0,87*	10,3±0,99	4,9±0,41#	9,7±1,1	3,6±0,42#
Функция черепных нервов	2,4±0,97	0,6±0,51	1,8 ±0,8	0±0*	1,5 ± 0,81	0±0*	1,8±0,91	0±0*
Функция позвоночных нервов	2,9±0,37	1,8±0,25*	2,2±0,35	1,4±0,27	1,9 ± 0,39	0,5 ±0,24*	2,3±0,53	0,4±0,21#
Функция дыхания	2,6±1,1	0,1±0,13*	0,2±0,18	0±0	0,5 ±0,28	0±0*	0,7±0,33	0±0*

Примечание: \* – статистическая значимость отличия по отношению к показателям группы № 1 при  $p < 0,05$ .  
# – статистическая значимость отличия по отношению к показателям группы № 1 при  $p < 0,001$ .

Через 1 час после окклюзии в группе № 2, получавшей инсулин, по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор натрия хлорида, количественные аспекты оценки нарушения сознания были менее выражены (табл. 3). Можно предположить, что отсутствие различий в двигательной функции, вероятнее всего, связано со снижением мотивации, поскольку данная закономерность наблюдалась у всех крыс, даже у которых не был отмечен визуально патологический уровень сознания, также снижение реакций может быть связано с остаточными эффектами компонентов наркоза.

### Заключение

В нашем исследовании мы постарались показать, что умеренная гипогликемия в условиях церебральной ишемии оказывает нейропротективное действие. В настоящее время известно несколько механизмов, посредством которых инсулин может оказывать нейропротекцию. Инсулин снижает гликогенолиз и глюконеогенез в печени, а также снижает концентрацию глюкозы в плазме за счет усиления поглощения и усвоения тканями, следовательно, снижается и глюкоза, доступная для метаболизма в головном мозге. С определенной долей вероятности можно сказать, что увеличение выживаемости обусловлено анаболическими эффектами инсулина, которые инициируют гибернацию метаболических процессов в головном мозге, тем самым обеспечивается экономия пластических и питательных субстанций.

### Список литературы

1. Сантикова Л.В., Чипова Д.Т., Жемухов А.Ч., Глапшкова Л.Б. Ранние и отдаленные исходы ишемического инсульта у пациентов с инсульт-ассоциированной пневмонией // Эффективная фармакотерапия. 2021. Т. 17. № 22. С. 6-9.
2. Приложения к европейской конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ets № 123): руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными (статья № 5 конвенции). 2006. [Электронный ресурс]. URL:<http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/PDF/123-Arev.pdf> (дата обращения: 11.12.2022).
3. 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](https://www.biopac.com/wp-content/uploads/BSL-PRO-3_7-Manual.pdf) (дата обращения: 29.11.2022).
4. Инчина В.И., Коробков Д.М., Петрунин А.О. Изучение особенностей выраженности неврологического дефицита у крыс с церебральной патологией травматического генеза и сопутствующей гипоксией в остром периоде // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 3. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29794> (дата обращения: 19.11.2022).
5. Koizumi J. Experimental studies of ischemic brainedema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Japan. Journal of Stroke. 1986. № 8.-P. 1-8.
6. Дайнеко А.С., Шмонин А.А., Шумеева А.В., Коваленко Е.А., Мельникова Е.В., Власов Т.Д. Методы оценки неврологического дефицита у крыс после 30-минутной фокальной

ишемии мозга на ранних и поздних сроках постишемического периода // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2014. № 13 (1). С. 68-78. DOI: 10.24884/1682-6655-2014-13-1-68-78.