

Н. А. Вечканова, Н. А. Мельникова

Изучение ишемической деполяризации при очаговой ишемии головного мозга у крыс

Аннотация.

Цель: изучение ишемической деполяризации при очаговой ишемии головного мозга у крыс.

Материалы и методы. Эксперимент провели на 30-ти белых нелинейных крысах обоих полов, массой от 250 до 300 г. Животных разделили на три группы: 1) нормотермия ($n = 10$), 2) гипотермия ($n = 10$), 3) гипертермия ($n = 10$). При нормотермии внутреннюю температуру поддерживали на уровне $37,0 \pm 0,89^\circ\text{C}$, гипотермия поддерживалась на уровне $30,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, гипертермия поддерживалась на уровне $40,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Для обеспечения гипотермии животных обкладывали емкостями с охлажденным раствором и укрывали теплоизоляционным одеялом, а также дополнительно вводили в латеральную хвостовую вену охлажденный 0,9 % раствор NaCl. Для согревания животных обкладывали емкостями с горячим раствором и укрывали теплоизоляционным одеялом для поддержания оптимальной температуры в условиях эксперимента. Животным проводилось анестезиологическое пособие, включающее интраперитонеальное введение препаратов: «Золетил 100» и «Ксилазин» по стандартной методике. Производилась респираторная поддержка. После чего животным выполнялась окклюзия средней мозговой артерии (СМА) по методике Koizumi J. et al. Период окклюзии составлял 90 минут. Затем осуществлялась реперфузия, путем перерезки лигатуры на наружной сонной артерии. На аппаратном комплексе «ВІОРАС» регистрировалась ЭЭГ, проводилось измерение температуры в соответствии со стандартными методиками.

Окклюзия СМА выполнялась после того, как внутренняя температура животного достигала заданного уровня (30, 37 или 40°C соответственно). Гипо- или гипертермию поддерживали в течение всего периода эксперимента и спустя 1 ч после реперфузии. Затем животным давали возможность восстановить физиологический уровень температуры (этот период в среднем занимал 30 минут). На следующем этапе производилось морфологическое исследование. Головной мозг извлекался из черепной коробки, происходила фиксация в 10% нейтральном формалине, с дальнейшей проводкой в спиртах, затем происходило получение парафиновых блоков, выполнялось определение площади поражения, а затем окрашивание срезов гематоксилином и эозином.

Результаты. Повреждение тканей в результате очаговой ишемии головного мозга коррелировало с температурными колебаниями тела. Снижение температуры тела при очаговой церебральной ишемии приводило к уменьшению размера зоны ишемии, а как следствие и инфаркта головного мозга, и наоборот, небольшое повышение температуры тела приводило к увеличению площади инфаркта мозга.

Заключение. На ткани температурные колебания оказывали физиологические и биохимические эффекты, статистически значимая корреляция между эпизодами деполяризации при ишемии головного мозга и процент поражения мозга после ишемии не всегда находились в причинно-следственных отношениях.

Ключевые слова: ишемия; деполяризация; корковая депрессия.

Авторы:

Вечканова Наталья Александровна — кандидат биологических наук; e-mail: vaskina1986@internet.ru;

Мельникова Наталья Алексеевна — кандидат биологических наук.

Медицинский институт, Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева; 430005, Россия, Республика Мордовия, Саранск, Большевицкая ул., 68.

Введение. Роль ишемической деполяризации при очаговой ишемии головного мозга неизвестна. Однако имеются косвенные доказательства того, что ишемическая деполяризация способна усугубить ишемическое повреждение клеток. Известно, что к множественным электрофизиологическим изменениям в пораженной ткани при-

водит очаговая церебральная ишемия [1, 2], среди которых выделяют следующие микроскопические клеточные события: перераспределение ионных частиц, электрическая деполяризация мембран, сопровождающаяся высвобождением биологически активных веществ. Стоит отметить, что этот вопрос по-прежнему не до конца

изучен [3]. Кроме того, во время фокальной церебральной ишемии возникают макроскопические консолидированные события, такие как деполаризация коры головного мозга, которая включает распространяющуюся корковую депрессию. Мы постарались показать в своем исследовании, что количество эпизодов ишемической деполаризации, возникающих во время фокальной церебральной ишемии, пропорционально степени ишемического повреждения клеток.

Цель: изучить ишемическую деполаризацию при очаговой ишемии головного мозга у крыс.

Материалы и методы. Эксперимент проводили на 30-ти белых нелинейных крысах обоих полов, массой от 250 до 300 г. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [5]. Животных разделили на три группы: 1) нормотермия ($n = 10$), 2) гипотермия ($n = 10$), 3) гипертермия ($n = 10$). При нормотермии внутреннюю температуру поддерживали на уровне $37,0 \pm 0,89^\circ\text{C}$, гипотермия поддерживалась на уровне $30,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, гипертермия поддерживалась на уровне $40,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Для обеспечения гипотермии животных обкладывали емкостями с охлажденным раствором и укрывали теплоизоляционным одеялом, а также дополнительно вводили в латеральную хвостовую вену охлажденный 0,9 % раствор NaCl. Для согревания животных обкладывали емкостями с горячим раствором и укрывали теплоизоляционным

одеялом для поддержания оптимальной температуры в условиях эксперимента. Животным проводилось анестезиологическое пособие, включающее интраперитонеальное введение препаратов: «Золетил 100» и «Ксилазин» по стандартной методике. Производилась респираторная поддержка. После чего животным выполнялась окклюзия средней мозговой артерии (СМА) по методике Koizumi J. et al (1986) (рис. 1).

Период окклюзии составил 90 минут. Затем осуществлялась реперфузия, путем перерезки лигатуры на наружной сонной артерии. На аппаратном комплексе «ВІОРАС» регистрировалась ЭЭГ, проводилось измерение температуры в соответствии со стандартными методиками.

Окклюзия СМА выполнялась после того, как внутренняя температура животного достигала заданного уровня ($30, 37$ или 40°C , соответственно). Гипо- или гипертермию поддерживали в течение всего периода эксперимента и спустя 1 ч после реперфузии. Затем животным давали возможность восстановить физиологический уровень температуры (этот период в среднем занимал 30 минут). На следующем этапе производилось морфологическое исследование. Головной мозг извлекался из черепной коробки, происходила фиксация в 10 % нейтральном формалине, с дальнейшей проводкой в спиртах, затем происходило получение парафиновых блоков, выполнялось определение площади поражения, а затем окрашивание срезов гематоксилином и эозином.

Для статистической обработки данных, полученных в ходе эксперимента, применен пакет программ «Statistica 6.0». Использовался критерий Крускала-Уоллиса. При $p \leq 0,05$ различия считали достоверными. Корреляции между переменными были проанализированы с использованием критерия Спирмена. Результаты принимались за статистически значимые при $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение. Депрессия корковых структур напрямую связана с таким патологическим явлением, как нарушение перфузии. В условиях ишемии, когда возникает энергетический коллапс, корковая депрессия может спровоцировать накопление внутриклеточных ионов Ca^{2+} и, следовательно, инициирует апоптоз [6]. Корковая депрессия — это не просто изолированная электрическая дисфункция, на фоне фо-

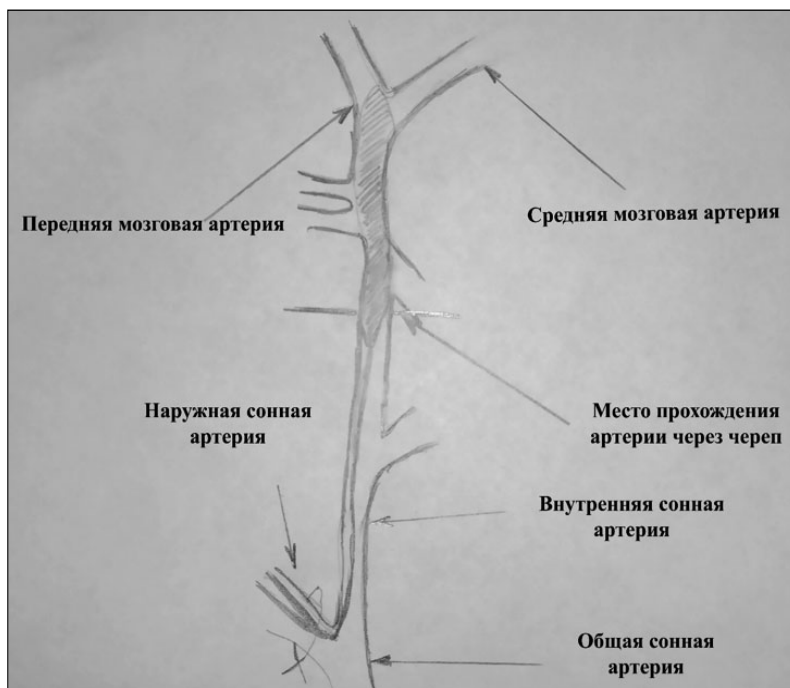


Рис. 1. Схема окклюзии СМА по методике Koizumi J. et al (1986).

кальной ишемии, корковая депрессия сама может стать иницирующим фактором в развитии ишемического повреждения клеток [7]. На рис. 2 представлены репрезентативные записи коркового потенциала постоянного тока у животных, подвергшихся окклюзии СМА во всех исследуемых группах. Всего у всех животных, подвергшихся ишемии в условиях контролируемой температуры, при анализе ЭЭГ нами отмечено 124 отклонения уровня потенциала постоянного тока; они были зарегистрированы в период окклюзии СМА, за исключением 6 эпизодов при которых, поляризация была зафиксирована в течение 5 минут после реперфузии. В начале и в течение 1 ч реперфузии корковой депрессии не наблюдалось.

Первые зарегистрированные эпизоды отклонения потенциала постоянного тока в группе гипертермии наступало статистически значимо раньше, чем в группах нормо- и гипотермии ($p < 0,05$) (табл. 1). У животных с гипертермией первые эпизоды поляризации возникали уже через 1 мин после окклюзии СМА, а у нормо- и ги-

потермичных животных время варьировалось от 20 до 30 мин. Форма волны первых отклонений потенциала постоянного тока обычно отличалась от последующих во всех экспериментальных группах (рис. 2). Появление деполяризации сопровождалось общим сдвигом потенциала постоянного тока, который не возвращался к исходному уровню, наиболее заметен этот феномен в группе животных с гипертермией [7, 8].

Пиковые отклонения потенциала постоянного тока коры головного мозга на двух противоположных участках происходили с разницей во времени от десятых доли секунды до 1 минуты. Отклонение обычно происходило раньше на электроде, расположенном на 5 мм латеральнее, чем на 2 мм латеральнее брегмы. В группе гипотермии у животных зарегистрировано $2,01 \pm 0,61$ эпизода отклонения потенциала постоянного тока. Напротив, множественные отклонения потенциала постоянного тока наблюдались как у нормо-, так и у гипертермичных животных (таблица 1). Нами выявлена статистически значимая корреляция между температурой тела животных и количеством эпизодов деполяризации ($r = 0,87$, $p < 0,001$).

Среднее число отклонений потенциала постоянного тока у животных с гипертермией было статистически значимо выше, чем у животных с нормотермией ($p < 0,05$). У животных с гипотермией была обнаружена минимальная площадь ишемического повреждения клеток, ограниченное изолированным очаговым клеточным некрозом в стриатуме и отсутствием измеримой зоны инфаркта [8]. В группах нормотермии и гипертермии наблюдалась четко разграниченная зона инфаркта головного мозга. Ишемическое поражение в группе

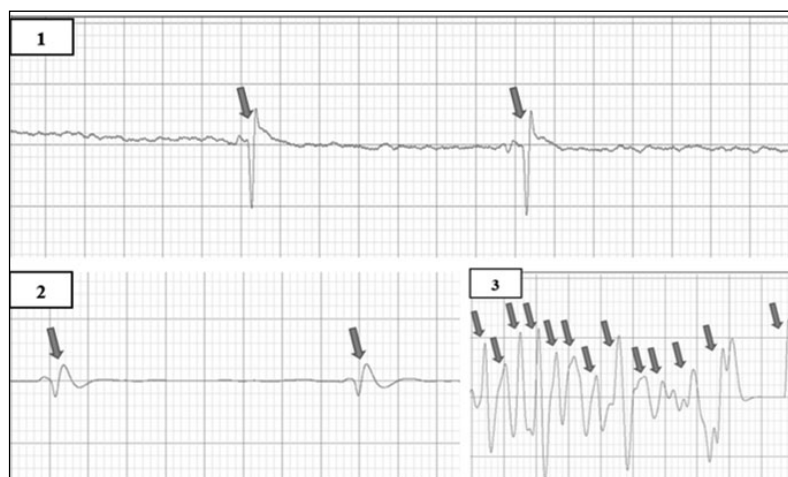


Рис. 2. Репрезентативная запись коркового потенциала постоянного тока у животных, подвергшихся окклюзии СМА: 1- нормотермия. 2- гипотермия, 3- гипертермия.

Таблица 1. Время регистрации первых эпизодов деполяризации, количество зарегистрированных эпизодов, временные интервалы между эпизодами деполяризации и площадь инфаркта головного мозга в исследуемых группах ($m \pm SD$).

Группа животных	Время регистрации первых эпизодов деполяризации (мин)	Количество зарегистрированных эпизодов деполяризации при ишемии	Временной интервал между эпизодами деполяризации при ишемии (мин)	Площадь инфаркта головного мозга (% поражения)
Нормотермия (n=10)	$8,95 \pm 11,14$	$2,70 \pm 0,96$	$19,00 \pm 10,89$	$13,20 \pm 12,30$
Гипотермия (n=10)	$12,24 \pm 6,41$	$2,01 \pm 0,61$	—	$0,00 \pm 0,00$
Гипертермия (n=10)	$1,17 \pm 0,27$	$13,17 \pm 3,84$	$15,00 \pm 10,32$	$36,5 \pm 3,4$

нормотермии охватывало гиппокамп, а также полосатое тело, как и в группе гипертермии. Объемы инфаркта во всех трех группах статистически значимо отличались друг от друга ($p < 0,05$). Выявлена статистически значимая корреляционная связь между площадью инфаркта и температурой тела ($r = 0,95$, $p < 0,001$). Выявлена статистически значимая корреляция между объемом инфаркта головного мозга и числом деполяризаций ($r = 0,90$, $p < 0,001$).

В настоящем исследовании мы непрерывно регистрировали изменения потенциала постоянного тока до, во время окклюзии СМА и спустя 90 мин после окклюзии СМА. Наши данные показывают, что количество отклонений потенциала постоянного тока, наблюдаемые в течение 90 минут очаговой церебральной ишемии, сильно коррелирует с площадью инфаркта [8, 9]. Отклонения потенциала постоянного тока и время задержки между началом эпизода деполяризации не поддаются количественному подсчету в виду артефактов, выходящих за пределы измерений.

Данные этого исследования дополнительно подтвердили, что во время ишемического инсульта возникают множественные эпизоды деполяризации. Без точной информации о положении деполяризующего источника практически невозможно рассчитать скорость распространяющейся волны [9, 10]. Первоначальное отклонение постоянного тока имело некоторые уникальные особенности по сравнению с последующими деполяризациями. Начальный пик напряжения наблюдался у всех животных вместе с общим сдвигом потенциала постоянного тока, который не возвращался к исходному уровню. Начальный пик был единственным, и наблюдался у всех животных в группе с гипотермией. Хорошо известно, что гипотермия практически полностью подавляет возникновение корковой депрессии, но не влияет на аноксическую деполяризацию [10].

Можно предположить, что начальные отклонения на электроэнцефалограмме во время окклюзии СМА вызываются аноксической деполяризацией, а не корковой депрессией. У большинства животных во время реперфузии не наблюдалось деполяризации головного мозга, также как, и корковой депрессии во время реперфузии [11, 12]. Восстановление мозгового кровотока и восстановление ионного гомеостаза не вызывают электрофизиологических изменений, приводящих к явлениям деполяризации.

Температура животного во время ишемии также оказывает сильное влияние на исход. Для интерпретации этого эффекта можно выделить несколько возможных механизмов: пониженная температура мозга снижает потребность в энергии и, следовательно, может уменьшить последствия, вызванные энергетическим сбоем во время ишемического инсульта [11]; гипотермия может уменьшить или даже полностью подавить высвобождение глутамата и дофамина, оба из которых связаны с постишемическим повреждением нейронов [12].

Заключение. Наше исследование показало, что количество эпизодов ишемической деполяризации во время очаговой церебральной ишемии коррелирует с площадью инфаркта головного мозга. Выявлена статистически значимая корреляционная связь между площадью инфаркта и температурой тела ($r = 0,95$, $p < 0,001$). Выявлена статистически значимая корреляция между объемом инфаркта головного мозга и числом деполяризаций ($r = 0,90$, $p < 0,001$). Температурные колебания оказывают физиологические и биохимические эффекты на ткани, статистически значимая корреляция между эпизодами деполяризации при ишемии головного мозга и процент поражения мозга после ишемии не всегда находятся в причинно-следственных отношениях.

Литература

1. Трофименко А.И. Моделирование церебральной ишемии посредством коагуляции средней мозговой артерии у крыс / А. И. Трофименко [и др.] // Фундаментальные исследования. — 2012. — № 2.
2. Bon L. I. Effects of experimental cerebral ischemia on metabolic characteristics of parietal cortex neurons / L. I. Bon, N. Ye. Maksimovich, S. M. Zimatkin // Bioprocess Engineering. — 2018. — Vol. 2. — №1. — P. 1–5.
3. Бонь Е.И. Анатомические особенности коры мозга крысы / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Новости мед.-биол. наук. — 2016. — Т. 14. — № 4. — С. 49–54.
4. Мартынова О.В. Морфологические изменения нейронов головного мозга крыс при двух-, четырёхсосудистой моделях ишемического повреждения головного мозга крыс и их коррекция тадалафилом в эксперименте / О.В. Мартынова [и др.] // Современ. проблемы науки и образования. — 2016. — № 6. — С. 242–249.
5. Белозерцева И. В. Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова / И.В. Белозерцева, О.А. Драволлина, М. А. Тур. — СПб.: Издательство СПбГМУ, 2014. 26 с.

6. Рукав Т.А. Морфофункциональные изменения нейронов фронтальной коры головного мозга в условиях его ишемии-реперфузии / Т. А. Рукав, Н. Е. Максимович, С. М. Зиматкин // Журн. ГрГМУ. — 2012. — № 4. — С. 35–38.
7. Шавловская О. А. Кавинтон комфорте в коррекции когнитивных нарушений при хронической ишемии головного мозга / О. А. Шавловская, А. Б. Локшина, Д. А. Гришина // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. — 2018. — Т. 118. — № 8. — С. 61–65.
8. Васильев И. А. Экспериментальные модели сосудистых поражений головного мозга (обзор литературы) / И. А. Васильев [и др.] // Успехи современного естествознания. — 2015. — № 1-3.
9. Литвинов А.А. Фокальная ишемия головного мозга у крыс на фоне недостаточности эстрогенов и эндотелиальной дисфункции / А.А. Литвинов [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. — 2017. — Т. 117. — № 8. — С. 56–62
10. Чуканова Е. И. Хроническая ишемия мозга, нейропластичность, возможности терапии / Е. И. Чуканова, А.С. Чуканова // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика — 2017. — № 2. — С. 102107.
11. Попова Т. Н. Активность глутатионовой системы и НАДФН-генерирующих ферментов при действии мелатонина на фоне ишемии / реперфузии головного мозга у крыс / Т. Н. Попова, О. А. Сафонова, А. О. Столярова, Т. И. Рахманова, Л. Ф. Панченко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. (SCOPUS). — 2018. — №3. — С. 19–24
12. Попова Т. Н. Оксидативный статус тканей крыс при введении мелаксена на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга / Т. Н. Попова, О. А. Сафонова, А. О. Столярова. // Биомедицинская химия. — 2016. — Т. 62. — Вып. 5. — С. 561–565.

Vechkanova N., Melnikova N.

Study of ischemic depolarization in focal cerebral ischemia in rats

Abstract.

Purpose: to study ischemic depolarization in focal cerebral ischemia in rats.

Materials and methods. The experiment was carried out on 30 white nonlinear rats of both sexes, weighing from 250 to 300 g. Animals divided into three groups: 1) normothermia ($n = 10$), 2) hypothermia ($n = 10$), 3) hyperthermia ($n = 10$). With normothermia, the internal temperature was maintained at a level of $37.0 \pm 0.89^\circ\text{C}$, the hypothermia was maintained at a level of $30.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$, hyperthermia was maintained at $40.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$. To ensure hypothermia, animals were covered with containers with a chilled solution and covered with a heat-insulating blanket, as well as an additionally introduced NaCl solution into a lateral tail vein. For warming animals, with a hot solution were covered with containers and covered with a heat-insulating blanket to maintain optimal temperature in experimental conditions. An anesthesiological manual was carried out for animals, including intraperitoneal administration of drugs: "Zelevated 100" and "Xilazin" according to the standard methodology. Respiratory support was carried out. After that, the animals performed occlusion of the middle cerebral artery (SMA) according to the Koizumi J. et al. The occlusion period was 90 minutes. Then reperfusion was carried out by interruption of ligature on the external carotid artery. The EEG was recorded at the BIOPAC hardware complex, and temperature was measured in accordance with standard methods. Occlusion was performed after the internal temperature of the animal reached a given level (30, 37 or 40°C , respectively). The hypo- or hyperthermia was supported throughout the entire period of the experiment and 1 hour after reperfusion. Then the animals were given the opportunity to restore the physiological level of temperature (this period on average took 30 minutes). At the next stage, a morphological study was carried out. The brain was extracted from the cranial box, fixed in 10% neutral formalin, with further wiring in alcohols, then the paraffin blocks were obtained, the area of the lesion was determined, and then staining the cuts of hematoxyline and eosin.

Results. *Tissue damage as a result of focal cerebral ischemia correlates with body temperature fluctuations. A decrease in body temperature in focal cerebral ischemia leads to a decrease in the size of the ischemia zone, and as a result of a cerebral infarction, and vice versa, a slight increase in body temperature leads to an increase in the area of cerebral infarction.*

Conclusion. *On tissue, temperature fluctuations have physiological and biochemical effects, a statistically significant correlation between episodes of depolarization in cerebral ischemia and the percentage of brain damage after ischemia are not always in a cause-and-effect relationship.*

Keywords: ischemia; depolarization; cortical depression.

Authors:

Vechkanova N. – PhD (Biol. Sci.); e-mail: vaskina1986@internet.ru;

Melnikova N. – PhD (Biol. Sci.).

“N. P. Ogarev Mordovia State University”; 430005, Russia, Republic of Mordovia, Saransk, Bolshevistskaya st., 68.

References

1. Trofimenko A. I. Modeling cerebral ischemia through coagulation of the middle brain artery in rats / A. I. Trofimenko [et al.] // Fundamental research. – 2012. – №. 2.
2. Bon L. I. Effects of Experimental Cerebral Ischemia on Metabolic Characteristics of Parietal Cortex Neurons / L. I. Bon, N. Ye. Maksimovich, S. M. Zimatkin // Bioprocess Engineering. – 2018. – Vol. 2. – № 1. – P. 1–5.
3. Bon E. I. The anatomical features of the rat cortex / E. I. Bon, S. M. Zimatkin // News Med.-Biol. sciences. – 2016. – V. 14. – №. 4. – P. 49–54.
4. Martynova O.V. Morphological changes in the neurons of the brain of rats with two-, four-and-vascular models of ischemic damage to the brain of rats and their correction with tadalafil in the experiment / O.V. Martynova [et al.] // Modern. Problems of science and education. – 2016. – №. 6. – P. 242–249.
5. Belozertseva I. V. Guide to the use of laboratory animals for scientific and educational purposes at St. Petersburg State University. Acad. I.P. Pavlova / I. V. Belozertseva, O. A. Dravolina, M. A. Tour. - St. Petersburg: Publishing House of St. Petersburg State University, 2014. 26 p.
6. Rukan T. A. Morphofunctional changes in the neurons of the front cerebral cortex in the conditions of its ischemia-reperfusion / T. A. Rukan, N. E. Maksimovich, S. M. Zimatkin // Journal. GRGMU. – 2012. – № 4. – P. 35–38.
7. Shavlovskaya O. A. Cavinton comfort in the correction of cognitive disorders in chronic brain ischemia / O. A. Shavlovskaya, A. B. Lokshin, D. A. Grishin // Journal of Neurology and Psychiatry named after C. C. Korsakova. – 2018. – V. 118. – № 8. – P. 61–65.
8. Vasiliev I. A. Experimental models of vascular lesions of the brain (review of literature) / I. A. Vasiliev [et al.] // Successes of modern natural science. – 2015. – № 1–3.
9. Litvinov A. A. Focal brain ischemia in rats against the background of insufficiency of estrogen and endothelial dysfunction / A.A. Litvinov [et al.] // Journal of neurology and psychiatry named after S.S. Korsakova. Special letters. – 2017. – V 117. – № 8. – P. 56–62
10. Chukanova E. I. Chronic brain ischemia, neuroplasticity, the possibility of therapy / E. I. Chukanova, A. S. Chukanova // Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics – 2017. – № 2. – P. 102107.
11. Popova T. N. The activity of the glutathionic system and the supra-generating enzymes under the action of melatonin against the background of ischemia / reperfusion of the brain in rats / T. N. Popov, O. A. Safonov, A. O. Stolyarova, T. I. I. I. Rakhmanova, L.F. Panchenko // Pathological physiology and experimental therapy. (Scopus). – 2018. – № 3. – P. 19–24
12. Popova T. N. Oxidative status of rats of rats with the introduction of Melaxen against the background of the development of ischemia / reperfusion of the brain / T. N. Popova, O. A. Safonov, A.O. Stolyarova. // Biomedical Chemistry. – 2016. – V. 62. – Issue. 5. – P. 561–565.