

# Поведенческое фенотипирование крыс при экспериментальном моделировании хронического нарушения мозгового кровообращения

Д.В. КУРКИН<sup>1, 6\*</sup>, Е.И. МОРКОВИН<sup>2, 5, 7</sup>, Д.В. ВЕРХОЛЯК<sup>3, 6</sup>, Н.А. ОСАДЧЕНКО<sup>2</sup>, И.Н. ТЮРЕНКОВ<sup>1, 6</sup>, В.И. ПЕТРОВ<sup>4</sup>

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»: <sup>1</sup>кафедра фармакологии и биофармации ФУВ; <sup>2</sup>кафедра фундаментальной медицины и биологии; <sup>3</sup>кафедра химии; <sup>4</sup>кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии; НИИ фармакологии ВолГМУ; <sup>5</sup>лаборатория психофармакологии; <sup>6</sup>лаборатория фармакологии сердечно-сосудистых средств; <sup>7</sup>Волгоградский медицинский научный центр, лаборатория геномных и протеомных исследований, Волгоград, Россия

**Цель исследования.** Описание моторных, адаптивных и когнитивных нарушений, возникающих у животных с хронической недостаточностью мозгового кровообращения, вызванной путем частичного стенозирования общих сонных артерий.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на 20 белых аутбредных крысах-самцах. Кровоток по сонным артериям ограничивался в среднем на 50—60%, а в головном мозге — на 40—45% от изначальных значений. Через 20 дней после операции психоневрологическое состояние животных оценивалось в следующих тестах: удержание на вращающемся стержне, открытое поле, распознавание нового объекта и в тесте защитной реакции закапывания стеклянных шариков.

**Результаты и заключение.** Было установлено, что спустя 20 дней после экспериментального моделирования стеноза общих сонных артерий у крыс выявляются достоверные признаки психоневрологического дефицита, проявляющиеся нарушениями координации, снижением локомоторной активности, исследовательского и защитного поведения. Это позволяет применять данную модель в исследованиях и поиске фармакологических путей коррекции хронических нарушений мозгового кровообращения.

**Ключевые слова:** хроническая недостаточность мозгового кровообращения, стеноз общих сонных артерий, экспериментальное моделирование, крысы, поведение, фенотипирование.

## Behavioral phenotyping in rats during the experimental modeling of chronic cerebral circulation disorder

D.V. KURKIN, E.I. MORKOVIN, D.V. VERKHOLIYAK, N.A. OSADCHENKO, I.N. TYURENKOV, V.I. PETROV

Volgograd State Medical University: Department of pharmacology and biological pharmacy; Department of fundamental medicine and biology; Department of chemistry; Department of clinical pharmacology and intensive care; VSMU research institute for pharmacology; laboratory for psychopharmacology; laboratory for pharmacology of cardiovascular drugs; Volgograd Medical Research Center, laboratory for genomic and proteomic researches, Volgograd, Russia

**Objective.** To describe motor, adaptive and cognitive disorders in rats with chronic cerebral circulatory deficiency caused by partial stenosis of the common carotid arteries (CCA). **Material and methods.** A study was performed on 20 white outbred male rats. This manipulation led to 40—45% and 50—60% reduction of blood flow in CCA and in the brain, respectively. Twenty days after operation, animal's condition was assessed in the following tests: open field test, rotarod performance test, marble burying test and novel object recognition. **Results and conclusion.** After 20 days of experimental CCA stenosis, animals demonstrated several signs of neuropsychiatric deficiency including coordination disorders, a decrease in locomotor activity as well as in explorative and protective behavior. The model of CCA partial stenosis could be used during further studies of the pathophysiology and pharmacology of chronic cerebral circulatory deficiency.

**Keywords:** chronic cerebral circulatory deficiency, CCA stenosis, experimental modeling, rats, behavior.

Хроническая недостаточность мозгового кровообращения (ХНМК) наряду с болезнями Паркинсона и Альцгеймера является ведущей причиной снижения когнитивных способностей человека. Нарушения памяти и адаптивных возможностей, возникающие при ХНМК, приводят к утрате способности к самообслуживанию, что сопровождается снижением эффективности терапии основных и сопутствующих заболеваний, повышает риск смер-

ти, инвалидизации и снижает качество жизни не только самого пациента, но и его родственников. Таким образом, разработка эффективных методов профилактики и лечения ХНМК представляется важной задачей современной медицины.

В то же время существующие методы экспериментального воспроизведения нарушений мозгового кровообращения, основанные на перевязке магистральных со-

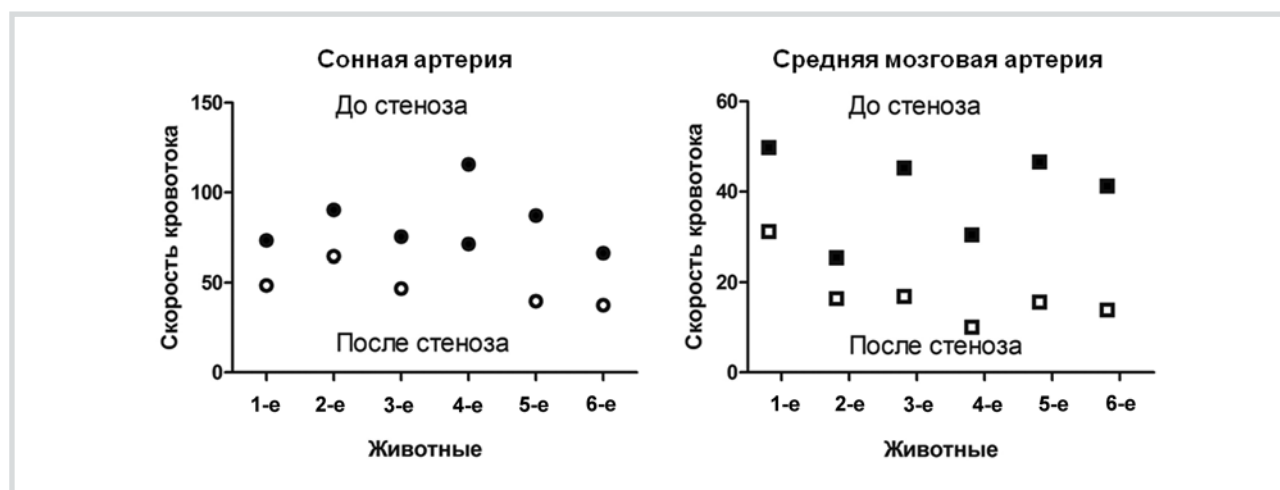


Рис. 1. Изменение скорости кровотока по средней мозговой артерии и сонной артерии после ее стенозирования.

Данные представлены в виде значений TPU (Tissue Perfusion Units; мл/мин/100 г) до и после проведения оперативного вмешательства (черные и белые символы соответственно).

судов, представляют собой модели острой ишемии. Несмотря на их широкое применение в экспериментальной фармакологии [1, 2], данные методы не позволяют в полной мере оценить эффекты ноотропных препаратов. Более того, моделирование острого нарушения мозгового кровообращения на фоне введения ноотропных препаратов противоречит идеям о внешней, предиктивной и конструктивной валидности используемой модели [3]. С этих позиций более перспективным становится моделирование ХНМК, обладающих большим сходством с естественными патологическими процессами [4].

Цель настоящей работы — описание моторных, адаптивных и когнитивных нарушений, возникающих у животных с ХНМК, вызванным стенозом общих сонных артерий.

## Материал и методы

Исследование выполнено на 20 белых аутбредных крысах-самцах (ФГУП ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская область, РФ, карантин 2 нед) в возрасте 6—7 мес, содержащихся в виварии НИИ фармакологии ВолгГМУ на инвертированном световом цикле (12/12 ч, свет включается в 20:00) и стандартном комбикормовом рационе (ГОСТ Р 51849-2001, ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия). Все эксперименты проводились с 10:00 до 18:00, в периоды максимальной активности животных. За сутки и за 2 ч до начала эксперимента животных переносили в экспериментальную комнату для 2-часовой габитуации к помещению лаборатории.

ХНМК вызывали путем частичного стенозирования общих сонных артерий (ОСА). В первой серии экспериментов ( $n=5$ ) наркотизированное животное (хлоралгидрат, в/бр, 400 мг/кг) фиксировали, область шеи выбривали, обрабатывали раствором хлоргексидина биглюконата 0,05%. Затем проводили разрез кожи по срединной линии шеи, рассекали подкожную фасцию, слюнную железу отодвигали, выделяли сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально — грудиноключично-сосцевидной мышцей и медиально — грудинок-

подязычной мышцей. Далее выделяли сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом, который орошали 2% раствором лидокаина. После выделения сонной артерии под нее подводили три лигатуры, располагаемые на расстоянии 2—3 мм друг от друга. Параллельно артерии закрепляли иглу (29G 1/2) от шприца (SFM Hospital Products GmbH), к которой привязывалась сонная артерия и которая затем убиралась таким образом, чтобы лигатуры оставались на заданном расстоянии. В результате описанных выше манипуляций кровоток по сонным артериям ограничивался в среднем на 50—60%, а в головном мозге — на 40—45% от изначальных значений.

Оценку уровня локального кровотока (ЛМК, у.е.) осуществляли до и после стенозирования сонной артерии в двух точках, сразу в месте после наложения лигатур и в проекции средней мозговой артерии (рис. 1). Регистрацию проводили с помощью лазерного доплерографа Biorac Systems, Inc. (США). Доступ к артерии создавался следующим образом: наркотизированному животному с использованием депиляционного крема удаляли шерстяной покров и кожный лоскут в верхней поверхности черепа, которая впоследствии скальпировалась. Далее с учетом стереотаксических координат, началом которых принималась точка Брегма, определялось место установки датчика (в проекции средней мозговой артерии), голова животного и датчик фиксировались в стереотаксической установке, трепанационное отверстие производилось конической зуботехнической фрезой. После операции животных выводили из эксперимента передозировкой хлоралгидрата (800 мг/кг внутривенно). Таким образом, нами было установлено, что ограничение кровотока по сонным артериям приводит к значительному снижению мозгового кровотока, который не восстанавливается в течение 80 мин.

В дальнейший эксперимент (вторая серия) брали животных ( $n=9$ ), которым проводились аналогичные описанным выше мероприятия по ограничению кровотока, но его регистрацию для визуализации и последующей стандартизации стеноза осуществляли только в сонных артериях. После чего рану послойно ушивали, обрабатывали 0,05% рас-

твором хлоргексидина биглюконата и 5% раствором йода, животных переносили в «домашние» клетки.

Интактная группа животных, аналогичных по весу, полу и возрасту, состояла из 6 особей.

Через 20 дней после операции психоневрологическое состояние животных оценивалось в следующих тестах: удержание на вращающемся стержне, открытое поле, распознавание нового объекта и в тесте защитной реакции закапывания стеклянных шариков.

Тест удержания на вращающемся стержне, применяемый для оценки двигательного-координационных нарушений, проводился с использованием АПК «Ротарод+» (ООО «Нейроботикс», Россия) без предшествовавшего обучения животных. После трехкратного помещения на стержень вычислялись среднее время удержания и среднее пройденное расстояние для каждого животного.

Оценка двигательной активности проводилась в «норковой» модификации установки «Открытое поле» (квадрат, 80×80 см) в течение 5 мин для каждого животного. Подсчитывались следующие показатели: время, проведенное в центральной зоне, общее время неподвижности, количество переходов между квадратами поля (25 шт.), количество заглядываний в отверстия (16 шт.), количество вертикальных стоек и общая продолжительность гринга [5].

Тест распознавания нового объекта проводился на следующие сутки после габитуации животных в «Открытом поле». Данный тест основан на большей привлекательности новых объектов для грызунов и может отражать как когнитивный дефицит, так и тревожность животных, одним из компонентов которой выступает неophobia [6]. Эксперимент проходил в две сессии, разделенные 24-часовым интервалом, каждая сессия включала 10-минутные этапы ознакомления с объектами и распознавания нового объекта. Для фазы ознакомления подбирались пары одинаковых объектов, один из которых заменялся на кардинально новый (отличающийся по цвету, форме и текстуре) в фазе распознавания. Подсчитывались длительность исследования каждого из объектов и суммарная продолжительность исследования.

Тест закапывания стеклянных шариков представляет собой модель неophobia, тревоги и обсессивно-компульсивного поведения. При проведении данного теста животное помещают в пространство, полностью соответствующее их «домашней» клетке, однако некоторые элементы привычного окружения отсутствуют (запах, «соседи» и т.д.), а вместо них добавляются чужеродные объекты (стеклянные шарики). В результате животное вынуждено проявлять естественную защитную реакцию закапывания, обживая клетку [7]. Исследование проводилось через сутки после завершения теста распознавания нового объекта, при этом были использованы клетки типа Т/4, содержащие 5 см свежего подстилочного материала, поверх которого выкладывалось 40 стеклянных шариков диаметром 1,5 см, располагавшихся на расстоянии 4 см друг от друга. Исходный паттерн фотографировался, после чего в клетку помещалось тестируемое животное. Через 30 мин животное извлекали и фотографировали конечное состояние подстилки. При сравнении фотографий учитывалось количество закопанных более чем на  $\frac{2}{3}$  шариков, а также количество смещенных и нетронутых шариков (рис. 2).

Проведение всех поведенческих тестов сопровождалось видеорегистрацией при помощи веб-камеры и пер-

сонального компьютера, видеоматериалы анализировались после завершения тестов с помощью программы RealTimer (ООО НПК «Открытая Наука», Россия). Статистическая обработка производилась с помощью программ MS Excel («Microsoft», США), GraphPad Prism 5.0 («GraphPad Software Inc.», США) и Statistica 8.0 («StatSoft», США); проверка распределения на нормальность осуществлялась по критерию Колмогорова—Смирнова. При сравнении двух независимых групп данных различия оценивались с помощью *t*-критерия Стьюдента и критерия Манна—Уитни (при нормальном и отличающемся от нормального распределении соответственно). При сравнении большего количества групп данных, использовался одно- и многофакторный дисперсионный анализ с *posthoc*-тестом Ньюмена—Кеулса.

## Результаты и обсуждение

После моделирования стеноза велось пристальное наблюдение за общим состоянием животных (их подвижность, чистота шерстяного покрова, реакция на внешние раздражители, наличие симптомов неврологического дефицита), в ходе которого было обнаружено отсутствие видимых изменений психоневрологического статуса.

Через 20 дней после операции у животных со стенозом ОСА было обнаружено нарушение координации движений, что подтверждалось достоверным ( $p < 0,05$ ) сокращением расстояния, пройденного в тесте удержания на вращающемся стержне, на 50% по сравнению с контрольной группой (рис. 3, а). Также в опытной группе была выявлена тенденция ( $p = 0,06$ ) к сокращению общего времени удержания в данном тесте. Результат этого теста свидетельствует о наличии выраженного нарушения координации движений, проявляющегося в неспособности животных с редуцированным мозговым кровотоком удерживаться на вращающемся стержне на уровне интактных животных.

В «норковой» модификации теста «Открытое поле» у животных с экспериментальным стенозом ОСА было выявлено достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение двигательной и исследовательской активности, не сопровождавшееся достоверным снижением времени нахождения в центре по сравнению с интактными животными (см. рис. 3, б). Оперированные животные с такой же скоростью, как и интактные, покидали центральную зону тестовой установки, но в дальнейшем их исследовательская и двигательная активности значительно снижались.

В двухсессионном тесте распознавания новых объектов достоверных различий между группами обнаружено не было, что может говорить об отсутствии нарушений кратковременной памяти в экспериментальной группе, однако это сопровождалось тенденцией к пониженной исследовательской активности на протяжении всего теста (см. рис. 3, в).

В тесте защитной реакции закапывания стеклянных шариков в контрольной группе отмечалось достоверное ( $p < 0,001$ ) превалирование количества закопанных шариков над количеством нетронутых (см. рис. 3, г). В группе с экспериментальной патологией, напротив, наблюдалось резкое угасание данной защитной реакции, что может быть связано с нарушением функционирования гиппокампа [7].

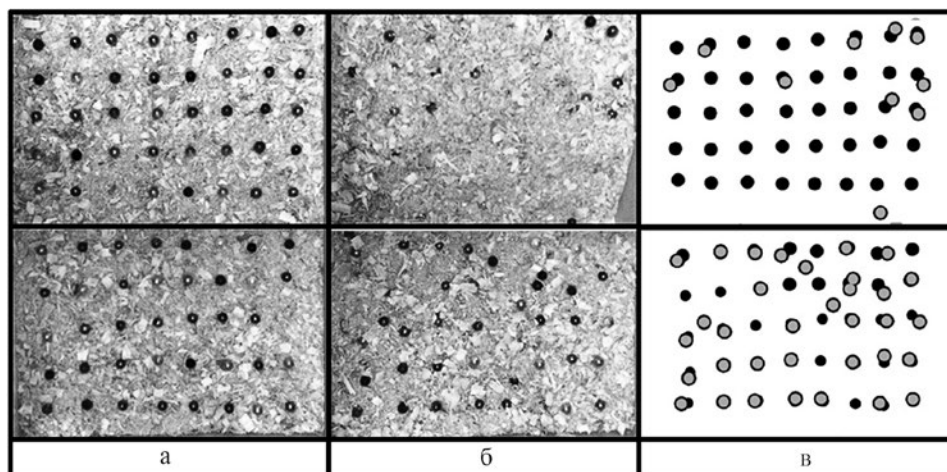


Рис. 2. Тест защитной реакции закапывания.

Верхний ряд — интактное животное, нижний — животное с экспериментальным стенозом ОСА; а — исходный паттерн; б — результат теста; в — картина, полученная после обработки и совмещения изображений с помощью графического редактора.

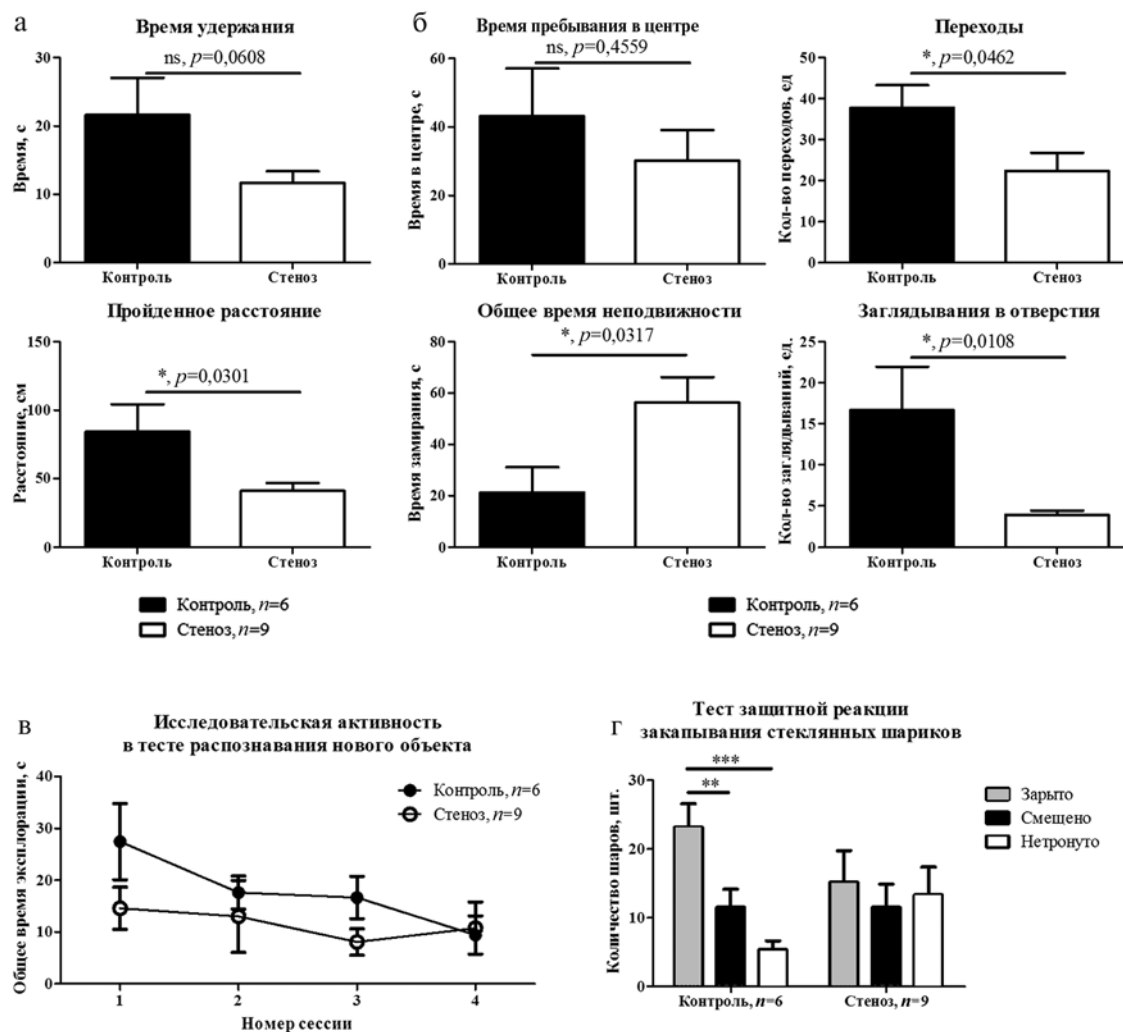


Рис. 3. Основные результаты тестов.

Удержание на вращающемся стержне (а); активность в тесте «Открытое поле» (б); исследовательская активность в тесте распознавания нового объекта (в); защитная реакция закапывания стеклянных шариков (г). \* —  $p<0,05$ ; \*\* —  $p<0,01$ ; \*\*\* —  $p<0,001$ .

## Заключение

В ходе данного исследования было установлено, что через 20 дней после экспериментального моделирования стеноза ОСА у крыс в расширенной панели поведенческих тестов выявляются достоверные признаки психоневрологического дефицита, проявляющиеся нарушениями координации, снижением локомоторной активности, ис-

следовательского и защитного поведения. Таким образом, данная модель может быть применена в исследованиях ХНМК, деменций сосудистого происхождения, а также в поиске фармакологических путей коррекции нарушенного психоневрологического дефицита.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Тюренок И.Н., Волотова Е.В., Куркин Д.В., Мазина Н.В., Бакулин Д.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А. Нейропротективное и антиоксидантное действие нейроглутама при церебральной ишемии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015;159(3):344-347. [Tyurenkov IN, Volotova EV, Kurkin DV, Mazina NV, Bakulin DA, Logvinov IO, Antipova TA. Neuroprotective and antioxidant effects of neuroglutamate in cerebral ischemia. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2015;159(3):365-367. (In Russ.)].
2. Тюренок И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В. Изучение нейропротективного действия нового производного глутаминовой кислоты — нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2014;77(9):8-12. [Tyurenkov IN, Kurkin DV, Bakulin DA, Volotova EV. Studying the neuroprotective effect of the novel glutamic acid derivative neuroglutamate on focal cerebral ischemia in rats. *Exsperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya*. 2014;77(9):8-12. (In Russ.)].
3. *Фармакология поведения: Хрестоматия*. Под ред. Беспалова А.Ю., Звартау Э.Э., Бридсли П., Катца Дж. СПб.: Изд-во СПбГМУ. 2013. [Bespalov AY, Zvartau EE, Bridsli P, Katz J, eds. *Pharmacology behavior: chrestomathy*. SPb.: Publisher of Saint-Petersburg State Medical University. 2013. (In Russ.)].
4. Hattori Y, Enmi J, Kitamura A, Yamamoto Y, Saito S, Takahashi Y, Iguchi S, Tsuji M, Yamahara K, Nagatsuka K, Iida H, Ihara M. A novel mouse model of subcortical infarcts with dementia. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(9):3915-3928. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3970-14.2015>
5. Тюренок И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Литвинов А.А., Бакулин Д.А. Влияние различных композиций фенибута с органическими кислотами на неврологический, когнитивный и поведенческий дефицит у крыс при фокальной ишемии головного мозга. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2012;115(8):61-63. [Tyurenkov IN, Kurkin DV, Volotova EV, Litvinov AA, Bakulin DA. Effect of organic acid compositions of phenibut on neurological, cognitive and behavioral deficit in rats with focal ischemic brain damage. *Sibirskij Medicinskij Zhurnal (Irkutsk)*. 2012;115(8):61-63. (In Russ.)].
6. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study «recognition memory». *Nature Protocols*. 2006;1(1):1306-1311. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>
7. Deacon RM. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols*. 2006;1(1):122-124. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.20>