

УДК 616-092.9

DOI: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-92-96

КОЛПАКОВА М. Э.¹, ФИЛЬЧЕНКО И. А.¹,
ТРАЙКОВСКИЙ А.¹, ЦЫБА Д. Л.¹, КИРИК О. В.², ХАН А.¹,
ЛЯЙПЕРТ А.¹, КОРЖЕВСКИЙ Д. Э.², ВЛАСОВ Т. Д.¹

Особенности поведения в восьмирукавном лабиринте на фоне изменений активности микроглии полосатого тела после моделирования фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12
e-mail: patho@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 30.01.18; принята к печати 02.03.18

Резюме

Когнитивные расстройства при церебральной ишемии-реперфузии связаны с гибелью нейронов, на фоне которого развивается воспаление. Участие в этом процессе клеток микроглии активно исследуется. Целью работы являлось изучение активности микроглиоцитов у крыс с когнитивными расстройствами после моделирования фокальной транзиторной ишемии головного мозга. В эксперименте использовали половозрелых самцов массой 200–250 г (n=15). Ишемия головного мозга воспроизводилась под хлоралгидратным наркозом (внутрибрюшинно, 450 мг/кг). Микрохирургическое введение филамента в левую среднюю мозговую артерию (СМА) производили по J. Koizumi. Время окклюзии СМА составляло 30 мин с последующим реперфузионным периодом. Тестирование в восьмирукавном лабиринте проводилось двукратно в течение 7 дней с 2-дневным интервалом, во время которого каждое животное выполняло 5-минутную сессию 3 раза с 3-минутным интервалом. Для идентификации микроглиоцитов использовали поликлональные козьи антитела к антигену Iba1. При оценке поведения в восьмирукавном лабиринте после перенесенной фокальной транзиторной ишемии головного мозга было выявлено значительное количество ошибок оперативной памяти, а также увеличение времени выполнения задания. Когнитивные нарушения, возможно, служат индикатором нейровоспаления при церебральной ишемии. Выявленные изменения поведения и морфологии нервной ткани на поздних сроках постишемического периода дают представление о возможных механизмах компенсации снижения когнитивных функций за счет активации микроглии.

Ключевые слова: ишемия, восьмирукавный лабиринт, микроглия, головной мозг

Для цитирования: Колпакова М. Э., Фильченко И. А., Трайковский А., Цыба Д. Л., Кирик О. В., Хан А., Ляйперт А., Коржевский Д. Э., Власов Т. Д. Особенности поведения в восьмирукавном лабиринте на фоне изменений активности микроглии полосатого тела после моделирования фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2018;17(2):94–98. doi: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-92-96

UDC 616-092.9

DOI: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-92-96

KOLPAKOVA M. E.¹, FILCHENKO I. A.¹, TRAJKOVSKI A.¹,
TSYBA D. L.¹, KIRIK O. V.², ARIEB A. KHAN¹, LEIPERT A.¹,
KORZHEVSKII D. E.², VLASOV T. D.¹

Rat's behaviour in eight-arms maze after modeling of focal transient cerebral ischemia with subsequent activation of striatal microglia

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pavlov First Saint Petersburg State Medical University», Saint-Petersburg, Russia

197022, Russia, Saint-Petersburg, L'va Tolstogo street, 6-8

² Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Medicine», Saint-Petersburg, Russia

197376, Russia, Saint-Petersburg, Akademica Pavlova street, 12

e-mail: patho@yandex.ru

Received 30.01.18; accepted 02.03.18.

Summary

It is well known that cognitive disorders at cerebral ischemia-reperfusion are followed by neuronal death. The inflammation of nervous tissue occurs, but the role of microgliaocytes in neuroprotection is poorly understood. The aim of our work was to study microgliaocytes in rats with cognitive disorders in delayed postischemic period after focal transient cerebral ischemia. In an experiment we used male rats ($n=15$), weighing 200–250. The model of focal brain ischemia was performed in anaesthetized rats (intraperitoneally, chloralhydrate 450 mg/kg). Microsurgical introduction monofilament to the left middle cerebral artery was made by J. Koizumi technique. Time of middle cerebral artery (MCA) occlusion was 30 minutes with the subsequent reperfusion period. Testing in eight-arm maze was performed within seven days twice with a two-day interval during which each animal carried out a 5-minute session 3 times with a 3-minute interval. For identification of microgliaocytes used polyclonal goat antibodies to Iba1 antigen. At behavior assessment in an eight-arm maze there were errors of working memory revealed and prolongation of time of task performance. Cognitive disorders at cerebral ischemia, perhaps, serve as the neuroinflammation indicator. Microglia is likely involved in mechanisms of neuroprotection and compensation for cognitive disorders.

Key words: ischemia, eight-arm maze, microglia, brain

For citation: Kolpakova M. E., Filchenko I. A., Trajkovski A., Tsyba D. L., Kirik O. V., Ariebe A. Khan, Leipert A., Korzhevskii D. E., Vlasov T. D. Rat's behaviour an eight-arms maze after modeling of focal transient cerebral ischemia with subsequent activation of striatal microglia. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2018;17(2):94–98. doi: 10.24884/1682-6655-2018-17-2-92-96

Введение

Острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), или ишемический инсульт, чаще возникает в бассейне средней мозговой артерии. Известно, что когнитивные расстройства при церебральной ишемии-реперфузии связаны с гибелью нейронов коры, базальных ядер, поэтому в последнее время отдается предпочтение модели фокальной церебральной ишемии с односторонней или двусторонней окклюзией средних мозговых артерий (МСаО). Однако роль изменений микроглии остается недостаточно изученной.

Целью работы являлось изучение изменения поведения крыс Wistar в восьмирукавном лабиринте на фоне перенесенной фокальной транзиторной ишемии головного мозга, а также структуры и распределения микроглиоцитов в головном мозге крысы в отдаленные сроки после транзиторной фокальной ишемии.

Материал и методы исследования

Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями Этического комитета ПСПБГМУ им. И. П. Павлова и в соответствии с требованиями постановления главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». В постановке опытов руководствовались требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

В эксперименте использовали половозрелых самцов массой 200–250 г ($n=15$). Опыты проводили после недельного периода акклиматизации животных. Все животные содержались в индивидуальных клетках при постоянной комнатной температуре 22 °С со сменой циклов света и темноты по 12 ч, со свободным доступом к еде и воде, соблюдая принципы гуманного обращения с животными, регламентированные

требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986 г.) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными.

Уход за животными проводился в период с 8 ч утра до 8 ч вечера. Животных, которые не различались по показателям обучения, тренировали находить пищу в рукавах радиального лабиринта, после чего животные были поделены на группы: интактные (контрольные) и животные после 30-минутной ишемии головного мозга и последующим реперфузионным периодом до 50 дней.

Модель фокальной транзиторной ишемии головного мозга воспроизводилась под хлоралгидратным наркозом (внутрибрюшинно, 450 мг/кг). Температура тела животных поддерживалась на уровне 36,5–37,5 °С с помощью нагревательного столика и контролировалась с помощью ректального датчика. Микрохирургическое введение филамента в левую среднюю мозговую артерию (СМА) производили по методике J. Koizumi (1986) под операционным микроскопом (Carl Zeiss, Jena, Germany). Время окклюзии СМА составляло 30 мин с последующим реперфузионным периодом.

Исследование поведения в восьмирукавном радиальном лабиринте (РВЛ). Тренировочное и экспериментальное тестирование проводили согласно стандартам проведения экспериментов в восьмирукавном радиальном лабиринте. Период адаптации длился пять дней, в течение которого контролировалась масса тела и животные привыкали к рукам экспериментатора. Вес животных литмитировали до 85 % от исходного для повышения их мотивации к поиску пищи в рукавах лабиринта.

Затем в течение следующих 5 дней во время подготовительного периода каждую из крыс поочередно помещали в центральную часть арены лабиринта при открытых входах в рукава лабиринта с приманкой, подсчитывая общее время, затраченное на его поедание, время, потраченное на посещение каждого из рукавов, число ошибок. При этом пространственную

характеристику среды вокруг лабиринта не меняли (рис. 1, 2).

Тестирование проводилось в течение 7 дней с 2-дневным интервалом, во время которого каждое животное выполняло 5-минутную сессию 3 раза с 3-минутным интервалом. Затем через 2-дневный интервал проводили повторное тестирование в тех же условиях, подсчитывали число ошибок, т. е. повторных заходов в уже посещенные в течение этого сеанса рукава.

Морфологическое исследование

Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [2], обезживали и заливали парафин по общепринятой методике. Для идентификации микроглиоцитов использовали поликлональные козы антитела к антигену Iba1 (*AbCam*, Великобритания, по каталогу –ab5076) в соответствии с ранее опубликованным протоколом [3]. На препаратах у всех исследованных животных измеряли диаметр ядросодержащей части микроглиоцитов, а также (при увеличении $\times 400$) определяли относительную площадь среза, занимаемую микроглиоцитами, как их телами, так и отростками, с использованием компьютерной программы «ImageJ» (США). Для каждого случая вычисляли различия между показателями, характеризующими правое и левое полушарие. Сравнение наблюдений производили с помощью t-критерия (Стьюдента). Различия считали значимыми при $< 0,05$.

Статистическая обработка данных РВЛ. В конце исследования была выполнена статистическая обработка результатов для оценки разницы между контрольной, ложно оперированной и группой животных с окклюзией СМА. Данные об оперативной памяти животных обрабатывали с помощью дисперсионного анализа, реализованного в пакете программ «Statistica for Windows».

Результаты исследования и их обсуждение

В начале эксперимента у контрольных животных и у животных с ишемией отмечается значительное количество ошибок по выбору рукава, т. е. количество

повторных входов в рукав лабиринта. Однако к концу первого тестирования количество ошибок животных контрольной группы значительно уменьшается, в то время как количество ошибок у животных с перенесенной фокальной ишемией остается достаточно высоким.

К концу всего периода наблюдения за животными контрольная группа животных выполняет задание в полном объеме, не допуская ошибок. Напротив, в группе с ишемией количество ошибок лишь уменьшается, однако отсутствует стопроцентное выполнение задания.

Кроме того, крысы контрольной группы характеризуются стратегией, отличной от животных с ишемией. Для их поведения характерно динамичное посещение всех рукавов, в которых находится приманка, при этом отмечается четкая последовательность посещения рукавов, а выполнение задания в конце периода тестирования стопроцентное. В поведении крыс на ранних сроках после фокальной транзиторной ишемии головного мозга прослеживается определенная тактика, а именно – в процессе тестирования животное с ишемией предпочитает многократно посещать один и тот же рукав лабиринта. При этом время выполнения задания по поиску пищи значительно увеличивается.

Морфологически в ипсилатеральном полушарии через 50 суток вокруг очагов незначительного повреждения стриатума тела микроглиоцитов выглядели увеличенными. Немногочисленные отростки клеток были короткими и утолщенными. В самом очаге деструкции микроглиоциты также имели укрупненную ядросодержащую часть и по 1–2 неветвящихся толстых отростка. В других структурах мозга количество микроглиоцитов было увеличено, но их структура не отличалась от таковой у микроглиоцитов контрольных животных. После перенесенного ишемического инсульта в ипсилатеральном полушарии непосредственно в пограничной области встречались многочисленные микроглиоциты амебоидной формы с цитоплазматическими выростами. В области инфаркта мозга, помимо микроглиоцитов, обнаруживались типичные

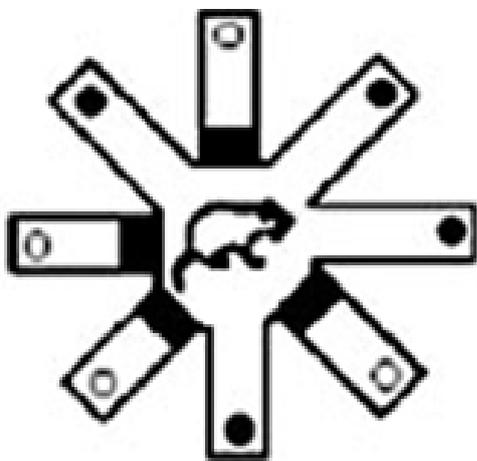


Рис. 1. Восьмирукавный радиальный лабиринт.
Тренировочная фаза
Fig. 1. Eight-arm maze. Training phase

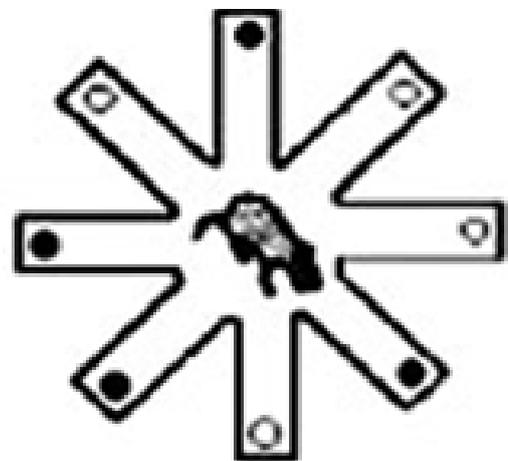


Рис. 2. Восьмирукавный радиальный лабиринт.
Тестовая фаза
Fig. 2. Eight-arm maze. Testing phase

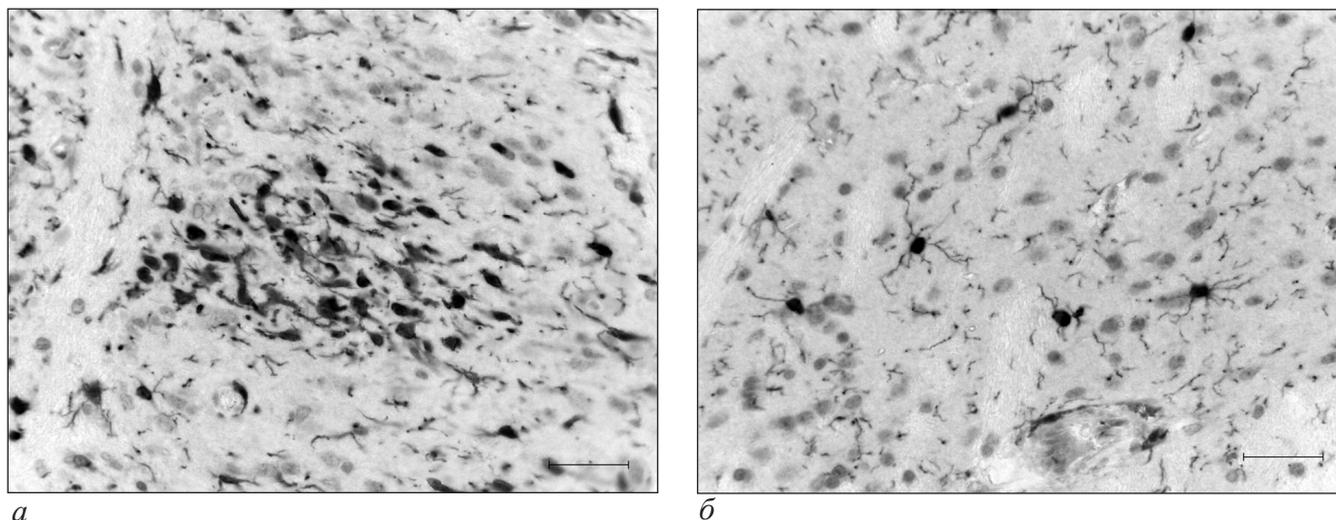


Рис. 3. Оценка морфофункциональных изменений микроглии в полосатом теле: *a* – ипсилатеральное полушарие; *б* – контрлатеральное полушарие

Fig. 3. Assessment of microglia morphofunctional changes in corpus striatum: *a* – ipsilateral hemisphere; *б* – contralateral hemisphere

Iba1-иммунопозитивные макрофаги (рис. 3, *a*).

В сером веществе стриатума контрлатерального полушария присутствуют многочисленные тонкие отростки Iba1-иммунопозитивных (Iba1+) клеток, тела которых редко попадают в плоскость среза. Рядом с капиллярами встречаются палочковидные формы этих клеток, вытянутые вдоль проходящего капилляра. Белое вещество пронизано немногочисленными отростками этих клеток, преимущественно ориентированными вдоль хода нервных волокон, ядросодержащие части клеток встречаются редко. В субэпендимной зоне Iba1+-клетки с тонкими, разветвленными отростками располагаются непосредственно под эпендимоцитами. Во всех случаях в контрлатеральном полушарии мозга форма и характер распределения микроглиоцитов не отличались от таковых у контрольных животных (рис. 3, *б*).

В модели фокальной транзиторной ишемии головного мозга в бассейне средней мозговой артерии ишемическое повреждение затрагивает кору и базальные ганглии большого мозга. На основании ранее проведенного исследования [1] установлено, что 30-минутная ишемия мозга приводит к значимому уменьшению популяции нейронов верхнемедиальной зоны стриатума. Эта область мозга участвует в способности запоминать точное месторасположение объектов, т. е. за навигацию. Основными механизмами, приводящими к гибели нейронов при ишемии, считают воспаление и оксидативный стресс. Снижение АТФ в нейронах при гипоксии нервной ткани влияет на процесс хранения и воспроизведения информации [4]. Микроглия является ключевым элементом воспалительного процесса, развивающегося в нервной ткани в ответ на ишемию. Дезорганизация межнейронных связей на фоне воспаления сопровождается снижением функциональной активности

Количество повторных входов в рукав на разных сроках после ишемии

The number of reentry the arm on different terms				
День				Время выполнения задания, мин
1-й	2-й	3-й	4-й	
<i>Контроль</i>				
7,0±0,1	2,0±0,5	0,8±0,4	0,5±0,1	115,0±13,0
<i>Ишемия</i>				
8,0±0,2	6,1*±0,1	3,0*±0,2	1,5*±0,3	189,0*±15,0

Примечание: * – $p < 0,05$.

нейронов поврежденной области [5]. Микроглия же участвует в регуляции процесса синаптической организации в нервной ткани, ее восстановления после повреждения. Восстановление утраченных функций в постинсультном периоде происходит за счет перинфарктной области пораженного полушария.

При оценке поведения в восьмирукавном лабиринте после перенесенной фокальной транзиторной ишемии головного мозга было выявлено значительное количество ошибок оперативной памяти (количество повторных входов в рукав лабиринта), что оказывало влияние на общее время выполнения задания поиска пищи (таблица). Когнитивные нарушения, возможно, служат индикатором нейровоспаления при церебральной ишемии.

Выявленные изменения поведения и морфологии нервной ткани на поздних сроках постишемического периода дают представление о возможных механизмах компенсации снижения когнитивных функций за счет активации микроглии.

Учитывая, что основной мишенью для восстановительного лечения после инсульта служат эндогенные механизмы нейропластичности, определение вышеперечисленных компонентов нервной ткани необходимо для разработки новых способов для эффективной таргетной восстановительной терапии инсульта.

Конфликт интересов / Conflict of interests

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interests.

Литература / References

1. Коржевский Д. Э., Власов Т. Д., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. Селективная гибель нейронов стриатума крысы после // Морфология. – 2009. – № 2. – С. 80–82. [Korzhevsky DE, Vlasov TD, Kirik OV, Sukhorukova EG. Selective death of the striatum neurons in rats after the transient occlusion of the middle cerebral artery. *Morfologiya*. 2009;2:80-82. (In Russ)].
2. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейростологических исследованиях // Морфология. – 2006. – Т. 129. – Вып. 1. – С. 85–87. [Korzhevsky DE., Grigoriev IP. and Otellin VA. Application of the dehydrating clamps containing Zincum salts in neurohistologic researches. *Morphology*. 2006;129(1):85-87. (In Russ)].
3. Сухорукова Е. Г., Кирик О. В., Коржевский Д. Э. Применение иммуногистохимического метода для выявления микроглии головного мозга в парафиновых срезах // Бюлл. эксперимент. биол. – 2010. – Т. 149. – № 6. – С. 709–712. [Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Korzhevsky D. E. The use of immunohistochemical method for detection of brain microglia in paraffin sections // *Bull exp boil med*. 2010;149(6):709-712. (In Russ)].
4. Denes A, Thornton P, Rothwell N, Allan S. Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation *Brain Behav Immun*. 2010; 24:708-723. Doi: 10.1016/j.bbi.2009.09.010.
5. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87:779-789. doi: 10.1189/jlb.1109766.

Информация об авторах

Власов Тимур Дмитриевич – профессор, заведующий кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: tvlasov@yandex.ru.

Коржевский Дмитрий Эдуардович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», e-mail: dek2@yandex.ru.

Колпакова Мария Эдуардовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: patho@yandex.ru.

Кирик Ольга Викторовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», e-mail: olga_kirik@mail.ru.

Фищенко Ирина Александровна – студентка 6 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: iriina6994@gmail.com.

Трайковский Александр – студент 4 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: aleksandartrajkovski12@gmail.com.

Цыба Дарья Леонидовна – студентка 3 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, e-mail: dariasnow97@gmail.com.

Хан Ариб – ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ

Ляйперт Антония – ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ, Klinikum Landkreis Erding, Germany, e-mail: antonialeipert@hotmail.com.

Author information

Vlasov Timur D. – professor, Head of Pathophysiology Department First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, e-mail: tvlasov@yandex.ru.

Korzhevskii Dmitry E. – PhD, Head of Laboratory of Pathomorphology, Institute of Experimental Medicine, e-mail: dek2@yandex.ru.

Kolpakova Mariya E. – associate Professor Pathophysiology Department, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, e-mail: patho@yandex.ru.

Kirik Olga V. – PhD, Laboratory of Pathomorphology Institute of Experimental Medicine, e-mail: olga_kirik@mail.ru.

Filchenko Irina A. – 6-th year student, Faculty of Medicine First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, e-mail: iriina6994@gmail.com.

Trajkovski Alexandr – First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, e-mail: aleksandartrajkovski12@gmail.com.

Tsyba Darya L. – 3-th year medical student, Medical faculty First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, e-mail: dariasnow97@gmail.com.

Arieb A. Khan – First Pavlov State Medical University of St. Petersburg.

Leipert Antonia – First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Klinikum Landkreis Erding, Germany, e-mail: antonialeipert@hotmail.com.