

Санкт-петербургский государственный медицинский университет им.
акад. И.П. Павлова

Кафедра патологической физиологии

Эффективные методы оценки неврологического дефицита у крыс на разных сроках постишемического периода

А.С. Дайнеко, А.Г. Шумеева, А.В. Симаненкова

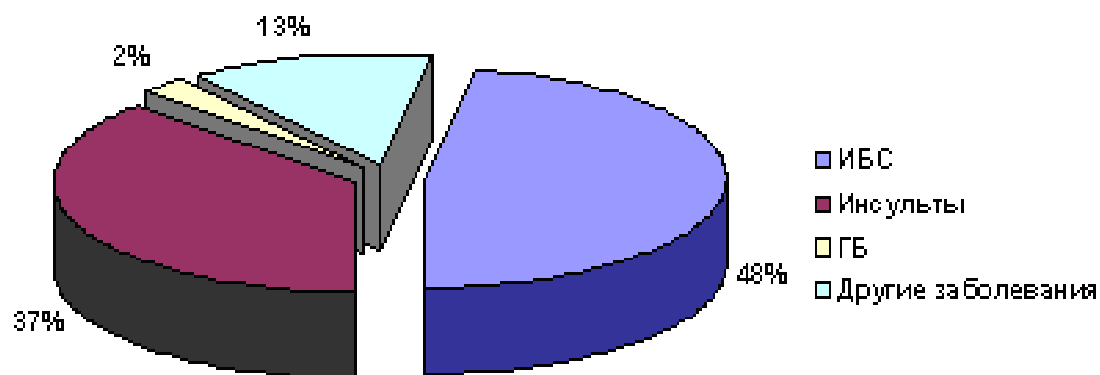
Научный руководитель: профессор, д.м.н. Власов Т.Д.

Санкт-Петербург
2013 г

Актуальность проблемы:

Инсульт занимает второе место в структуре смертности от сердечно-сосудистых заболеваний.

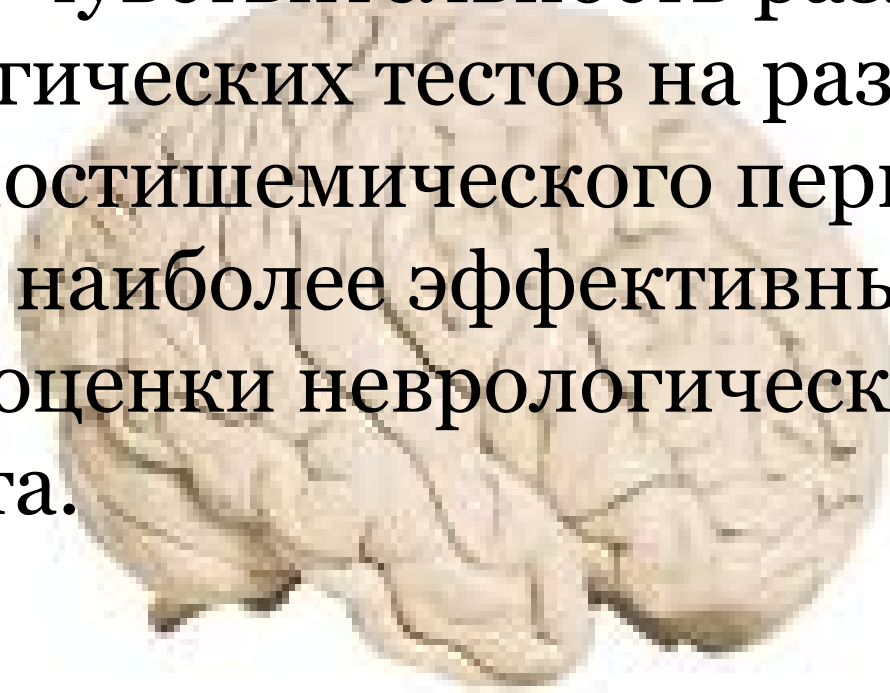
Статистика сердечно-сосудистой смертности в РФ за 2009 год



- Не всегда размер некроза коррелирует с выраженностью неврологического дефицита.
- Множество тестов для оценки неврологического дефицита у экспериментальных животных обладают различной специфичностью и чувствительностью на разных сроках постишемического периода.

Цель исследования:

Оценить чувствительность различных неврологических тестов на разных сроках постишемического периода и выбрать наиболее эффективные методы оценки неврологического дефицита.



A microscopic image of several neurons, showing their cell bodies and extensive, branching dendrites and axons. The neurons are stained in a light yellow or green color, contrasting against a dark background. The text "Материалы и методы" is overlaid in a bold, yellow, sans-serif font, centered on the image.

Материалы и методы

Крысы - самцы линии Wistar (220 – 240г)



Группы экспериментальных ЖИВОТНЫХ:

- ложнооперированные крысы – крысы, которым производилась перевязка наружной сонной артерии ($n=10$): группа «sham»;
- ишемизированные крысы – крысы, прошедшие все этапы эксперимента ($n=8$): группа «ischemia».

Все эксперименты проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья № 85-23, США)

Все оперативные вмешательства проводились под анестезией хлоралгидратом (430 мг/кг) внутрибрюшинно.



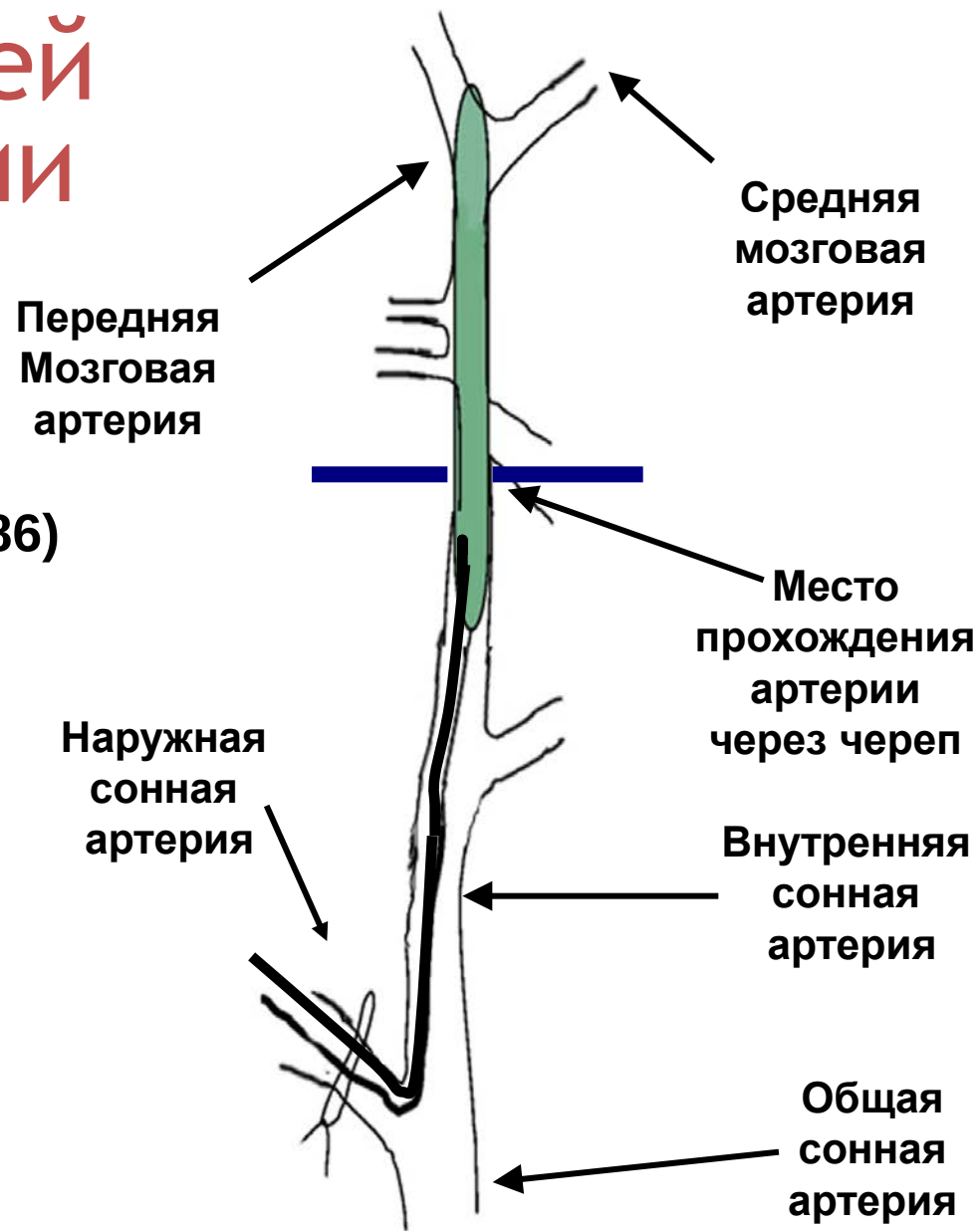
Основные этапы эксперимента:

1. Отбор и предоперационное тестирование крыс.
2. Моделирование фокальной транзиторной ишемии головного мозга крыс путём окклюзии СМА.
3. Оценка неврологических и поведенческих расстройств у крыс с помощью:
 - Bederson test
 - mNSS
 - Тест по Гарсия
 - Угловой тест (Corner test)
 - Тест с постановкой лапки (Placing test)
 - Тест установки позы (Bracing test)
 - Ходжение по балке (Beam test)
4. Послеоперационное тестирование на 2, 7, 14, 21, 28 день постишемического периода.

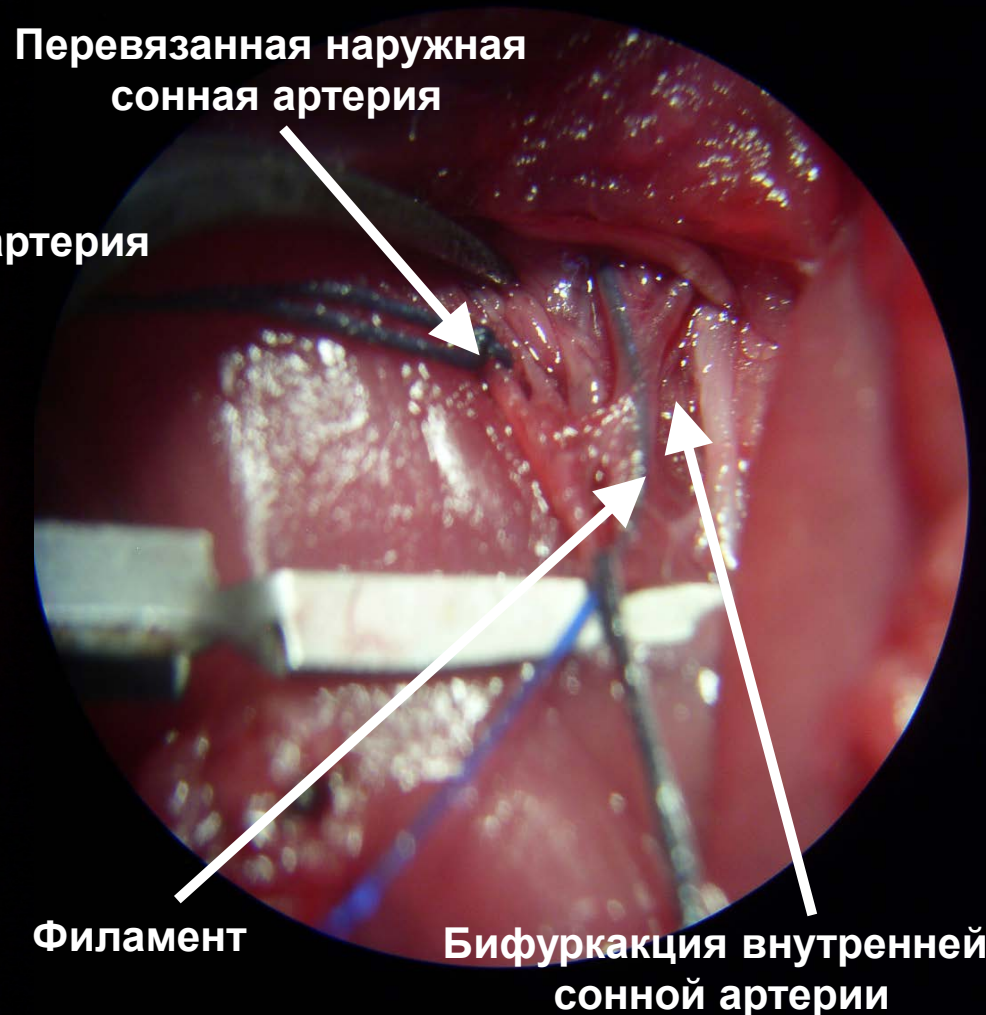
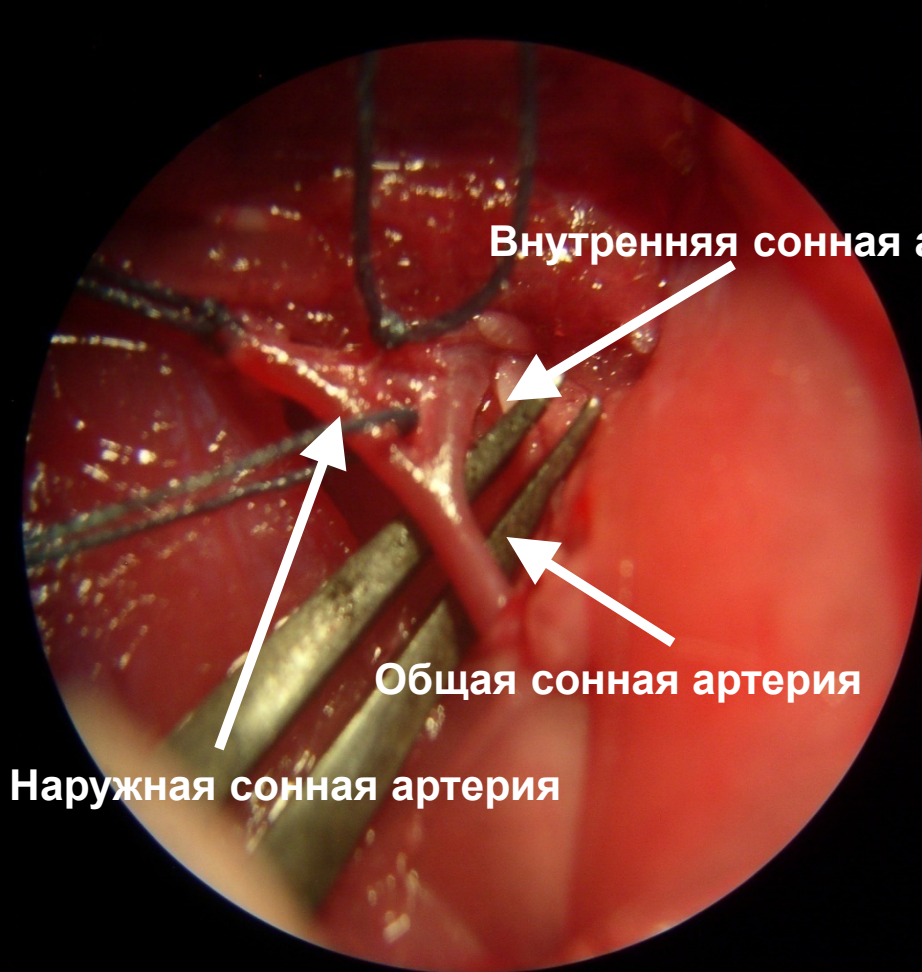


Окклюзия Средней Мозговой Артерии

по методике Koizumi J. et al. (1986)



Этапы операции



Оценка неврологического дефицита

Шкала Garcia J. H.

max – 18 баллов,
min – 3 балла

Оцениваемые параметры:

- Спонтанная активность в клетке за 5 мин;
- Симметричность вытягивания передних конечностей;
- Симметричность движений;
- Способность забираться по стенке проволочной клетки;
- Реакция на прикосновение к каждой стороне туловища;
- Ответ на прикосновение к вибриссам.



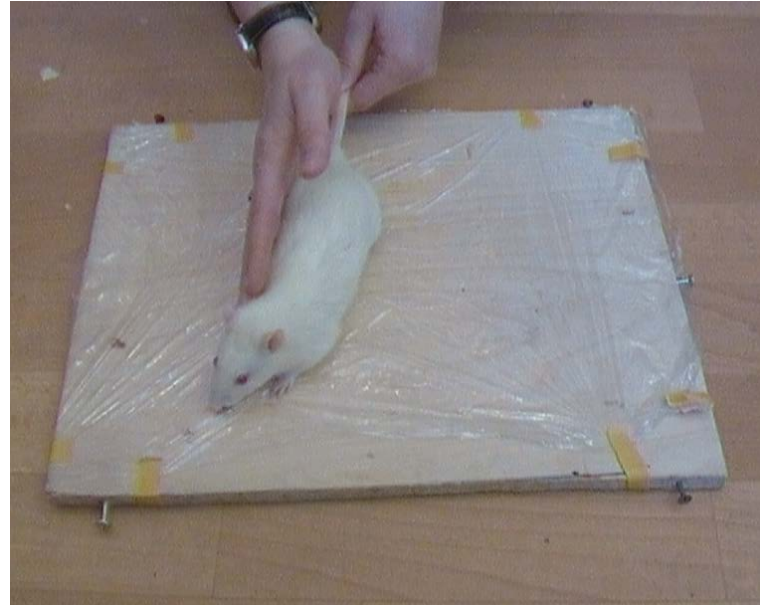
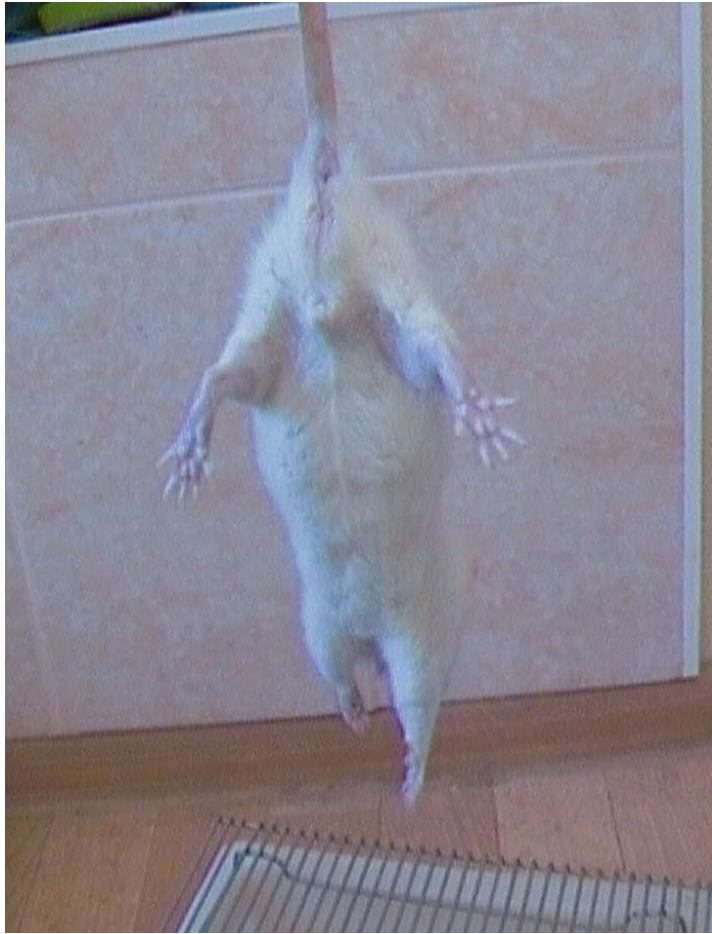
Bederson test

max – 3 балла

min – 0 баллов

Neurologic Examination Grading System

- 1. Норма - 0 баллов: неврологический дефицит не наблюдается.
- 2. Умеренное расстройство – 1 балл: сгибание передней лапы.
- 3. Выраженное расстройство – 2 балла: снижение противодействия боковому толчку (+ п.2).
- 4. Наиболее выраженное расстройство – 3 балла: хождение по кругу (+ п.3)



Modified Neurological Severity Scores (mNSS)

max – 14 баллов

min – 0 баллов

Данная шкала включает в себя тесты на выявление расстройств двигательной активности (мышечный статус и неестественные движения), чувствительной сферы (зрительной, тактильной и проприоцептивной), рефлексов и координации движений.

Motor tests	Points
Подвешивание крысы за хвост	3
1 Сгибание передней лапы	
1 Сгибание задней лапы	
1 Поворот головы более 10°относительно вертикальной оси через 30 секунд	
Ходьба по поверхности	3
0 обычная ходьба	
1 невозможность идти прямо	
2 ходьба по кругу в сторону поражения	
3 падение на паретическую сторону	
Балансирование на балке	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 сек)	
4 попытка удержаться на балке, но падение (>20 сек)	
5 попытка удержаться на балке, но падение (>10 сек)	
6 падение без попытки удержаться на балке или зависание на балке <10 сек	
Рефлексы	2
1 Pinna-рефлекс (встряхивание головой при прикосновении к наружному слуховому проходу)	
1 корнеальный рефлекс (моргание глазом при легком прикосновении к роговице тканью)	
Максимальная сила захвата балки	14

	Bederson test	mNSS	Шкала Garcia
Двигательная активность	+	+	+
Чувствительность (тактильная, проприоцептивная)	+	+	+
Рефлексы		+	
Координация движений	+	+	+

Угловой тест (Corner test)

- Крысы помещаются между двумя досками размерами $30 \times 20 \times 1 \text{ cm}^3$.
- Здоровые крысы поворачивают как влево, так и вправо случайно.
- У ишемизированных животных развивается игнорирование половины пространства (неглект), поэтому они поворачивают преимущественно в здоровую сторону.
- Считается число поворотов в каждую сторону в 10 попытках.





Тест с постановкой лапки (Placing test)

Данный тест чувствителен к выявлению расстройств двигательной активности передних лапок.

Крысу нужно держать таким образом, чтобы ее конечности свисали без опоры. Затем крысу поднимают к краю стола так, чтобы ее усы касались поверхности края стола параллельного ее телу. Считается число раз, когда крыса успешно поднимала свою переднюю лапу на поверхность стола в 10 попытках для каждой лапы.



Тест установки позы (Bracing test)

Данный тест чувствителен к выявлению расстройств двигательной активности передних лапок и координации движений.

Экспериментатор располагает руку с одной стороны от крысы и начинает мягко тащить ее в бок на 90 см со скоростью 20 см/с по гладкой поверхности.

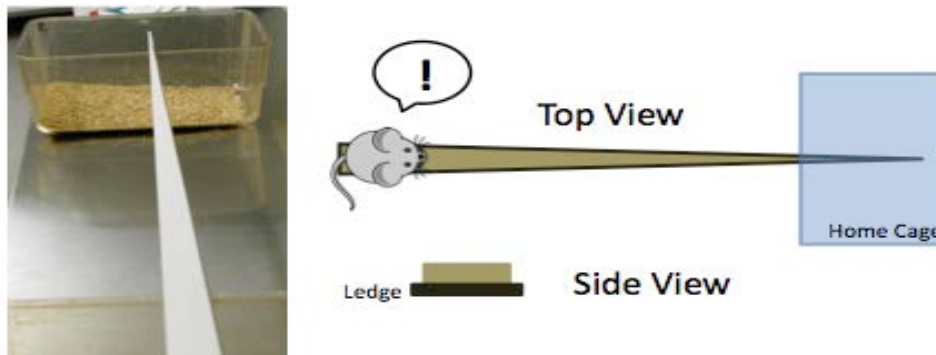
Здоровые крысы регулируют свою позу, производя множество движений передними лапами. Считается количество шагов, выполненных передней лапой на той стороне, в которую толкают крысу. Крыса тестируется два раза в каждом направлении.



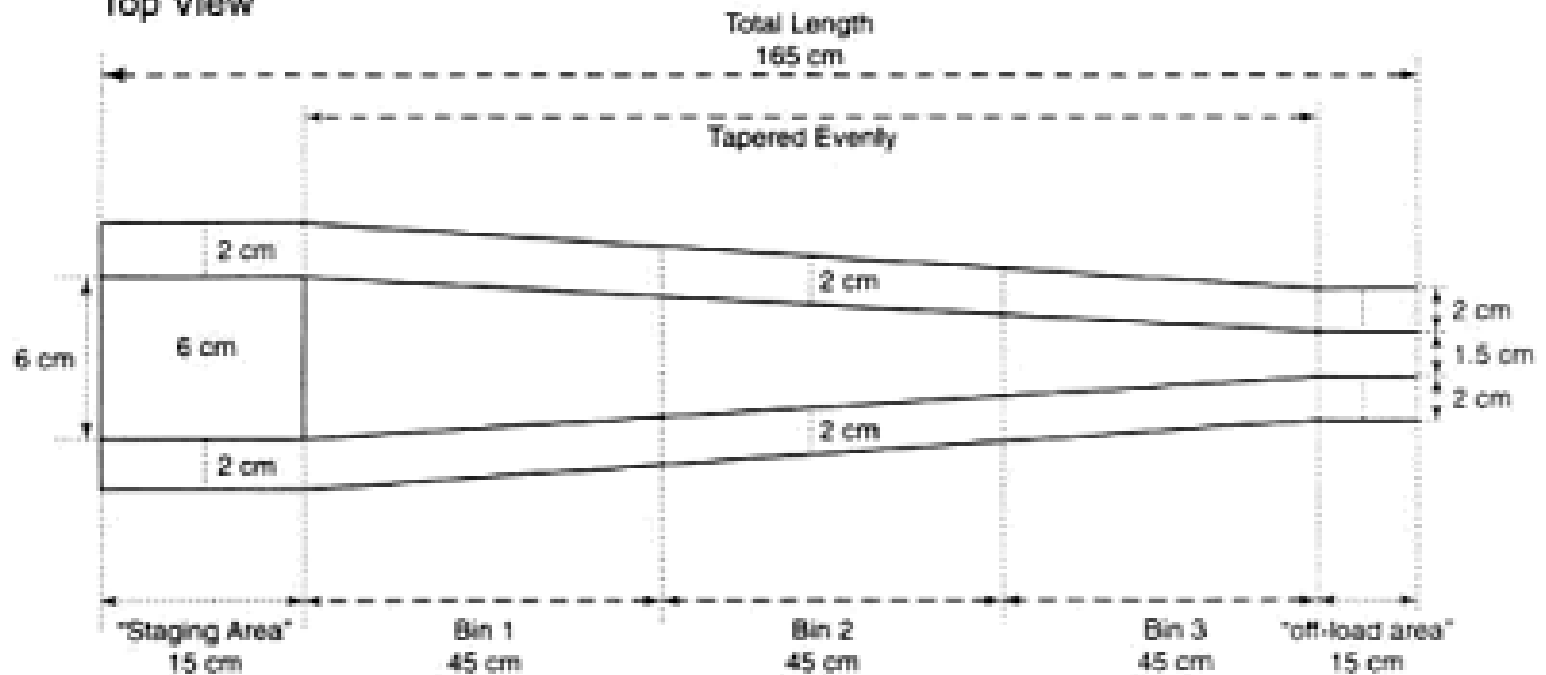
Хожение по балке (Ledged tapered beam test)

Необходима тренировка перед операцией! (не менее 1 недели)
Крыса должна пройти по подвешенной горизонтальной балке, которая сужается на одном конце и имеет прибитую снизу рейку.

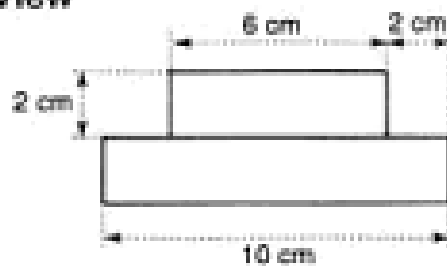
Этот тест чувствителен в оценке расстройств движения задних лап. Число промахов контралатеральной повреждению лапы считается наряду с общим количеством шагов этой лапой и выражается как процент промахов к общему количеству шагов.



Top View



Rear View



* Drawing is not to scale





Все перечисленные выше тесты проводились на 2, 7, 14, 21, 28 день после операции.

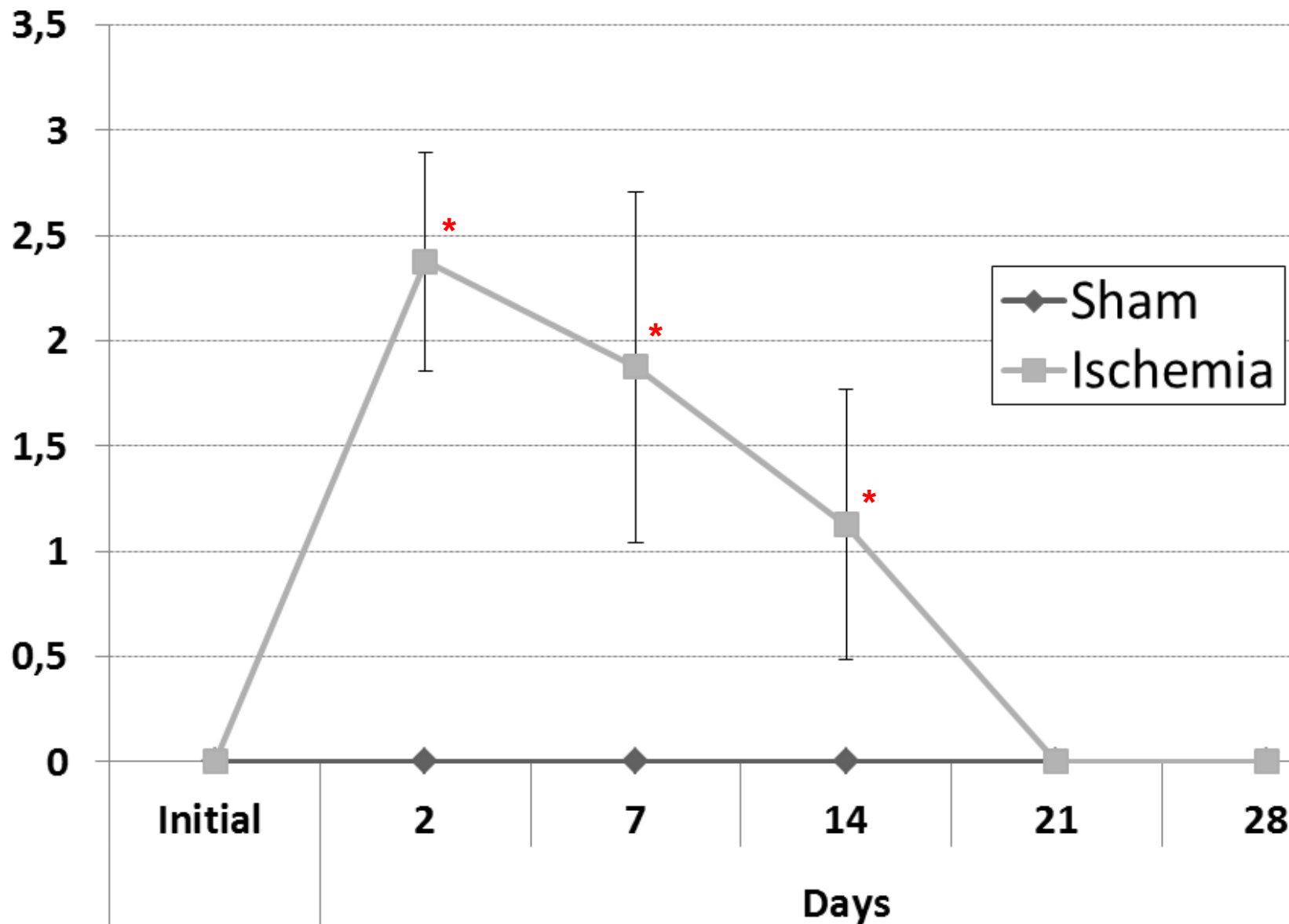
Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета StatSoft Statistica v6.0 Multilingual. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Все показатели были представлены в виде «среднее±стандартное отклонение». Значения P менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

A close-up photograph of a spider web, with the central hub and several radial threads clearly visible. The web is set against a dark, deep blue background, which makes the fine, silken threads stand out. The lighting is soft, highlighting the texture of the web.

Результаты

Bederson test

- Разница показателей неврологического дефицита между ложнооперированными и ишемизированными крысами достоверна ($p < 0,001$) на 2, 7, 14 сутки постишемического периода. На более поздних сроках неврологический дефицит нивелируется.
- Вначале регрессировали расстройства координации движений, позднее — расстройства двигательной активности передней лапки.



* - $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированной группой

mNSS

Из представленных в данной шкале параметров у всех ишемизированных крыс на 2 день после операции достоверно ($p=0,000046$) отмечались расстройства двигательной сферы и координации движений.

Неврологический дефицит сохранялся до 14 дня постишемического периода, после чего полностью нивелировался.

Motor tests

Подвешивание крысы за хвост

1 Сгибание передней лапы

1 Сгибание задней лапы

1 Поворот головы более 10° относительно вертикальной оси через 30 секунд

Ходьба по поверхности

0 обычная ходьба

1 невозможность идти прямо

2 ходьба по кругу в сторону поражения

3 падение на паретическую сторону

Балансирование на балке

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 сек)

4 попытка удержаться на балке, но падение (>20 сек)

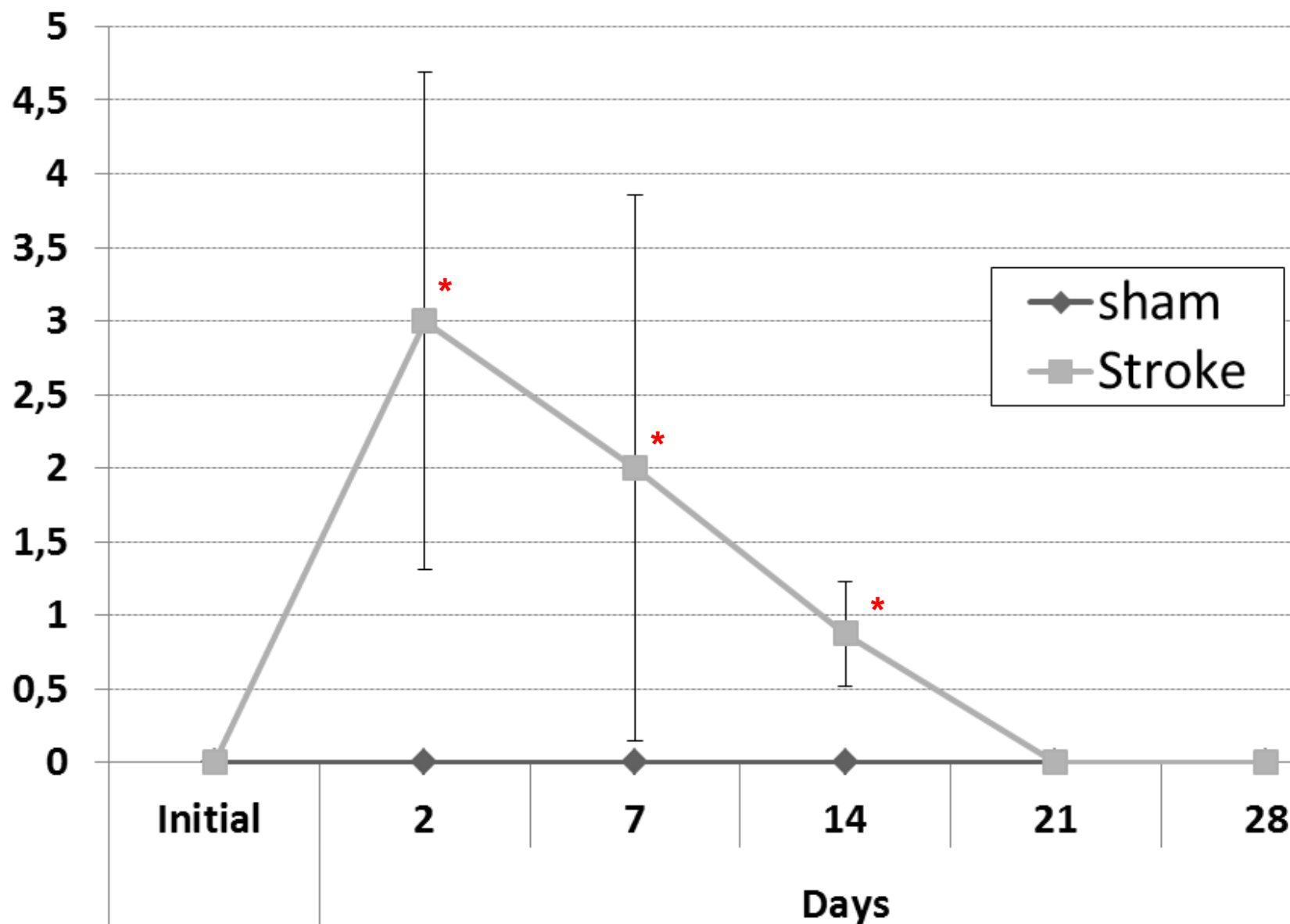
5 попытка удержаться на балке, но падение (>10 сек)

6 падение без попытки удержаться на балке или зависание на балке <10 сек

Рефлексы

1 Pinna-рефлекс (встряхивание головой при прикосновении к наружному слуховому проходу)

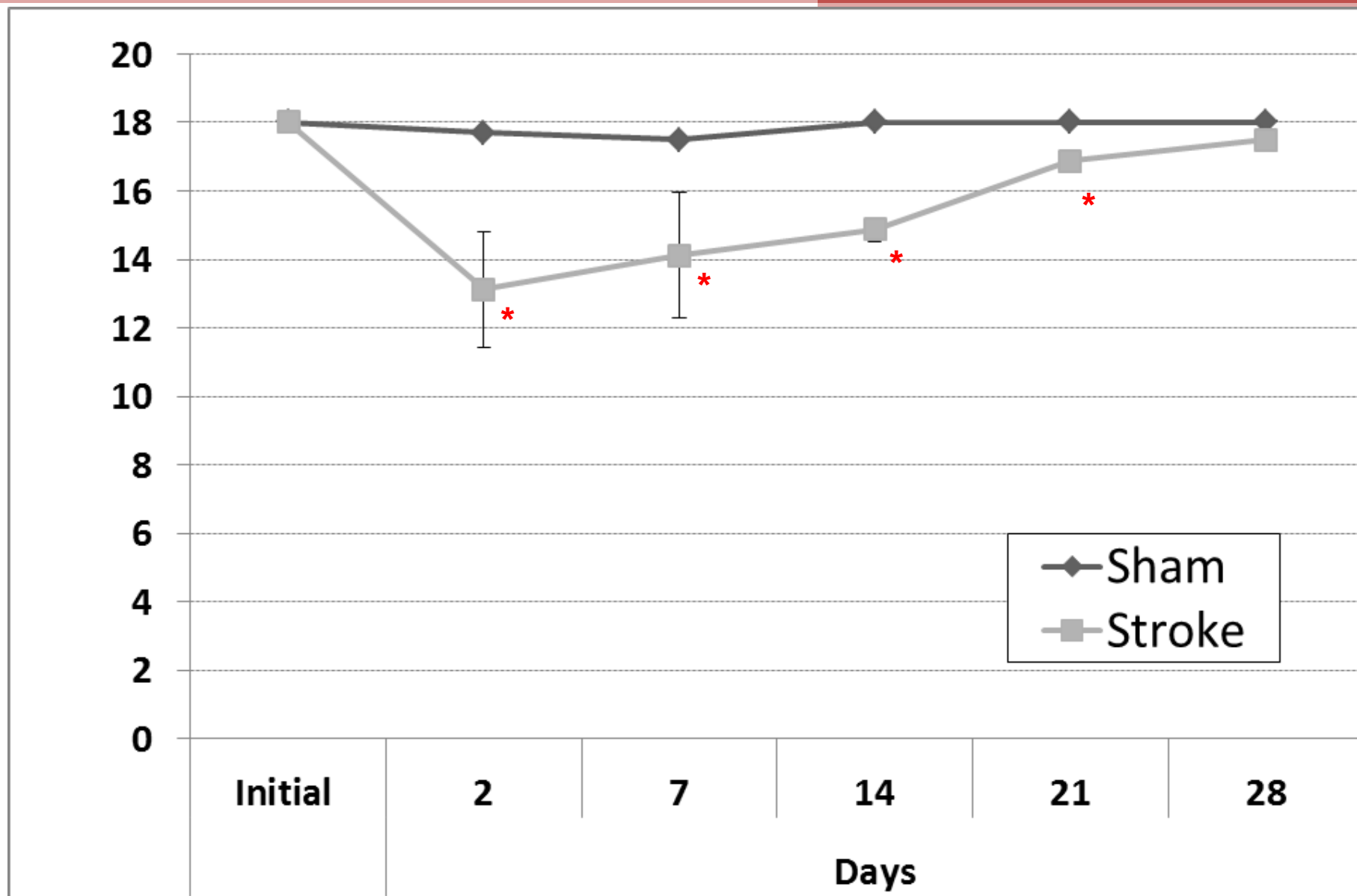
1 корнеальный рефлекс (моргание глазом при легком прикосновении к роговице тканью)



* - $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированной группой

Тест по Гарсия

- За весь период наблюдения наиболее часто отмечались двигательные расстройства при лазании по проволочной сетке и несимметричность вытягивания конечностей при подвешивании за хвост.
- Разница показателей неврологического дефицита между ложнооперированными и ишемизированными крысами достоверна ($p < 0,01$) на 2, 7, 14 и 21 сутки постишемического периода.

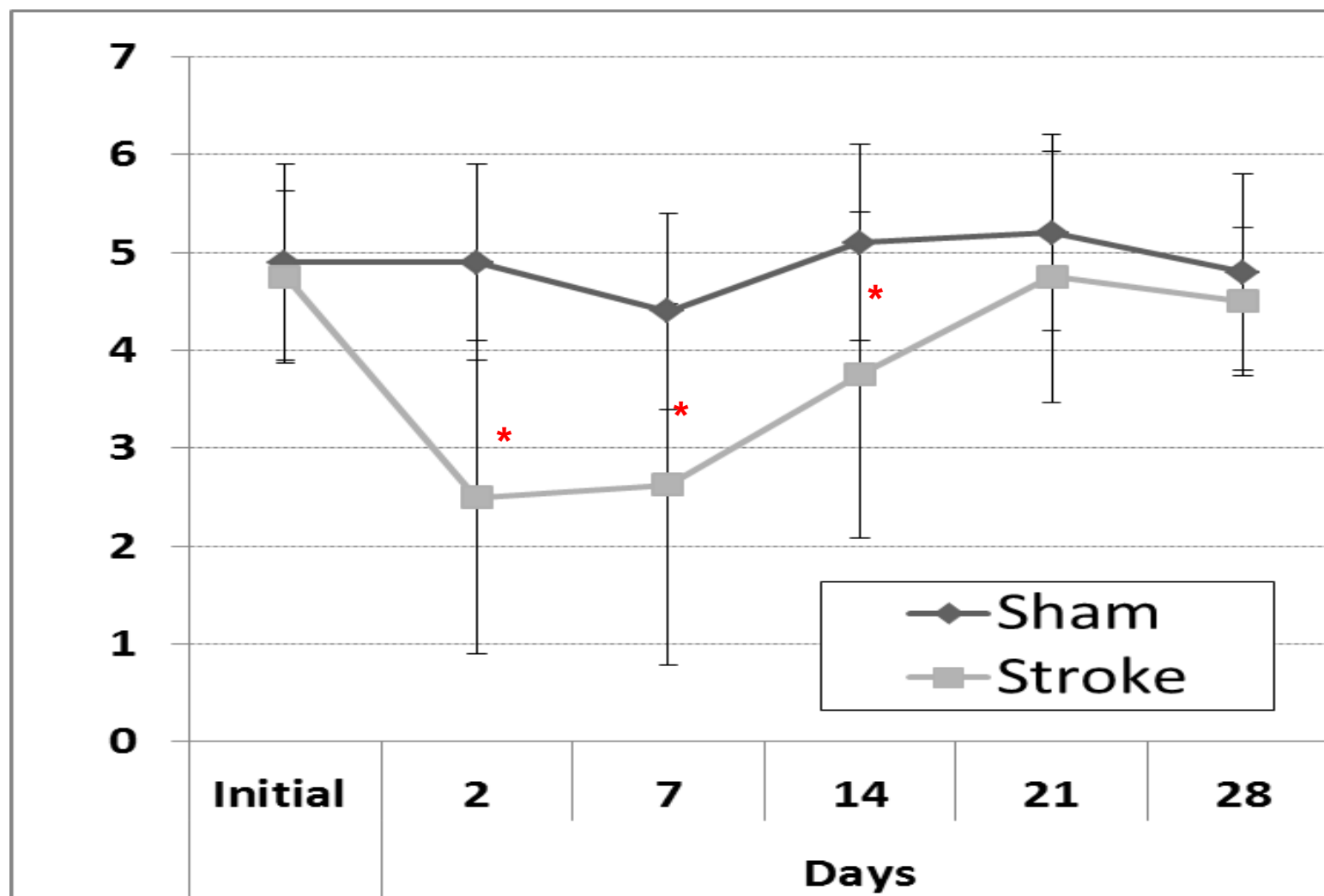


* - $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированной группой

Угловой тест (Corner test)

- В группе ишемизированных крыс развивался двигательный неглект правой половины пространства. Поэтому такие крысы в данном тесте поворачивались преимущественно в левую сторону.
- Данное поражение достоверно ($p < 0,05$) отмечалось в группе ишемизированных крыс по отношению к группе ложнооперированных на 2, 7, 14 день после операции.

Поворот в левую сторону

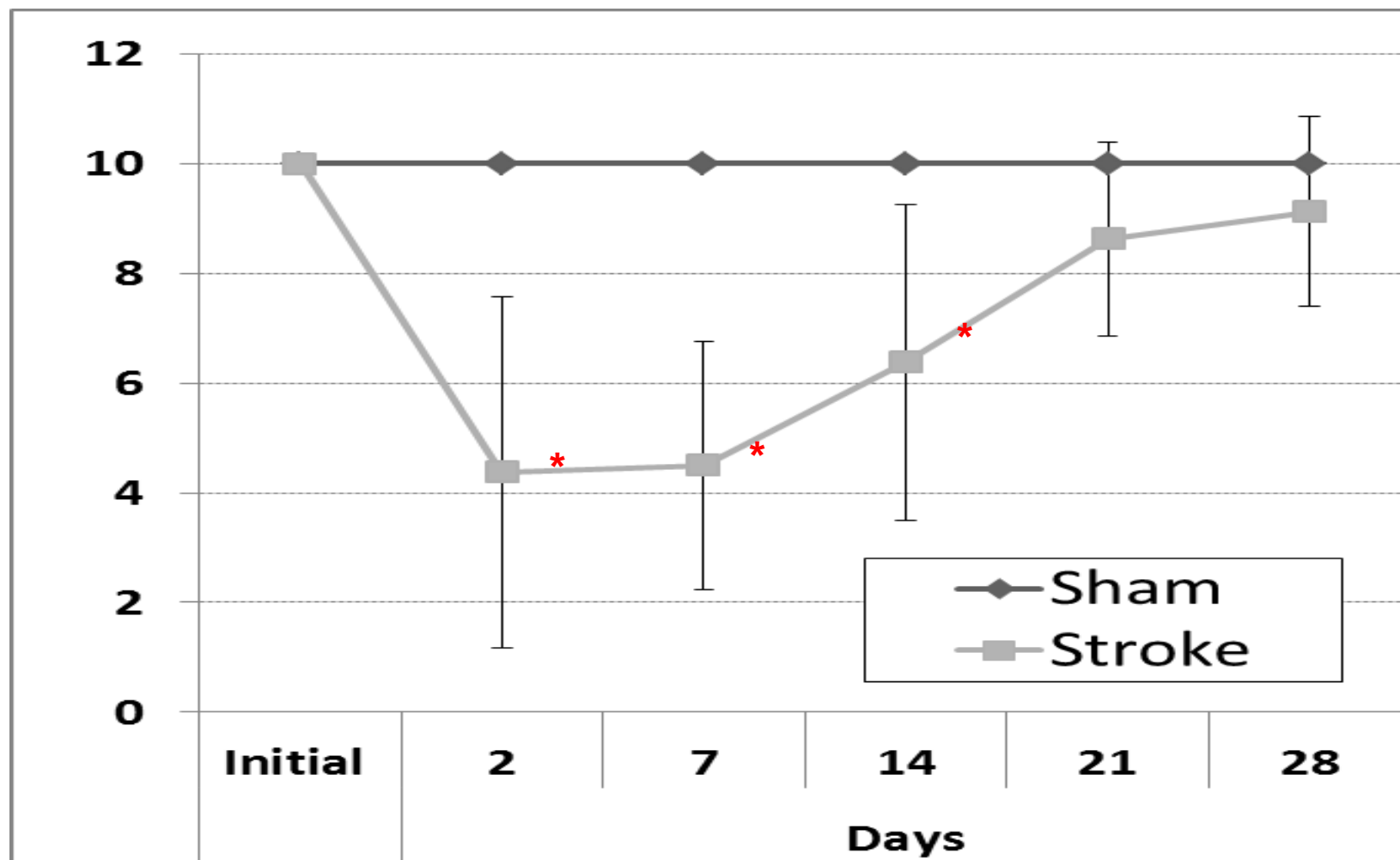


* - $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированной группой

Тест с постановкой лапки (Placing test)

Достоверное ($p < 0,0001$) снижение двигательной активности правой лапки в группе ишемизированных крыс по отношению к группе ложнооперированных отмечалось на 2, 7, 14 день постишемического периода. К 21 дню различия нивелировались.

Двигательная активность правой лапы



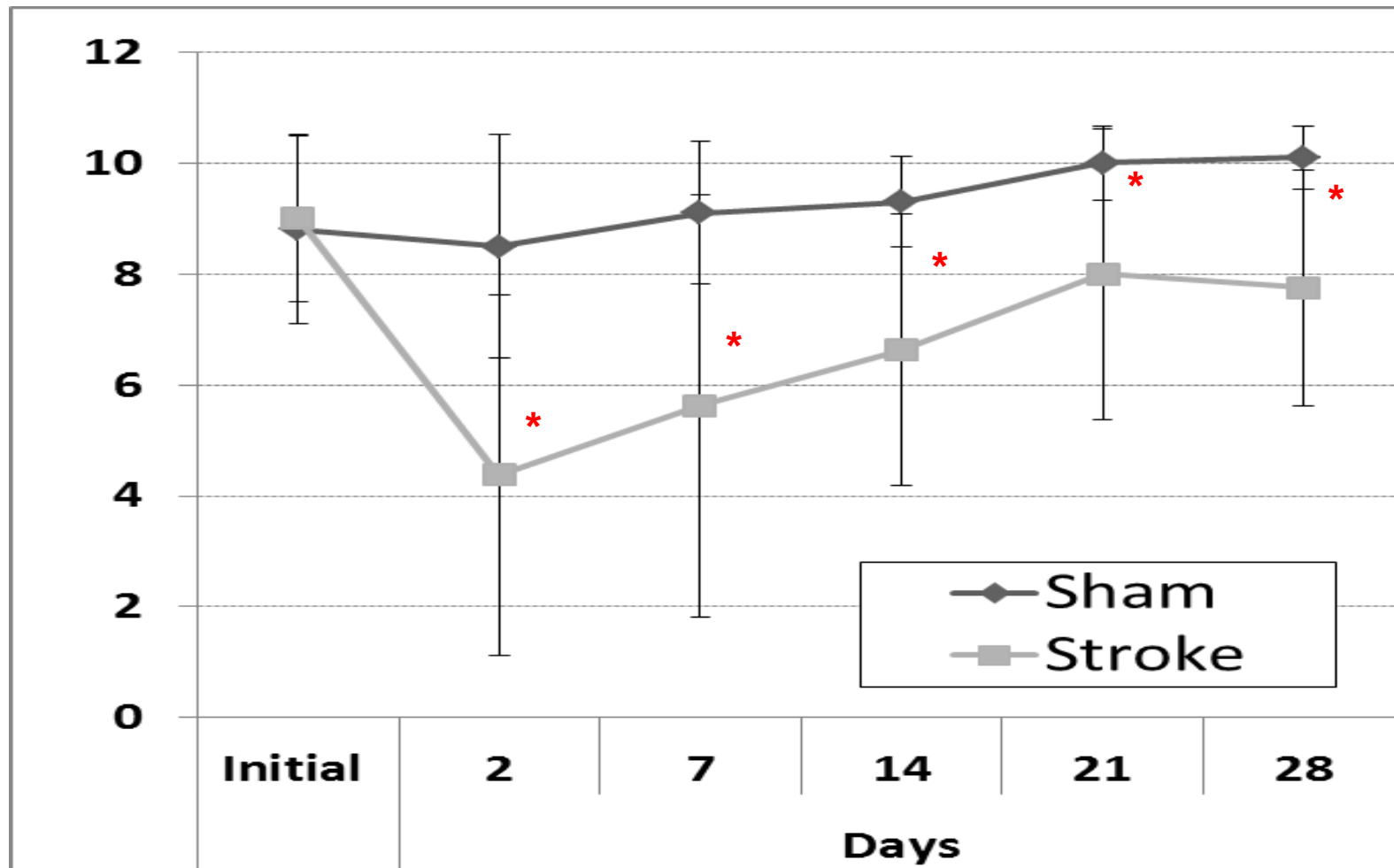
* - $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированной группой

Тест установки позы (Bracing test)

В группе ишемизированных крыс достоверное снижение ($p < 0,05$) двигательной функции правой передней лапки по сравнению с группой ложнооперированных крыс наблюдалось на протяжении всего срока наблюдения.

Минусы данного теста: Расстройство двигательной активности правой передней лапки не всегда связано с парезом. Также следует обращать внимание на аффект тревоги у крыс, что проявляется замиранием и сопротивлением любому воздействию.

Двигательная активность правой передней лапки



* - $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированной группой

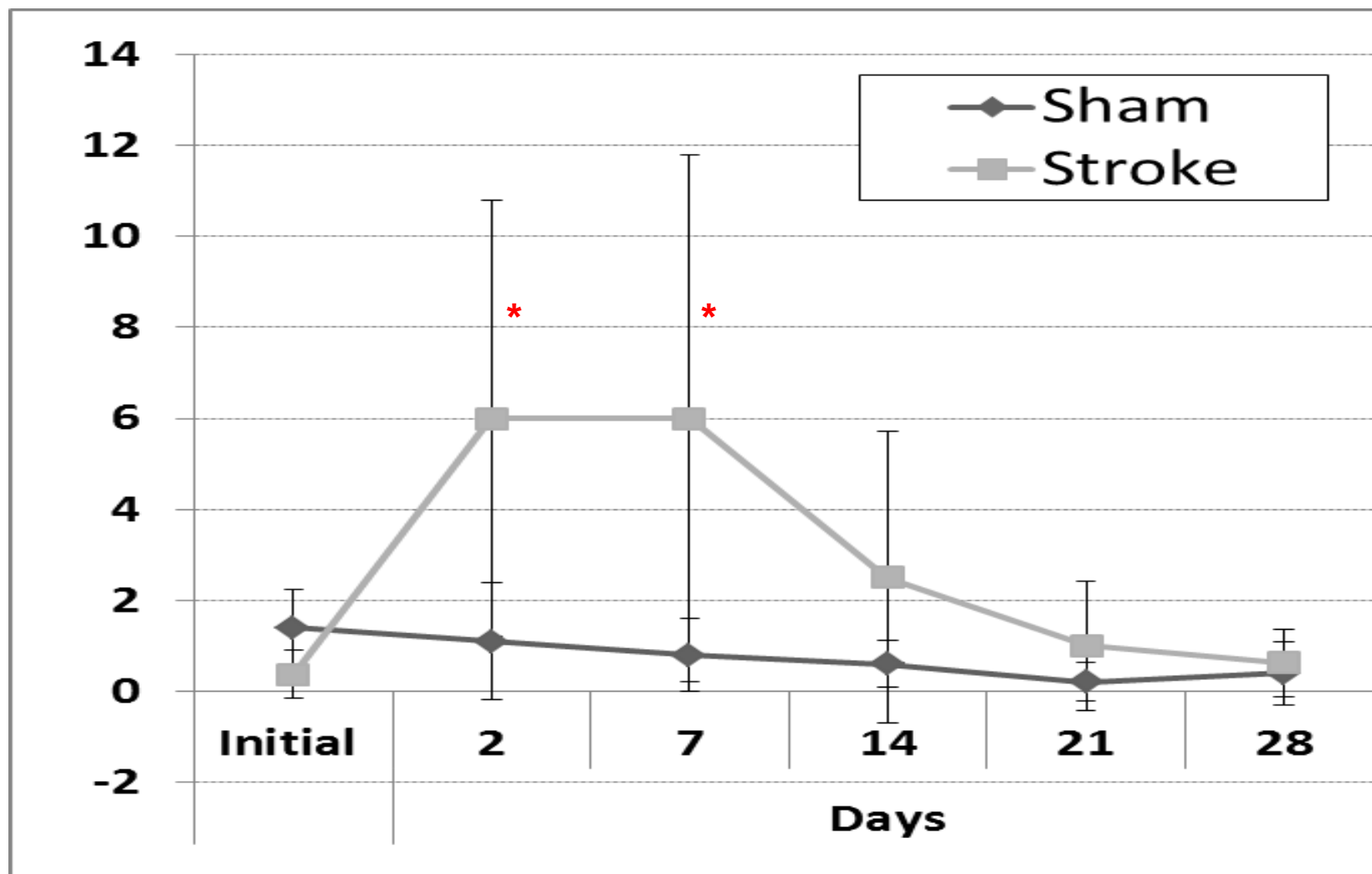
Хожжение по балке (Ledged tapered beam test)

В группе ишемизированных крыс достоверное снижение ($p < 0,01$) двигательной функции правой задней лапки по сравнению с группой ложнооперированных крыс наблюдалось на 2 и 7 день постишемического периода.

Минусы данного теста:

- необходимость тренировки крыс не менее 1 недели перед операцией;
- невозможность исключить все факторы окружающей среды, которые отвлекают крысу от целенаправленного движения вперед по балке.

Количество промахов правой задней лапы



* - $p < 0,05$ по сравнению с ложнооперированной группой

A microscopic image of neurons, showing several cell bodies (soma) with numerous branching processes (dendrites and axons) extending outwards. The image is rendered in a blue color scheme. Overlaid on the center of the image is the word 'Выводы' in a bold, yellow, italicized font.

Выводы

- При фокальной 30-минутной ишемии мозга у крыс выполненной путём окклюзии СМА развивается очаговый неврологический дефицит проявляющийся двигательными расстройствами (парез контрлатеральных конечностей), чувствительными нарушениями (контрлатеральная гемигипестезия) и координаторными расстройствами.
- Возникающий очаговый неврологический дефицит у крыс при инсульте является разнородным и чаще всего представлен двигательными нарушениями, однако может также проявляться изолированным чувствительными расстройствами.

- Все предложенные тесты (Bederson test, шкала mNSS, тест по Гарсия, угловой тест, тест с вытягиванием лапки, тест установки позы, хождение по балке) позволяют выявить и количественно оценить неврологический дефицит у крыс до 14 дня постишемического периода.
- К 14-21 дням после ишемии очаговый неврологический дефицит полностью регрессирует.
- Наиболее чувствительными и репрезентативными оказались тест по Гарсия и тест с вытягиванием лапы.
- Для точной и объективной оценки неврологического дефицита в тесте «Хождение по балке» требуется тренировать и отбирать животных перед началом исследования за 1-2 недели.

***Спасибо за
внимание!***

