

Развитие периферической сенсорной гиперсенситизации после глобальной ишемии головного мозга у крыс (краткое сообщение)

В.А. Кашкин^{1,2}, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, ORCID 0000-0002-7202-0233,
С.С. Арутюнян¹, старший лаборант

¹Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова;
Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8;

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Россия, 194223, Санкт-Петербург, ул. Мориса Тореза, д. 44

E-mail: kashkinv@gmail.com

Резюме. Известно, что в постинсультном периоде происходит формирование когнитивных нарушений, а также наблюдается развитие хронического болевого синдрома, вызванного снижением сенсорных порогов первичных афферентов и гиперсенситизацией нервных волокон. Изучена возможность оценки гиперсенситизации путем измерения изменений тактильной чувствительности у крыс при моделировании экспериментального инсульта, вызванного билатеральной окклюзией общих сонных артерий у крыс. После моделирования глобальной ишемии головного мозга у животных наблюдается повышение чувствительности к тактильной стимуляции плантарной поверхности тазовых конечностей, что свидетельствует о развитии тактильной аллодинии – состояния, при котором возникает болевая реакция на стимул, ранее не вызывающий такой реакции. Препаратом позитивного контроля служил мемантин, который оказывает выраженное лечебное действие в отношении когнитивных нарушений и способствует восстановлению нервной ткани, что было показано на экспериментальных моделях ишемии. Мемантин привел к нормализации порогов тактильной реактивности животных. Таким образом, оценка тактильной аллодинии при моделировании экспериментальной ишемии мозга у крыс может быть использована как дополнительный контролируемый количественный показатель при изучении фармакологической активности лекарственных кандидатов, предназначенных для лечения нарушений мозгового кровообращения.

Ключевые слова: тактильная аллодиния, глобальная ишемия головного мозга, экспериментальные модели.

Для цитирования: Кашкин В.А., Арутюнян С.С. Развитие периферической сенсорной гиперсенситизации после глобальной ишемии головного мозга у крыс (краткое сообщение). *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019; 4. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-11>

Peripheral sensory hypersensitization development after global cerebral ischemia in rats

V. Kashkin^{1,2}, ORCID 0000-0002-7202-0233,
S. Arutyunyan¹

¹Valdman Institute of Pharmacology, First Pavlov State Medical University, St.-Petersburg, 197022, Russia

²Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg, 194223, Russia

E-mail: kashkinv@gmail.com

Summary. It is known that in the post-stroke period is characterized by the cognitive deficit and the development of chronic pain syndrome caused by reduction of sensory thresholds of the primary afferents and hypersensitization of nerve fibers. In the present work, we studied the possibility of hypersensitization evaluation by tactile sensitivity measuring in rats after global cerebral ischemia caused by bilateral occlusion of the common carotid arteries. It has been shown that global cerebral ischemia resulted in increased sensitivity to plantar tactile stimulation, which indicates the development of tactile allodynia defined as pain due to a stimulus that does not normally provoke pain. Memantine, which has cognitive-enhancing potential and reduces neuronal damage in global and focal animal models of brain ischemia, has been used as a positive control drug. Memantine treatment resulted in tactile reactivity normalization. Thus, the assessment of tactile allodynia in modeling experimental cerebral ischemia in rats can be used as an additional quantitative marker to estimate the pharmacological activity of drug candidates intended for the treatment of cerebrovascular disorders.

Key words: tactile allodynia, global cerebral ischemia, experimental model

For citation: Kashkin V.A., Arutyunyan S.S. Peripheral sensory hypersensitization development after global cerebral ischemia in rats. *Laboratory Animals for Science*. 2019; 4. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-11>

Введение

Для изучения механизмов обучения, памяти и внимания, а также для исследования эффективности потенциальных лекарственных препаратов критически важен корректный выбор экспериментальных моделей. В эксперименте изучение когнитивных функций может проводиться как на здоровых, интактных животных, так и на животных с модельной патологией. 1-й подход – изучение когнитивных функций на здоровых животных – применим для оценки эффективности ноотропных препаратов, которые обладают способностью улучшать процессы обучения и памяти, когнитивные, интеллектуальные функции. Обычно эксперимент выполняется так, чтобы в ходе процесса повышалась сложность выполняемой задачи. Именно влияние на успешность решения усложненной задачи является мерой эффективности исследуемого препарата.

Однако изучение эффективности ноотропных препаратов на здоровых животных не позволяет оценить их терапевтическое влияние при патологических изменениях. С этой целью применяются различные экспериментальные подходы, моделирующие нейротравму. К сожалению, существующие модели не могут в полной мере отразить весь спектр когнитивных функций человека. Это относится к моделям, которые воспроизводят дефицит когнитивной функции, и в которых поведение интерпретируется в терминах обучения и памяти. Поэтому для изучения эффективности новых лекарственных кандидатов используется широкий арсенал методологических подходов, поскольку, взятые отдельно, они воспроизводят лишь часть симптоматики, наблюдаемой в клинике.

Одной из широко используемых моделей, которые воспроизводят нарушение мозгового кровообращения, является модель ишемического инсульта, индуцированного билатеральной окклюзией общих сонных артерий у крыс. При изучении эффективности препаратов успешность проведенного исследования во многом зависит от выбора подходящего метода тестирования. Для оценки постинсультных повреждений когнитивных функций часто применяются такие тесты, как «Водный лабиринт Морриса» или тест «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ), с помощью которых оценивают процессы, связанные с обучением и с воспроизведением памятного следа.

Данные тесты служат методом выбора при тестировании веществ, которые могут обладать специфическим позитивным влиянием на высшие интегративные функции мозга (ноотропное действие) [1–3]. Однако результаты тестирования в не-

которых случаях не позволяют дать точный ответ о специфическом воздействии лекарственного кандидата в отношении именно высших интегративных функций мозга. Например, при тестировании животных с модельной патологией (например, глобальная ишемия) в «Водном лабиринте Морриса» нельзя исключить того, что вызванные инсультом нарушения двигательной функции могут оказать влияние на успешность процесса обучения и воспроизведения навыка.

При использовании теста УРПИ нельзя исключить вероятность того, что у крыс моделирование ишемического поражения мозга приводит к изменению функциональной активности сенсорных систем, в частности, к изменению тактильной реактивности, что может быть причиной развития повышенной по сравнению с интактными животными чувствительности к электрошоковому воздействию.

Для оценки терапевтической эффективности препаратов на моделях ишемического поражения мозга, кроме когнитивных тестов, используют и оценку неврологического статуса. Разработаны специальные шкалы, позволяющие описать спектр неврологических нарушений [4, 5]. Однако данный метод является полуколичественным (оценка в баллах) и довольно субъективным. Поэтому поиск дополнительных маркеров поведенческих нарушений, возникающих вследствие ишемического поражения головного мозга, – актуальная задача, решение которой будет способствовать более полной оценке фармакологической активности лекарственных кандидатов.

В ходе эксперимента оценили изменение уровня тактильной реактивности у крыс с ишемическим поражением головного мозга, вызванным билатеральной окклюзией сонных артерий, в сравнении с ложнопериоперированными животными.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 20 самцах аутбредных крыс массой 220–260 г (питомник ПЛЖ «Рапполово»). Животных содержали в условиях 24-часового фоторежима (12/12 ч, включение света в 8:00), контролируемой температуры ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажности ($65 \pm 10\%$) воздуха при свободном доступе к очищенной воде и стандартному корму (гранулированный комбикорм). Данная научно-исследовательская работа была выполнена в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. По завершению эксперимента животные были эвтаназированы с помощью CO_2 .

Анестезия. Для моделирования экспериментальной патологии была использована общая анестезия смесью препаратов Zoletil 100 (Virbac Sante Animale, Франция) (2,6 мг/кг) и Xila (Interchemie werken De Adelaar B.V., Нидерланды) (2,6 мг/кг) при их внутримышечном введении.

Моделирование патологии. Билатеральная, перманентная, церебральная ишемия была индуцирована путем окклюзии общих сонных артерий с обеих сторон. Для формирования патологии животное было введено в наркоз, зафиксировано на операционном столе. Затем был произведен срединный разрез кожи по линии проекции трахеи. Тупым методом разобраны мышцы, с обеих сторон шеи были выделены общие сонные артерии. На обе артерии были наложены лигатуры. В результате было прекращено кровоснабжение головного мозга через сонные артерии с обеих сторон. Далее послеоперационная рана была послойно ушита, шов обработан антисептиком. Для ложноперированных животных были проведены аналогичные манипуляции, за исключением наложения лигатур на артерии. В послеоперационный период животные находились на подогреваемом столике до выхода из наркоза, внутримышечно вводили Флекспрофен® (раствор для инъекций 50 мг/мл) в дозе 5 мг/кг однократно.

Тест тактильной чувствительности. Перед тестом крысу помещали в индивидуальную клетку с сетчатым полом. Период привыкания к условиям теста составлял 10–15 мин. Затем, в соответствии с методом «up-down» [6], оценивали пороги отдергивания лапы на воздействие нитей фон Фрея (Touch Test®, North Coast Medical, Inc, Гилрой, США). Для этого к плантарной поверхности лапы поочередно прикладывали нити (филаменты) фон Фрея различной жесткости, что обеспечивало калиброванное в логарифмической последовательности воздействие (0,692; 1,202; 2,041; 3,630; 5,495; 8,511; 15,136; 28,840 г). Сначала оценивали пороги тактильной чувствительности на левой лапе, далее процедуру повторяли для правой лапы. Кончик нити приставляли перпендикулярно к середине подошвенной поверхности и равномерно надавливали до сгибания волоска. Максимальная длительность воздействия составляла 6 с. За положительный ответ принимали резкое отдергивание лапы при воздействии или сразу после удаления филамента, различные способы уклонения от воздействия. Тестирование начинали с филамента 3,63 г. Затем, если ответ был положительным, использовали менее жесткий филамент, если отрицательным – более жесткий; 50% порог отдергивания лапы – тактильную реактивность – рассчитывали по методу W.J. Dixon [7] в модификации

S.R.Chaplan и соавт. [6]. При обработке данных использовали среднее значение порогов, полученное по измерениям на обеих конечностях.

Дизайн эксперимента. Сформированы 3 группы животных (n=5–9). На следующий день после моделирования патологии ложноперированные крысы (1-я группа) и крысы с патологией (2-я группа) начали получать внутрижелудочно дистиллированную воду, еще 3-я группа животных с патологией получала мемантин в дозе 20 мг/кг. Объем введения составлял 1 мл/кг. Препараты вводили 10 дней. Мемантин в данном исследовании был выбран в качестве препарата позитивного контроля, так как он обладает выраженной терапевтической активностью в отношении когнитивного дефицита, который развивается после различных форм ишемии головного мозга [8, 9].

Тактильную чувствительность оценивали по окончанию курса введения мемантина (или контрольного вещества).

Статистическая обработка. Для анализа данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) (фактор: группа), межгрупповые сравнения проводили с помощью критерия Тьюки. Различия были определены при 0,05 уровне значимости. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показало, что через 10 дней после моделирования патологии у экспериментальных животных наблюдалось значительное изменение выраженности тактильной аллодинии ($F_{2,17}=5,2$; $p=0,017$). При последующих межгрупповых сравнениях (post hoc analysis) отмечено усиление тактильной аллодинии в контрольной группе крыс с патологией (получавших дистиллированную воду) по сравнению с таковой в группе ложноперированных животных ($p=0,01$; критерий Тьюки, см. таблицу), что свидетельствует об усилении реакции на тактильную стимуляцию у животных с патологией. Следует отметить, что у животных, получавших мемантин в дозе 20 мг/кг в/ж, статистически значимого отличия тактильной аллодинии по сравнению с ложноперированной группой не наблюдалось ($p=0,1$; критерий Тьюки). Однако также не было получено достоверного отличия от животных контрольной группы с патологией ($p=0,6$; критерий Тьюки). Относительно низкие значения порогов в группе ложноперированных животных объясняются частично тем фактом, что предварительной габитуации к процедуре (до моделирования патологии) не проводилось.

Пороги тактильной чувствительности, г, M±SEM

Введение препарата	Индукция патологии	Доза, мг/кг	n	Порог тактильной аллодинии
Дистиллированная вода	Ложная операция	0	5	12,97±2,61
	Ишемия	0	9	3,73±1,52*
Мемантин		20	6	6,18±2,22

Примечание.* – $p < 0,05$, статистически значимое отличие от группы без патологии (критерий Тьюки).

Таким образом, моделирование глобальной ишемии мозга при помощи билатеральной окклюзии двух общих сонных артерий сопровождается развитием тактильной аллодинии. Относительно простой метод измерения тактильной чувствительности может быть использован в качестве дополнительного теста для оценки постинсультных нарушений. Учитывая то, что оценка неврологического статуса (например, наличие или отсутствие флексорного рефлекса) проводится по принципу «наличие/отсутствие реакции», оценка выраженности тактильной аллодинии имеет некоторые преимущества, поскольку позволяет количественно описать признак, и, соответственно, более точно определить степень терапевтического действия изучаемых препаратов.

Наблюдаемое усиление тактильной аллодинии указывает на развитие постинсультного болевого синдрома у крыс. Известно, что постинсультный болевой синдром относится к группе хронических нейропатических болевых синдромов, распространенных у пожилых людей; это – одно из последствий ишемического или геморрагического инсульта [10]. Постинсультный болевой синдром возникает как следствие анатомических, нейрохимических, токсических и воспалительных изменений в структурах ЦНС, вызывающих повышение возбудимости нейронов [11]. В проведенном ранее исследовании на мышах было показано, что развитие постинсультной боли связано с увеличением порога восприятия тонких миелинизированных волокон $A\delta$, возбуждение которых вызывает короткие и четко локализованные болевые ощущения, и толстых миелинизированных $A\beta$ волокон, передающих тактильную информацию с периферии в центральные отделы головного мозга, но не с изменением порогов реагирования немиелинизированных C-волокон, при возбуждении которых ощущается отсроченная длительная боль [12].

В экспериментах на крысах были получены схожие результаты. У крыс с экспериментальным инсультом, вызванным фокальной ишемией с последующей реперфузией, развивается гиперсенситизация волокон $A\beta$ или $A\delta$ и снижение сенсорных порогов этих первичных афферентов, что

коррелирует с размерами ишемического поражения головного мозга и выраженностью неврологического дефицита [13]. Тот факт, что для животных с экспериментальным инсультом характерно развитие гиперсенситизации, необходимо учитывать при проведении различных тестов, направленных на оценку поведенческих нарушений, вызванных ишемией. Особенно это важно при проведении тестов, в которых используются различные виды тактильной или болевой стимуляции. Например, при выработке УРПИ животные обучаются избегать болевого стимула (электроболевое раздражение плантарных поверхностей лап), и, учитывая развитие гиперсенситизации у животных с патологией, можно ожидать, что реакция на электроболевой стимул у них будет отличаться от реакции у ложнооперированных крыс.

В постинсультном состоянии происходит чрезмерная активация глутаматергической системы, в частности, NMDA-рецепторного комплекса, что ведет к стимулированию процессов апоптоза нервной ткани и препятствует нейрональной пластичности. Мемантин, будучи неселективным блокатором NMDA рецепторов, снижает интенсивность апоптоза клеток, тем самым способствуя восстановлению клеток головного мозга [14–16]. Кроме того, мемантин снижает выраженность процессов центральной сенситизации, сопровождающих развитие хронического болевого синдрома [17, 18].

Заключение

В проведенном исследовании наблюдалась тенденция к нормализации тактильной реактивности у животных, получавших мемантин, что подтверждает целесообразность оценки тактильной аллодинии как дополнительного маркера эффективности лекарственных кандидатов для постинсультной терапии.

Данное экспериментальное исследование выполнено в рамках Государственного задания № АААА-А18-118070690064-0 ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова МЗ РФ и № АААА-А18-118012290373-7 Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.П. Сеченова РАН.

Список литературы

1. Aski M.L., Rezvani M.E., Khaksari M., Hafizi Z., Pirmoradi Z., Niknazar S., Mehrjerdi F. Z. Neuroprotective effect of berberine chloride on cognitive impairment and hippocampal damage in experimental model of vascular dementia. *Iran J Basic Med Sci.* 2018. Vol. 21; 1: 53–8. <http://dx.doi.org/10.22038/ijbms.2017.23195.5865>
2. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci Methods.* 1984. Vol. 11; 1: 47–60.
3. Шекунова Е., Кашкин В., Макарова М., Макаров В. Экспериментальные модели когнитивных нарушений. *Международный вестник ветеринарии.* 2016; 1: 105–18. [Shekunova E., Kashkin V., Makarova M., Makarov V. Modeling of cognitive impairment. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii.* 2016; 1: 105–18] (in Russ.)
4. Moser V.C., McDaniel K.L., Phillips P.M. Rat strain and stock comparisons using a functional observational battery: baseline values and effects of amitraz. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991. Vol. 108; 2: 267–83.
5. Mathiasen J., Moser V. The Irwin Test/Functional Observational Battery (FOB) for Assessing the Effects of Compounds on Behavior, Physiology, and Safety Pharmacology in Rodents. *Current Protocols in Pharmacology.* 2018; Vol. 83; 1: 42. <http://dx.doi.org/10.1002/cpph.43>
6. Chaplan S.R., Bach F.W., Pogrel J.W., Chung J.M., Yaksh T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 1994. Vol. 53; 1: 55–63. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)
7. Dixon W.J. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1980. Vol. 20: 441–62. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.20.040180.002301>
8. Xu L., Lin C.R., Liu J.X., Ren J. X., Li J.M., Wang M., Li H.H., Song W. T., Yao M.J., Wang G.R. [Effect of sailuotong capsule on intervening cognitive dysfunction of multi-infarct dementia in rats]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2012. Vol. 37; 19: 2943–6.
9. Li T., Luo Z., Liu Y., Wang M., YuX., Cao C., Liao Z., Ding Y., Yue S. Excessive Activation of NMDA Receptors Induced Neurodevelopmental Brain Damage and Cognitive Deficits in Rats Exposed to Intrauterine Hypoxia. *Neurochem Res.* 2018. Vol. 43; 3: 566–80. [10.1007/s11064-017-2451-1](https://doi.org/10.1007/s11064-017-2451-1)
10. Oh H., Seo W. A Comprehensive Review of Central Post-Stroke Pain. *Pain Management Nursing.* 2015. Vol. 16: 5: 804–18. <https://doi.org/10.1016/j.pmn.2015.03.002>
11. Klit H., Finnerup N. B., Jensen T. S. Central post-stroke pain: clinical characteristics, pathophysiology, and management/ *The Lancet Neurology.* 2009. Vol. 8; 9: 857–68. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70176-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70176-0)
12. Takami K., Fujita-Hamabe W., Harada S., Tokuyama S. A and A but not C-fibres are involved in stroke related pain and allodynia: an experimental study in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2011. Vol. 63; 3: 452–6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01231.x>
13. Hyakkoku K., Umeda N., Shimada S., Imai T., Morioka Y., Sakaguchi G., Hara H. Post-stroke pain caused by peripheral sensory hypersensitization after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research.* 2019. Vol. 1715: 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.019>
14. Wang Y.-C., Sanchez-Mendoza E. H., Doepfner T. R., Hermann D. M. Post-acute delivery of memantine promotes post-ischemic neurological recovery, peri-infarct tissue remodeling, and contralesional brain plasticity. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2017. Vol. 37; 3: 980–93. <http://dx.doi.org/10.1177/0271678X16648971>
15. Lai T. W., Shyu W. C., Wang Y. T. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond/ *Trends Mol Med.* 2011. Vol. 17; 5: 266–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2010.12.008>
16. Lai T. W., Zhang S., Wang Y. T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2014. Vol. 115: 157–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>
17. Park J. W., Suh G. I., Shin H. E., Park G. E. Influence of memantine on nociceptive responses of the trigeminocervical complex after formalin injection. *Cephalalgia.* 2012. Vol. 32; 4: 308–16. <http://dx.doi.org/10.1177/0333102411435986>
18. Chen S.-R., Samoriski G., Pan H.-L. Antinociceptive effects of chronic administration of uncompetitive NMDA receptor antagonists in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Neuropharmacology.* 2009. Vol. 57; 2: 121–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.04.010>