

Экспериментальные исследования

УДК [616.831-005.4:616.8]-092.4

ДАЙНЕКО А. С.¹, ШМОНИН А. А.^{1,2},
ШУМЕЕВА А. В.¹, КОВАЛЕНКО Е. А.¹,
МЕЛЬНИКОВА Е. В.¹, ВЛАСОВ Т. Д.^{1,2}

Методы оценки неврологического дефицита у крыс после 30-минутной фокальной ишемии мозга на ранних и поздних сроках постишемического периода

¹ *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова.*

² *Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии имени В. А. Алмазова, г. Санкт-Петербург*
e-mail: langendorff@gmail.com

Реферат

В исследовании проводилось сравнение нескольких методов изучения неврологического дефицита у крыс, направленное на выявление наиболее чувствительных критериев оценки постишемического повреждения на различных сроках после ишемии. На модели транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс по методике J. Koidzumi проводилась оценка неврологических расстройств с помощью следующих тестов — хождение по балке (Ledged Tapered Beam); установка позы (Bracing test); угловой тест (Corner test); вытягивание лапы (Placing test); шкала mNSS (Modified Neurological Severity Scores); Бедерсон-тест (Bederson test) и шкала Гарсия — на 2-й, 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни постишемического периода. Все предложенные тесты позволяют выявить и количественно оценить неврологический дефицит у крыс до 21-го дня постишемического периода, к 28-му дню после ишемии очаговый неврологический дефицит регрессирует. Наиболее чувствительными и репрезентативными оказались шкала Гарсия, тест с вытягиванием лапы (Placing test) и Бедерсон-тест (Bederson test).

Ключевые слова: *фокальная ишемия головного мозга, крыса, экспериментальная модель, неврологический дефицит, тест с вытягиванием лапы (Placing test), Бедерсон-тест, шкала Гарсия.*

Введение

В настоящее время цереброваскулярная патология по-прежнему остается одной из ведущих причин смертности и инвалидизации населения [15]. Поскольку наиболее частой причиной остро развившейся ишемии является тромбоз атеросклеротически измененных сосудов, в последнее время одним из приоритетных методов лечения данной группы пациентов стал метод, основанный на введении тканевого активатора плазминогена для раннего восстановления кровотока [12]. При этом сохраняется необходимость дополнительных лечебных воздействий, в частности, связанных с ишемическим и реперфузионным повреждением, поэтому поиск новых методов защиты головного мозга от такого повреждения является приоритетной задачей. Одним из наиболее безопасных и перспективных способов лечения инсультов является фармакологическая нейропротекция. Уменьшение участка повреждения мозговой ткани является основной целью нейропротективной терапии. В то же время, согласно некоторым исследованиям, размер ишемического повреждения не всегда коррелирует с тяжестью неврологических проявлений, причем неврологические нарушения нередко проявляются более выражено, чем морфологические [8, 21]. Судя по всему, оценка неврологических функций у экспериментальных

животных с использованием общепринятых тестов не обладает достаточной чувствительностью, чтобы различать легкие неврологические нарушения. На европейском конгрессе по инсульту [12] на секции трансляционных исследований в 2013 г. поднялся вопрос об отсутствии в настоящий момент крупных клинических испытаний, доказавших эффективность нейропротекции при инсульте, несмотря на огромное количество экспериментальных данных, демонстрирующих положительное влияния большого числа фармакологических препаратов на модели экспериментального инсульта на животных. Причина такого несоответствия изучена не до конца. Не исключено, что это может быть связано с особенностями патофизиологии ишемии мозга: повреждением путей белого вещества, изменением состояния межнейронных соединений (например, щелевых межклеточных контактов), защитной «гибернацией» мозга или гибелью нейронов-мишеней [9, 10]. С другой стороны, причиной трудностей являются ошибки при планировании и проведении экспериментальных исследований. Так, большинство используемых шкал для оценки неврологического дефицита у крыс после окклюзии средней мозговой артерии (СМА) являются «калькой» с человеческих шкал. Крысы имеют ряд видовых особенностей [2, 5, 11]. Характер неврологического дефицита у крыс

отличается от таковых у человека. У человека основным проявлением неврологического дефицита являются появление двигательных расстройств и нарушения высшей мозговых функций — афазии и апраксии. У крыс, в первую очередь, выпадают видовые рефлексы, а двигательный и сенсорный дефицит возникает только при большом объеме поражения.

Несмотря на эти трудности, разработано множество тестов для оценки неврологического дефицита, которые призваны дифференцировать структуру повреждений нервной системы, а также оценить эффективность исследуемых методов нейропротекции. Неврологические тесты с доказанной чувствительностью по определенному параметру на каждом сроке постиншемического периода могут быть использованы при исследовании эффективности применения нейропротективной технологии наряду с морфологическим исследованием головного мозга крыс.

Цель исследования

Изучить неврологический дефицит и сопоставить распространенные стандартные неврологические тесты для определения наиболее оптимального, простого в исполнении и высокочувствительного метода оценки неврологического состояния крысы на ранних и поздних сроках постиншемического периода.

Задачи исследования

1. Определить размер функционального повреждения и степень вариабельности неврологического дефицита при использовании модели 30-минутной

окклюзии средней мозговой артерии по методике J. Koizumi (1986).

2. Оценить выраженность неврологического дефицита после моделирования фокальной ишемии головного мозга с помощью линейки неврологических тестов у крыс: тест-хождение по балке (Ledged Tapered Beam), тест установки позы (Bracing test), угловой тест (Corner test), тест с вытягиванием лапы (Placing test), шкала mNSS (Modified Neurological Severity Scores), Бедерсон-тест (Bederson test) и шкала Гарсия.

3. Сравнить чувствительность и воспроизводимость функциональных тестов при ишемии мозга у крыс.

4. Выработать оптимальные критерии оценки постиншемического повреждения головного мозга на ранних и поздних (до 4-х недель) сроках постиншемического периода.

Из огромного спектра существующих методов оценки неврологического дефицита у крыс для нашего исследования мы отбирали неврологические тесты, удовлетворяющие следующим двум параметрам:

— простота воспроизведения и оценки;

— отсутствие необходимости в сложном техническом оснащении.

Выбранные шкалы оценивают неврологический дефицит у крыс комплексно по нескольким параметрам. В табл. 1 приведены данные по соответствию характера неврологических расстройств (неврологического дефицита) и функциональных тестов и шкал.

Соответствие характера неврологических расстройств (неврологического дефицита) и выбранных нами функциональных тестов

Таблица 1

Тест	Двигательные расстройства	Расстройства чувствительности	Расстройство координации движений и нарушение равновесия	Общая двигательная активность	Рефлексы
Тест-хождение по балке (Ledged Tapered Beam)	+	–	+	–	–
Тест установки позы (Bracing test)	+	–	+	–	–
Угловой тест (Corner test),	+	–	–	–	–
Тест с вытягиванием лапы (Placing test)	+	+	+	–	–
Шкала mNSS (Modified Neurological Severity Scores)	+	+	+	–	+
Бедерсон-тест (Bederson test)	+	+	+	+	–
Шкала Гарсия	+	+	+	+	–

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал и методы исследования

Все исследования проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» [6] и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [7]. Все оперативные вмешательства проводились под анестезией хлоралгидратом (430 мг/кг), внутривенно.

В эксперименте были задействованы самцы крысы Wistar.

Критерии включения:

- вес крысы — 200–250 г;
- отсутствие неврологического дефицита при исследовании с помощью выбранных тестов до исследования;
- нормальный кровоток в СМА до ее окклюзии по данным доплерографии (30–60 см/с).

Критерии исключения:

- наличие кровотока в СМА во время ее окклюзии по данным доплерографии;
- отсутствие кровотока в СМА после удаления филамента по данным доплерографии (феномен «no-reflow»);
- любые дыхательные расстройства во время оперативного вмешательства;
- резкое и необъяснимое изменение показателей кровотока во время наблюдения;
- инфекционные осложнения после операции.

Основные этапы эксперимента:

- 1) отбор и предоперационное тестирование крыс с помощью выбранных неврологических тестов;
- 2) моделирование фокальной транзиторной ишемии головного мозга крыс путем окклюзии средней мозговой артерии по методике J. Koidzumi [18], либо проведение операции без введения филамента в группе контроля (ложнооперированные);

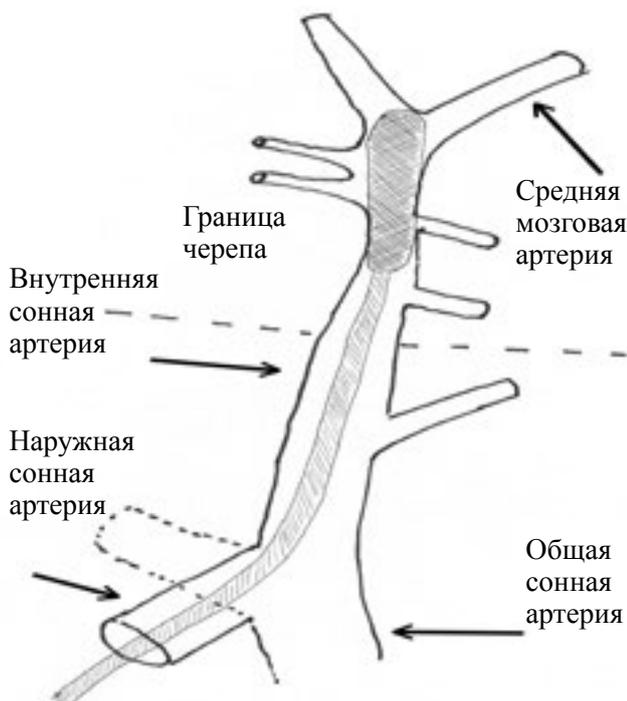


Рис. 1. Схема окклюзии левой СМА у крыс по методу Коидзуми [18]

3) оценка неврологических расстройств у крыс с помощью неврологических тестов на 2-й, 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни постишемического периода;

4) выведение крыс из эксперимента на 28-й день после операции.

Моделирование фокальной ишемии головного мозга по методике J. Koidzumi: полипропиленовая нить (4-00, Ethicon, США) длиной 22 мм, обработанная силиконом и поли-L-лизином (далее — филламент), вводилась ретроградно в левую наружную сонную артерию, после чего проводилась через бифуркацию общей сонной артерии и внутреннюю сонную артерию к устью СМА, перекрывая его (рис. 1). Через 30 минут нить извлекалась, рана ушивалась. Во время операции проводился контроль кровотока в бассейне левой СМА с помощью высокочастотной ультразвуковой доплерографии (Минимакс-Допплер-К, ООО «Минимакс», Санкт-Петербург), датчиком 25 МГц. Для этого формировалось трепанационное окно в проекции левой СМА.

Для доказательства морфологического повреждения головного мозга крыс на 2-е сутки после окклюзии СМА в отдельной группе производилась окраска головного мозга с применением трифенилтетразолия хлорида, которая позволила выявить зону ишемического некроза.

Группы экспериментальных животных

1. Контроль — ложнооперированные крысы, проведенные через все этапы эксперимента, за исключением введения филамента в среднюю мозговую артерию (n=10).

2. Опыт — крысы, которым воспроизводилась ишемия головного мозга (n=10).

Оценка функционального повреждения головного мозга крыс после моделирования ишемии производилась в два этапа. На первом этапе изучение производилось физикально без применения шкал и балльной оценки.

Регистрировали характер неврологических расстройств (чувствительный, нарушение произвольных движений, нарушений координации, выпадение рефлексов), сочетание синдромов и их выраженность.

На втором этапе оценка повреждения мозга производилась с применением известных неврологических тестов:

1) хождение по балке (Ledged Tapered Beam) [19, 20]. Для этого теста была необходима тренировка (около 1 недели) до тех пор, пока крыса не начнет успешно проходить по балке без поворотов назад и без промахов лапами. Крыса ходила по подвешенной сужающейся горизонтальной балке. Этот тест был чувствителен в оценке расстройств движения задних конечностей. Число промахов контралатеральной задней конечности считалось наряду с общим количеством шагов этой лапой и выражалось как процент промахов к общему количеству шагов;

2) тест установки позы (Bracing test) [19, 20]. Данный тест позволил выявить расстройства двигательной активности передних конечностей и координации движений. Экспериментатор располагал руку с одной стороны от крысы и начинал мягко тащить

ее вбок на 90 см со скоростью 20 см/с по гладкой поверхности. Здоровые крысы регулировали свою позу, производя множество движений передними лапами. Считалось количество шагов, выполненных передней лапой на той стороне, с которой толкают крысу. Крыса тестировалась два раза в каждом направлении;

3) угловой тест (Corner test) [19, 20]. Данный тест позволил оценить расстройства восприятия пространства (неглект) и парез зрения. Крыса помещалась между двумя досками размерами 30×20×1 см в домашней клетке. Здоровые крысы поворачивались как влево, так и вправо случайно. У животных с ишемией головного мозга развивалось «игнорирование» половины пространства (неглект), поэтому они поворачивались преимущественно в здоровую сторону. Считалось число поворотов в каждую сторону в 10 попытках;

4) тест с вытягиванием лапы (Placing test) [17]. Данный тест позволил выявить расстройства двигательной активности передних конечностей. Крысу держали таким образом, чтобы ее конечности свисали без опоры. Затем крысу поднимали к краю стола так, чтобы ее вибриссы касались поверхности края стола, параллельного ее телу. Считали количество раз, когда крыса успешно поднимает свою переднюю лапу на поверхность стола в 10 попытках для каждой лапы;

5) шкала mNSS (Modified Neurological Severity Scores) [14]. Данная шкала включала в себя тесты на выявление расстройств двигательной активности (мышечный статус и неестественные движения), чувствительной сферы (зрительной, тактильной и проприоцептивной), рефлексов и координации движений (табл. 2).

Оцениваемые параметры:

- двигательная активность крысы при подвешивании за хвост;
- особенности ходьбы крысы по поверхности;
- координация движений при хождении по балке;
- выраженность рефлексов (рефлекс с наружного слухового прохода и корнеальный рефлекс).

Максимальное количество баллов — 14, минимальное — 0 баллов;

6) Бедерсон тест (Bederson test) [13]. На высоте 1 метр над полом крысу подвешивали за хвост и наблюдали за сгибанием передних лапок.

Здоровая крыса тянула обе передние лапки к полу. При отсутствии других неврологических нарушений такая крыса получала 0 баллов.

При неврологических нарушениях крыса сгибала переднюю лапу, противоположную пораженному полушарию. Положение конечности варьировало от незначительного сгибания в запястье и приведения в плече с разгибанием в локте до выраженного полного сгибания в запястье, локте и приведения с внутренней ротацией в плече. Данные расстройства оценивались в 1 балл.

Далее крысы помещались на большой лист мягкой, покрытой пленкой бумаги, которую можно крепко схватить когтями. Держа крысу рукою за хвост, производили мягкое давление сбоку позади плеча

крысы до тех пор, пока передние лапы не проскользят несколько миллиметров.

Это действие повторялось несколько раз в разных направлениях. Здоровая крыса или крыса с легкой дисфункцией препятствовала скольжению одинаково в обоих направлениях. Крысы с более серьезными нарушениями утрачивали способность противостоять боковому толчку, что оценивалось в 2 балла.

Далее крысам позволяли двигаться свободно с целью выявления «хождения по кругу». «Игнорирование» стороны повреждения оценивалось в 3 балла:

норма — 0 баллов: неврологический дефицит не наблюдается;

умеренное расстройство — 1 балл: сгибание передней лапы;

выраженное расстройство — 2 балла: снижение противодействия боковому толчку и сгибание передней лапы;

наиболее выраженное расстройство — 3 балла: хождение по кругу, снижение противодействия боковому толчку, сгибание передней лапы;

7) шкала Гарсия [9, 16, 21] (табл. 3). По данной методике анализировались расстройства двигательной, чувствительной сферы, а также координации движений. В табл. 3 приведены показатели для оценки по шкале Гарсия.

Качество выполнения каждого параметра выражалось в баллах от 0 до 3. Максимальное количество баллов (здоровое животное) — 18, минимальное — 3. Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета «StatSoft Statistica v6.0». Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для двух независимых выборок. Для оценки двух зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона. Эти тесты были использованы только в случае наличия различий для группы выбранных параметров с помощью непараметрических критериев для нескольких связанных и несвязанных показателей.

Все показатели на графиках представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение», а в тексте значения приведены в виде медианы и 25-й и 75 %-й перцентилей в круглых скобках. Значения *P* менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

Результаты исследования и их обсуждение

При моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс за счет филаментной окклюзии левой СМА на 30 минут развилось повреждение преимущественно подкорковых структур левого полушария [1–3]. На рис. 2 можно видеть зону ишемического инфаркта после окраски с применением трифенилтетразолия хлорида. Она выглядит более светлой.

На первом этапе неврологической оценки производилось наблюдение и фиксация нарушений без применения специализированных шкал.

В результате наблюдения после выхода из наркоза у животных отмечались следующие нарушения: расстройства поведения, исчезновение видовых рефлексов (защитный рефлекс, назодвигательный

Шкала mNSS (Modified Neurological Severity Scores) [14]

Таблица 2

Тест	Баллы
Подвешивание крысы за хвост	3
1 — сгибание передней лапы	
1 — сгибание задней лапы	
1 — поворот головы более 10° относительно вертикальной оси через 30 с	
Ходьба по поверхности (normal=0; maximum=3)	3
0 — обычная ходьба	
1 — невозможность идти прямо	
2 — ходьба по кругу в сторону поражения	
3 — падение на паретическую сторону	
Beam — балансный тест (норма — 0; максимум поражения — 6 баллов)	6
0 — устойчивая поза	
1 — зажимание края балки	
2 — обнимание балки и падение одной конечности с балки	
3 — обнимание балки и падение двух конечностей с балки, или вращение на балке (>30 с)	
4 — попытка удержаться на балке, но падение (>20 с)	
5 — попытка удержаться на балке, но падение (>10 с)	
6 — падение без попытки удержаться на балке или зависание на балке (<10 с)	
Отсутствие рефлексов	2
1 — Риппа-рефлекс (встряхивание головой при прикосновении к наружному слуховому проходу)	
1 — корнеальный рефлекс (моргание глазом при легком прикосновении к роговице тканью)	
Максимум баллов	14

оборонительный рефлекс, назодвигательный ориентировочный рефлекс, компенсаторный позыравнивающий рефлекс при падении и др.) и очаговые неврологические нарушения. На рис. 3 приведены данные об очаговом неврологическом дефиците, оцененном без использования шкал. Очаговый неврологический дефицит был представлен двигательными расстройствами (гемипарез или монопарез у 100 % крыс опытной группы), чувствительными нарушениями (гемигипестезия и гемигипалгезия у 100 % крыс опытной группы), расстройствами координации движений и равновесия (динамическая и статико-локомоторная атаксия у 100 % крыс опытной группы) и снижением общей двигательной активности (у 75 % крыс опытной группы). Данная симптоматика соответствовала поражению бассейна левой СМА у крыс. К 28-м суткам после моделирования фокальной ишемии неврологическая очаговая симптоматика регрессировала более чем у 60 % животных. Таким образом, данная модель ишемии у крыс позволяет воспроизводить ишемический инсульт с регрессом неврологических симптомов в течение месяца. В группе сравнения (ложнооперированные крысы)

также наблюдались снижение силы (на 2-е сутки у 20 % крыс), расстройство координации (на 2-е сутки у 20 % животных) и снижение активности (на 2-е сутки у 30 % крыс). Вероятно, снижение активности было связано с влиянием наркоза, а двигательные и чувствительные расстройства являлись результатом реакции животного на послеоперационную рану. К 14-м суткам ни у одного животного группы ложнооперированных не выявлялось расстройств. Послеоперационные изменения не препятствовали оценке очаговых неврологических расстройств.

Тест «хождение по балке» (Ledge Tapered Beam) (рис. 4, а, б) позволил зарегистрировать двигательный дефицит в обеих задних конечностях крысы. На 2-е сутки после 30-минутной ишемии головного мозга имелось статистически значимое ($p=0,001$) отличие по количеству промахиваний-баллов в правых задних конечностях от группы ложнооперированных — 4 (3; 8) и 0,5 (0; 2) балла соответственно (рис. 4, а). Однако была выявлена большая дисперсия данных в обеих группах и, несмотря на значимые статистические различия, визуально группы совпадают (разброс данных — 80 %). А на 14-й день после 30-минутной

Шкала неврологического дефицита Гарсия у крыс с ишемическим инсультом [9, 16, 21]

Таблица 3

Параметр	Количество баллов			
	0	1	2	3
Спонтанная активность (в клетке в течение 5 мин)	Движения отсутствуют	Едва двигается	Двигается, но не приближается, по крайней мере, к трем сторонам клетки	Двигается и достигает, по крайней мере, трех сторон клетки
Симметричность движений (4 конечности)	Левая сторона: отсутствует движение	Левая сторона: небольшое движение	Левая сторона: двигается медленно	Обе стороны: двигаются симметрично
Симметричность предплечий (крыса вытягивает конечности, когда ее держат за хвост)	Левая сторона: отсутствует движение, отсутствует вытягивание конечностей	Левая сторона: небольшое движение, чтобы вытянуть конечности	Левая сторона: двигается и пытается вытянуть конечность меньше, чем с правой стороны	Симметричные вытягивания
Забирается по стенке проволочной клетки	—	Не удается забраться	Левая сторона слабая	Нормально забирается
Реакция на прикосновение к каждой стороне туловища	—	Отсутствует ответ с левой стороны	Слабый ответ с левой стороны	Симметричный ответ
Ответ на прикосновение вибриссы	—	Отсутствует ответ с левой стороны	Слабый ответ с левой стороны	Симметричный ответ

ишемии мозга статистически значимой разницы между правыми задними конечностями в группах ложнооперированных и ишемизированных крыс выявить не удалось ($p=0,06$). Данный тест не позволил эффективно оценить неврологический дефицит при используемой модели ишемии из-за большого разброса данных и низкой чувствительности.

При выполнении теста установки позы (Bracing test) (рис. 4, в, з) различий по количеству шагов-баллов в левых («не пострадавших») конечностях на протяжении 28-ми дней исследования по сравнению с группой ложнооперированных не было выявлено (рис. 4, в). В правых конечностях («пострадавших») на 2-е сутки отчетливо выявляется значимое различие ($p=0,006$) по количеству шагов-баллов между опытной группой и группой ложнооперированных — 5 (2; 5,5) и 10 (7; 10) шагов-баллов, соответственно (рис. 4, з). На 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни значимость различий между этими группами сохранялась ($p=0,02$, $p=0,004$, $p=0,04$ и $p=0,006$ соответственно). Разброс данных на 2-е сутки после ишемии мозга составил 74 %, что превышало разницу с группой сравнения. Большой разброс данных препятствовал эффективному использованию теста в исследованиях.

Применение углового теста (Corner test) в опытной группе животных позволило выявить, что количество поворотов головы было достоверно больше (рис. 4, д, е), чем в группе ложнооперированных ($p=0,0003$). Крысы на 2-е сутки после ишемии более активно поворачивали голову влево — «крыса смотрит на очаг» — 3 (1,5; 3,5) и 7 (6,5; 8,5) соответственно. По сравнению с группой ложнооперированных животных значимая разница сохранялась на 7-й и 14-й

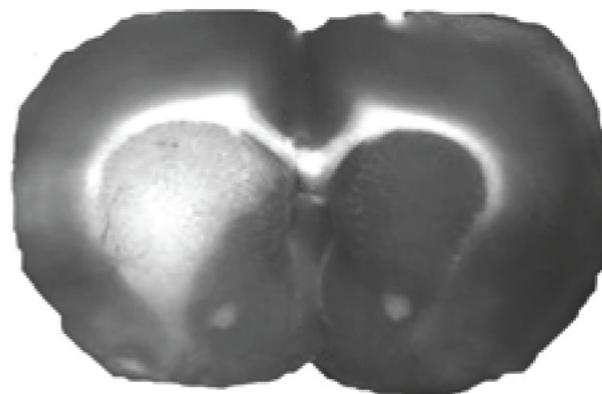


Рис. 2. Зона ишемического повреждения головного мозга крысы через 48 часов после 30-минутной окклюзии левой СМА по методике Коидзуми (окраска трифенилтетразолия хлоридом)

дни ($p=0,02$ и $p=0,03$ соответственно). На 21-й день по данному показателю животные в двух группах не отличались. Разброс данных в опытной группе на 2-е сутки составил 64 %, что превышало разницу между опытной группой и группой ложнооперированных (49 %).

Тест с вытягиванием лапы (Placing test) выявил парез передних лап. При оценке поражения левой стороны тела значимой разницы между группами животных не было получено (рис. 4, з). При оценке правой передней лапы (рис. 4, ж) выявлены статистически значимые различия ($p=0,00005$) между группами на 2-й, 7-й и 14-й дни. В отличие от всех вышеупомянутых тестов разброс данных в Placing test не превышал разницы между группами животных

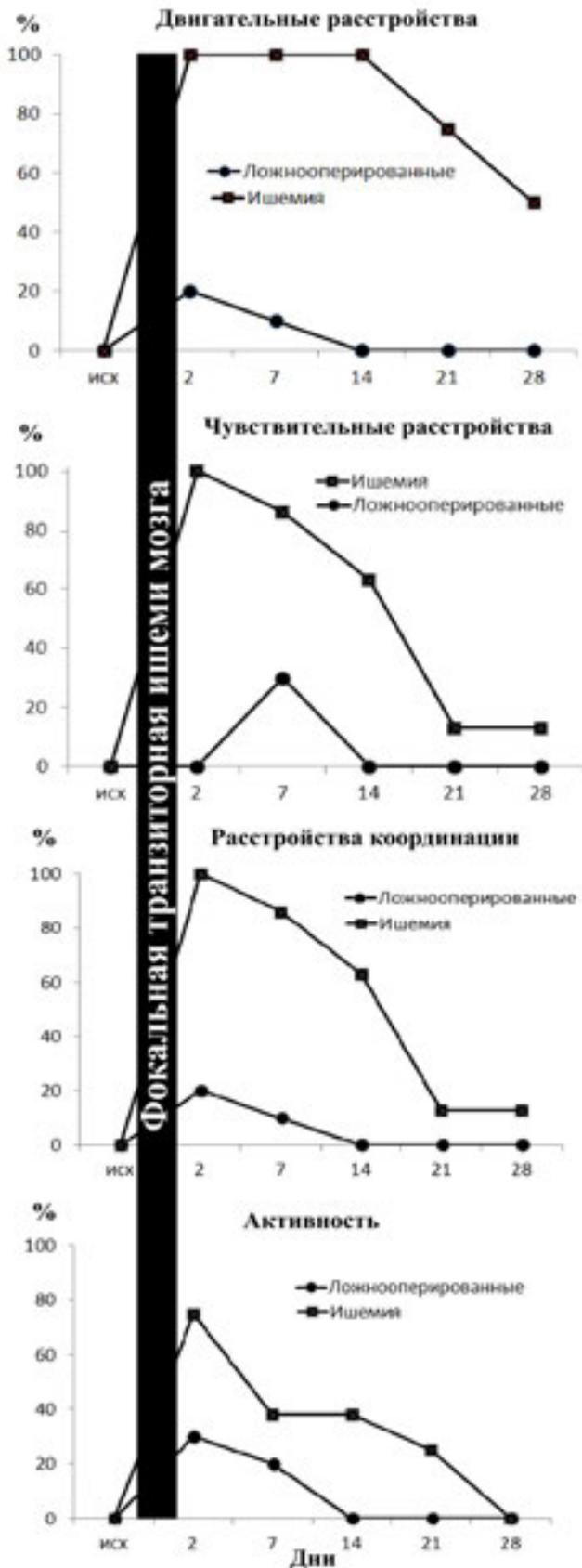


Рис. 3. Неврологический дефицит у крыс, оцененный без применения специализированных шкал в течение 28 дней после 30-минутной окклюзии левой СМА, в сравнении с ложнооперированными животными

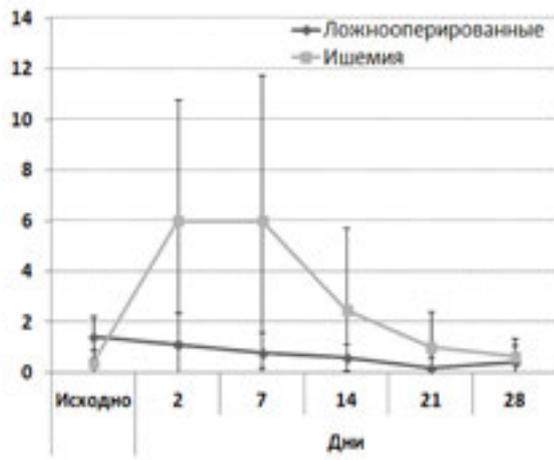
на 2-е, 7-е и 14-е сутки после операции. Но на 21-е и 28-е сутки неврологический дефицит по данному тесту не выявлялся.

Использование неврологической шкалы mNSS [14] позволило выявить максимальную степень неврологических расстройств в опытной группе на 2-е сутки (рис. 5) ($p=0,00005$), — 2,5 (2; 4) баллов. Ни у одного животного не было выявлено изменения рефлексов (Pinna-рефлекс и роговичный рефлекс) после ишемии. На 7-е и 14-е сутки происходило снижение неврологического дефицита до 1 (1; 3) и 1 (1; 1) балла со значимостью $p=0,00005$ и $p=0,0009$ по сравнению с группой ложнооперированных соответственно, а к 21-м суткам неврологический дефицит по шкале mNSS не выявлялся ($p=1,0$). Шкала mNSS позволила комплексно оценить неврологический дефицит в течение только 14-ти суток после моделирования 30-минутной ишемии мозга крысы. Недостатком шкалы являлся большой разброс данных.

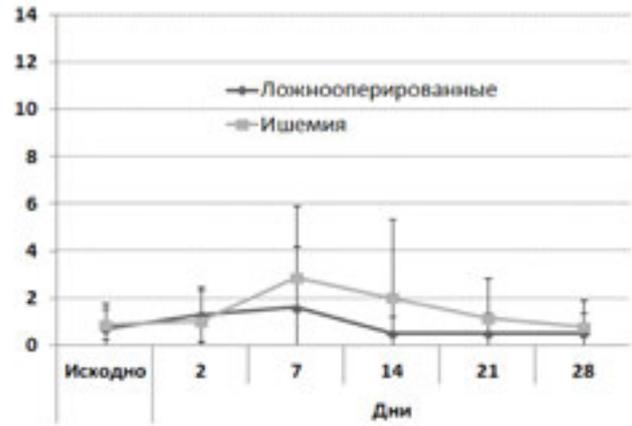
При использовании Бедерсон-теста (Bederson test) максимальные неврологические расстройства в опытной группе выявлялись на 2-е сутки (рис. 6), что достоверно отличалось от показателей группы сравнения ($p=0,00005$) и составляло 2 (2; 3) и 0 (0; 0) баллов, соответственно. На 7-е и 21-е сутки происходило снижение неврологического дефицита до 2 (1; 2,5) и 1 (1; 1,5) балла со значимостью $p=0,00005$ и $p=0,0008$ по сравнению с ложнооперированной группой соответственно, а к 28-м суткам неврологический дефицит по Бедерсон-тесту не выявлялся. Таким образом, данный тест позволил комплексно оценить неврологический дефицит в течение 21-го дня после моделирования 30-минутной ишемии мозга крысы. Однако недостатком теста также являлся большой разброс данных (22 %), поэтому, если смоделировать ситуацию использования данного теста для оценки лечебного эффекта нейропротективных вмешательств, то, согласно нашим расчетам, Бедерсон-тест позволит выявить только значимый эффект с регрессом неврологического дефицита более 25 %.

Шкала Гарсия [16] позволила выявить (рис. 7) двигательные, чувствительные нарушения и снижение активности на 2-е сутки — 13,5 (12,5; 14) балла, что достоверно ($p=0,00005$) отличалось от показателей группы ложнооперированных крыс — 18 (17; 18). На 21-е сутки происходило снижение ($p=0,0133$) неврологического дефицита до 15 (14; 16) баллов ($p=0,006$ по сравнению с группой сравнения), а к 28-м суткам неврологический дефицит по шкале Гарсия не выявлялся ($p=0,083$ по сравнению с группой ложнооперированных). Шкала Гарсия позволила комплексно оценить неврологический дефицит в течение 21-х суток после моделирования 30-минутной ишемии мозга крысы. В отличие от всех вышеупомянутых тестов, шкала Гарсия имеет наименьший разброс данных — 12 %.

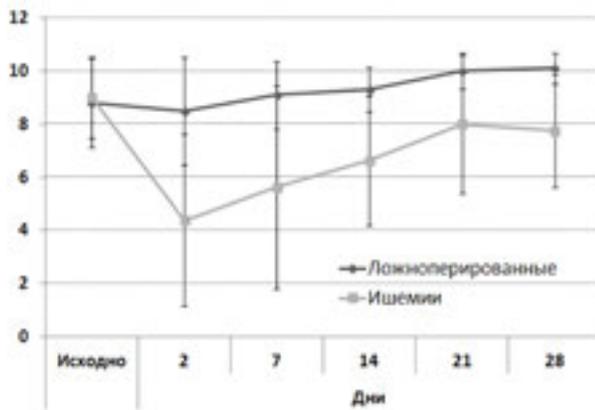
Неврологический дефицит у крыс после 30-минутной окклюзии СМА сохранялся достаточно длительный срок. Однако двигательный дефицит у крыс восстанавливался достаточно быстро, и к 28-му дню после экспериментального инсульта имеющиеся неврологические расстройства не влияли на



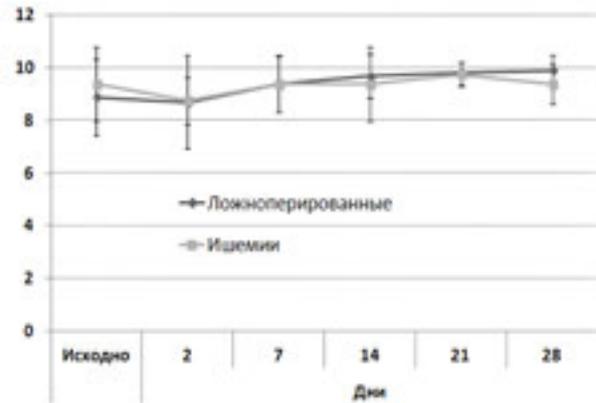
а



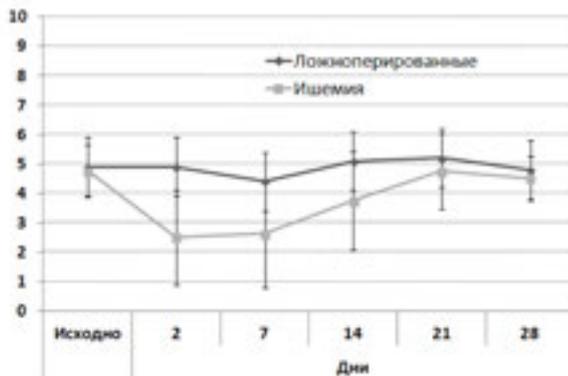
б



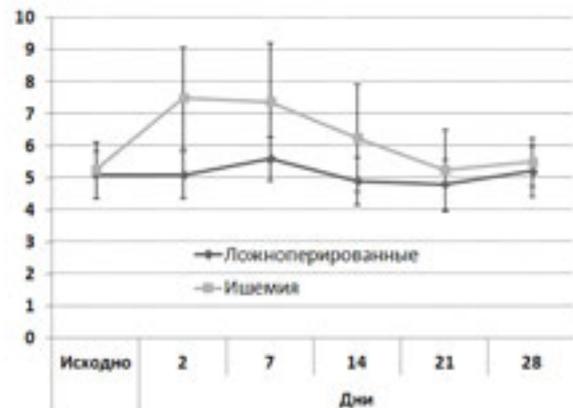
в



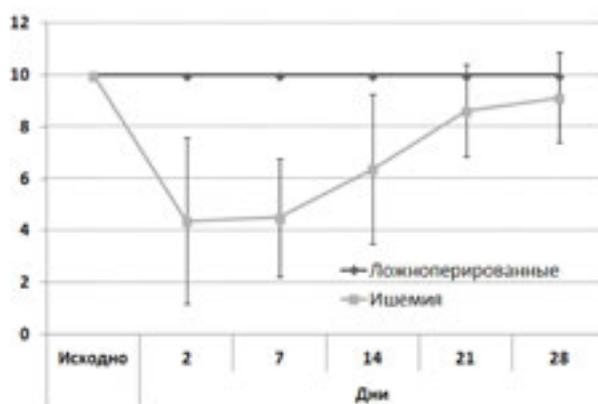
г



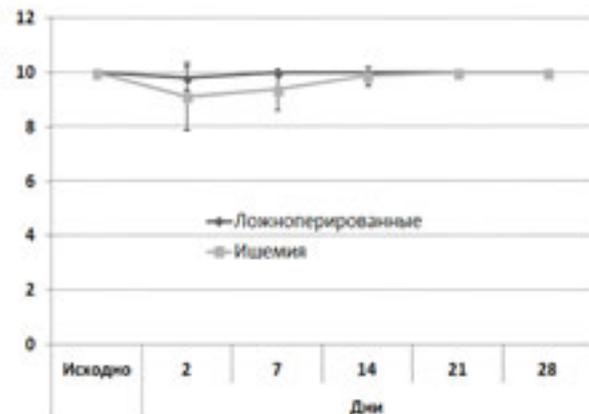
д



е



ж



з

Рис. 4. Тест «хождение по балке» (Ledge Tapered Beam) (а, б); тест установки позы (Bracing test) (в, г); угловой тест (Corner test) (д, е); тест с вытягиванием лапы (Placing test) (ж, з) у крыс в течение 28 дней после 30-минутной окклюзии левой СМА в сравнении с ложнооперированными животными

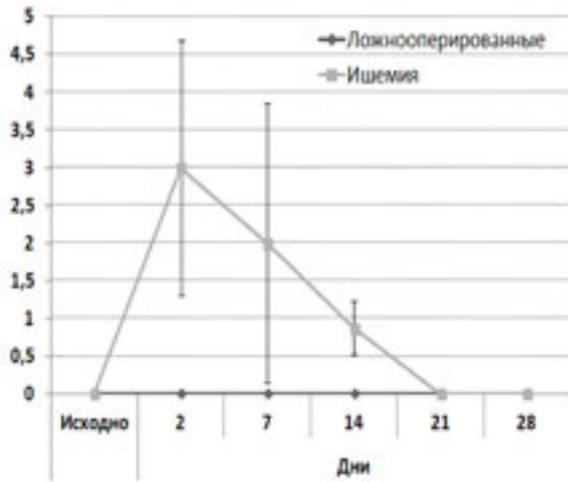


Рис. 5. Оценка неврологического дефицита по шкале mNSS в течение 28 дней после 30-минутной окклюзии левой СМА в сравнении с ложнооперированными животными

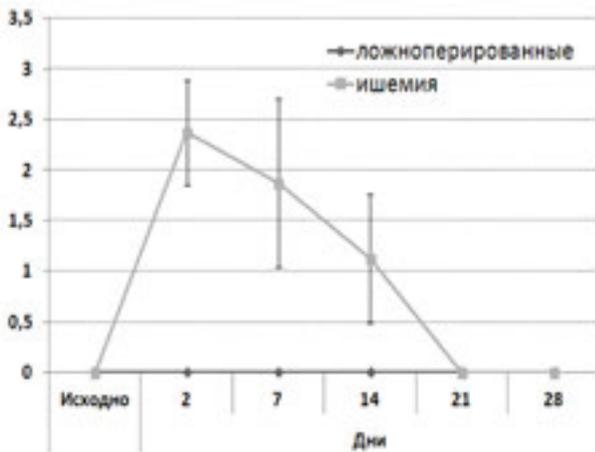


Рис. 6. Оценка неврологического дефицита по Бедерсон-тесту в течение 28 дней после 30-минутной окклюзии левой СМА по методике Коидзуми в сравнении с ложнооперированными животными

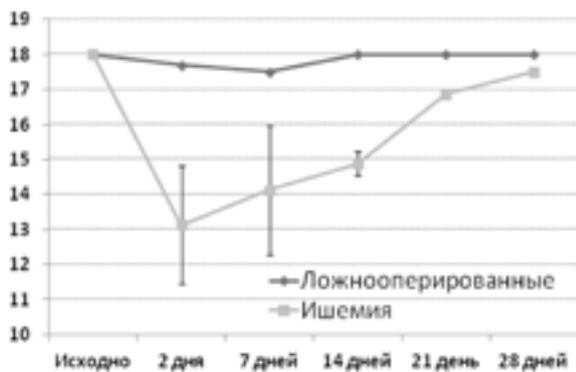


Рис. 7. Оценка неврологического дефицита по шкале Гарсия в течение 28 дней после 30-минутной окклюзии левой СМА в сравнении с ложнооперированными животными

«обычную» двигательную активность. Поэтому все использованные в данной работе тесты позволили оценить неврологический дефицит только в течение не более 28 дней. Далее по любому из тестов неврологический дефицит не выявлялся. Можно предположить, что у крыс, по аналогии с человеком, в результате 30-минутной окклюзии СМА развивался «малый инсульт», т. е. с полным восстановлением нарушенных функций.

При исследовании новых лекарственных средств или нейропротективных технологий важным является выявление даже незначительного терапевтического эффекта. Это приобретает особую значимость при изучении механизмов действия мультимодальных лекарственных средств, у которых имеется несколько путей защитного влияния на головной мозг, и доля каждого из механизмов в развитии защитного эффекта может быть различной по размеру. Поэтому выбор правильной модели и системы оценки этого эффекта может быть критическим, поскольку положительный терапевтический эффект может быть не замечен при низкой чувствительности теста. При создании шкалы или неврологического теста должен быть использован большой диапазон значений.

В настоящем исследовании мы получили данные, что часть существующих тестов регистрировала небольшую разницу значений (в один-два балла) по сравнению с ложнооперированными, что позволяет выявить только значимый терапевтический эффект в 50 % и более, в случае его наличия. Если терапевтический эффект составит 10–20 %, данные тесты не покажут разницы и результат окажется негативным или недостоверным. Из всех изученных нами тестов наиболее чувствительными оказались шкала Гарсия, тест с вытягиванием лапы (Placing test) и Бедерсон-тест (Bederson test).

Выводы

1. При фокальной транзиторной 30-минутной ишемии головного мозга крысы развиваются поведенческие нарушения и очаговый неврологический дефицит в виде силовых, чувствительных и координационных нарушений, а также снижения двигательных нарушений, которые постепенно регрессируют к 28-м суткам. То есть данная модель ишемии у крыс позволяет воспроизводить ишемический инсульт с регрессом неврологических симптомов в течение месяца.

2. Все предложенные тесты позволяют выявить и количественно оценить неврологический дефицит у крыс. Наиболее чувствительными и репрезентативными оказались шкала Гарсия, тест с вытягиванием лапы (Placing test) и Бедерсон-тест (Bederson test).

3. Требуется разработка специфичных для крыс тестов для оценки неврологического дефицита, основанных на видовых особенностях используемых лабораторных животных и обладающих высокой чувствительностью.

Литература

1. Власов Т. Д., Байса А. Е., Шмонин А. А. и др. Защитный эффект ишемического preconditionирования при фокальной ишемии головного мозга крысы различной продолжительности // *Клин. патофизиол. СПб.*, 2008. №1. С. 54–57.
2. Коган А. Б., Косицкий Г. И., Кураев Г. А., Чораян О. Г. Физиология человека и животных: общая и эволюционно-экологическая. М.: Высшая школа, 1984. 360 с.
3. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г., Власов Т. Д. Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии // *Морфология*. 2012. Т. 141. № 2. С. 28–32.
4. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Байса А. Е., Власов Т. Д. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии // *Бюлл. эксперимент. биол. и мед.* 2009. Т. 147. № 2. С. 217–219.
5. Ноздрачев А. Д., Поляков Е. Л. Анатомия крысы. СПб.: Лань, 2001. 464 с.
6. Руководством по уходу и использованию лабораторных животных / Национальный ин-т здоровья. США. № 85-23.
7. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. 832 с.
8. Шмонин А. А. Перевязка средней мозговой артерии крысы: сравнение модификаций моделей фокальной ишемии мозга // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2011. №3. С. 68–76.
9. Шмонин А. А., Байса А. Е., Мельникова Е. В. и др. Защитные эффекты раннего ишемического preconditionирования при фокальной ишемии мозга у крыс: роль коллатерального кровообращения // *Росс. физиолог. журн. им. Сеченова*. 2011. Т. 97. № 2. С. 203–213.
10. Шмонин А. А., Мельникова Е. В., Чурилова И. В., Власов Т. Д. Экспериментальное исследование нейротропных свойств альфа-липоевой кислоты и супероксиддисмутазы при ишемии мозга у крыс // *Росс. физиолог. журн. им. Сеченова*. 2011. Т. 97. №1. С. 65–71.
11. Эккерт Р., Рэндалл Д., Огастин Д. Физиология животных. Механизмы адаптации. М.: Мир, 1991. 424 с.
12. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008 // *Cerebrovasc Dis.* 2008. № 25(5). P. 457–507.
13. Bederson J. B., Pitts L. H., Tsuji M. et al. Rat middle cerebral artery occlusion Evaluation of the model and development of a neurological examination // *Stroke*. 1986. № 17. P. 472–476.
14. Chen J. Zhang C., Jiang H., Li Y. et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005. № 25. P. 281–290.
15. Culebras A. Stroke is preventable catastrophic disease // *Журн. неврол. и психиатрии*. С. С. Корсакова (Прил. к журн. «Инсульт») // *Материалы II Росс. междунард. конгр. «Цереброваскулярная патология и инсульт»*. 2007. С. 75–76.
16. Garcia J. H., Wagner S., Liu K. F., Hu X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation // *Stroke*. 1995. Vol. 26. № 4. P. 627–634.
17. Hua Y., Schallert T., Keep R. F. et al. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat // *Stroke*. 2002. № 33. P. 2478–2484.
18. Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area // *Jpn. J. Stroke*. 1986. Vol. 8. P. 1–8.
19. Schallert T., Upchurch M., Lobaugh N. et al. Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage // *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 1982. № 16. P. 455–462.
20. Schallert T., Woodlee M. T. Orienting and placing. In *In the Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests* / eds by I. Wishaw, B. Kolb. Oxford: Oxford University Press, 2005. P. 129–140.
21. Shmonin A. A., Melnikova E. V., Galagudza M. M., Vlasov T. D. The characteristics of cerebral ischemia in major rat stroke models of middle cerebral artery ligation through craniectomy // *International Journal of Stroke*. 2012. doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00947.x.

UDK [616.831-005.4:616.8]-092.4

Dayneko A. S.¹, Shmonin A. A.^{1,2}, Shumeeva A. V.¹, Kovalenko E. A.¹, Melnikova E. V.¹, Vlasov T. D.^{1,2}

Assessment of neurological deficit in the early and late phase after a 30-minute of focal cerebral ischemia in rats

¹ *First Saint Petersburg I.P. Pavlov State Medical University*

² *V.A. Almazova Federal Heart, Blood and Endocrinology center, Saint Petersburg e-mail: langendorff@gmail.com*

Abstract

Our aim was to test several methods of the neurological deficit assessment and identify the most sensitive of them in the early and late phase after a of focal cerebral 30-minute ischemia in rats. For experimental model we applied the method of transient 30-minutes occlusion of right MCA by Koizumi. Arterial blood flow was registered in the area of left MCA vascularization with use of high-frequency ultrasound Doppler flowmetry. We used the following neurological tests: Ledged Tapered Beam, Bracing test, Corner test, Placing test, Modified Neurological Severity Scores, Bederson test and Garcia scale at 2, 7, 14, 21 and 28 days after ischemia. All of the proposed tests can identify and quantify the neurological deficit in rats up to 21 days post-ischemic period. At the 28th days after ischemia focal neurological deficit regressed. Garcia scale, Placing test and Bederson test were the most sensitive and representative of the neurological deficit assessment methods.

Keywords: cerebral ischemia, rat, neurological deficit, Placing test, Bederson test, Garcia scale.

References

1. Vlasov T. D., Bajsa A. E., Shmonin A. A. et al. Zashhitnyj jeffekt ishemicheskogo prekondicionirovanija pri fokal'noj ishemii golovnogo mozga krysy razlichnoj prodolzhitel'nosti // *Klinicheskaja patofiziologija. Saint-Petersburg.*, 2008. no 1. P. 54–57. [Protective effect of an ischemic precondition at focal rat 's brain ischemia of various duration] (In Russian).
2. Kogan A. B., Kosickij G. I., Kuraev G. A., Chorajan O. G. *Fiziologija cheloveka i zhivotnyh: obshhaja i jevoljucionno-jeologicheskaja. M.: Vysshaja shkola, 1984. 360 p.* [Human physiology and animals: the general and evolutionary and ecological.] (In Russian).
3. Korzhhevskij D. Je., Kirik O. V., Suhorukova E. G., Vlasov T. D. Structural organization of striatal microgliaocytes following focal ischemia // *Morfologija. 2012. V. 141. no 2. P. 28–32.* (In Russian).
4. Korzhhevskij D. Je., Kirik O. V., Bajsa A. E., Vlasov T. D. Simulation of unilateral ischemic injury to the striatal neurons inflicted by short-term occlusion of the middle cerebral artery *Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2009. V. 147. no 2. P. 255–256.*
5. Nozdrachev A. D., Poljakov E. L. *Anatomija krysy. SPb.: Lan', 2001. 464 s.* [Rat's anatomy]. (In Russian).
6. *Rukovodstvom po uhodu i ispol'zovaniju laboratornyh zhivotnyh / Nacional'nyj in-t zdorov'ja. USA no 85-23.*
7. Habriev R. U. *Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv. 2-e izd., pererab. i dop. M.: Medicina, 2005. 832 s.* [Tutorial of experimental (preclinical) research for new pharmacological drugs]. (In Russian).
8. Shmonin A. A. Perevjazka srednej mozgovoj arterii krysy: sravnenie modifikacij modelej fokal'noj ishemii mozga // *Regionarnoe krovoobrashhenie i mikroциркуляция. 2011. no 3. P. 68–76.* [Bandaging of middle brain rat artery: comparison of modifications of models of focal brain ischemia] (In Russian).
9. Shmonin A. A., Bajsa A. E., Melnikova E. V. et al. Zashhitnye jeffekty rannego ishemicheskogo prekondicionirovanija pri fokal'noj ishemii mozga u krysy: rol' kollateral'nogo krovoobrashhenija // *Ross. fiziolog. zhurn. im. Sechenova. 2011. V. 97. no 2. P. 203–213.* [Protective effects of an early ischemic precondition at focal ischemia of rat brain: role of collateral blood circulation. (In Russian).
10. Shmonin A. A. Melnikova E. V., Churilov I. V., Vlasov T. D. Jeksperimental'noe issledovanie nejroprotektivnyh svojstv al'fa-lipoevoj kisloty i superoksiddismutazy pri ishemii mozga u krysy // *Ross. fiziolog. zhurn. im. Sechenova 2011. V. 97. no 1. P. 65–71.* [Pilot study of neuroprotective properties alpha lipoic acids and superoxide dismutase at rat's brain ischemia]. (In Russian).
11. Ekkert R., Randall D., Augustin D. *Animal physiology. Mechanisms and adaptation. M.: M.: World, 1991. 424 p.*
12. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008 // *Cerebrovasc Dis. 2008. no 25 (5). P. 457–507.*
13. Bederson J. B., Pitts L. H., Tsuji M. et al. Rat middle cerebral artery occlusion Evaluation of the model and development of a neurological examination // *Stroke. 1986. no 17. P. 472–476.*
14. Chen J. Zhang C., Jiang H., Li Y. et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2005. no 25. P. 281–290.*
15. Culebras A. Stroke is preventable catastrophic disease // *Zhurn. nevrolog. i psichiatr. im. S. S. Korsakova (Pril. k zhurn. «Insul'») // Materialy II Ross. mezhdunarod. kongr. «Cerebrovaskuljarnaja patologija i insul'». 2007. P. 75–76.*
16. Garcia J. H., Wagner S., Liu K. F., Hu X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation // *Stroke. 1995. Vol. 26. no 4. P. 627–634.*
17. Hua Y., Schallert T., Keep R. F. et al. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat // *Stroke. 2002. no 33. P. 2478–2484.*
18. Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area // *Jpn. J. Stroke. 1986. Vol. 8. P. 1–8.*
19. Schallert T., Upchurch M., Lobaugh N. et al. Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage // *Pharmacology Biochemistry & Behavior. 1982. no 16. P. 455–462.*
20. Schallert T., Woodlee M. T. Orienting and placing. In *In the Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests / eds by I. Whishaw, B. Kolb. Oxford: Oxford University Press, 2005. P. 129–140.*
21. Shmonin A. A., Melnikova E. V., Galagudza M. M., Vlasov T. D. The characteristics of cerebral ischemia in major rat stroke models of middle cerebral artery ligation through craniectomy // *International Journal of Stroke. 2012. doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00947.x.*