

10. Vanucci R.C., Vanucci S.J. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage // Ann.N.Y.Acad. Sci. - 1997. - Vol. 32. - P. 234-249.

Координаты для связи с авторами: Сазонова Елена Николаевна — доктор мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, зав. кафедрой нормальной физиологии ДВГМУ,

тел.: 8(924) 206-34-63, e-mail:sazen@mail.ru; Сима́нкова Анна Александровна — студентка 5 курса педиатрического факультета ДВГМУ, тел.: 8(962) 229-12-26; Крыжановская Светлана Юрьевна — канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ; Тимошин Сергей Серафимович — зав. ЦНИЛ ДВГМУ, тел.: 8(4212) 32-99-64, e-mail: timoshinss@yandex.ru.



УДК 616 - 053.1 : 612.82 - 599.323.4

Е.Н. Сазонова, А.А. Сима́нкова, О.А. Лебе́дько, С.Ю. Крыжа́новская, С.С. Тимошин

ВЛИЯНИЕ АНТЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ БЕЛЫХ КРЫС

Дальневосточный государственный медицинский университет¹,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел.: 8(4212) 32-63-93, e-mail nauka@mail.ru;
НИИ охраны материнства и детства СО РАМН,
680022, ул. Воронежская, 49, кор. 1, e-mail: iomid@yandex.ru;
Дорожная клиническая больница ст. Хабаровск-1 ОАО «РЖД»³,
680022, ул. Воронежская, 49, тел.: 8(4212) 98-03-58, г. Хабаровск

Аntenатальная гипоксия вызывает существенные изменения в функционировании центральной нервной системы млекопитающих. Резидуальные последствия перинатального гипоксического поражения нервной системы проявляются не только на раннем этапе постнатального онтогенеза, но и продолжают существовать в более поздние возрастные периоды [1]. В ранее проведенном исследовании нами были показаны выраженные структурно-функциональные нарушения ЦНС у новорожденных белых крыс, подвергнутых антенатальной гипоксии.

Целью настоящего исследования явилось изучение долгосрочных последствий антенатального гипоксического поражения головного мозга в модели на животных.

Материалы и методы

В работе использовали потомство рандомбредных 3-месячных белых крыс-самок, подвергнутых гипоксическому воздействию с 14 по 19 сут гестации. Беременных крыс-самок помещали в барокамеру СБК-48 натошак и «поднимали» на высоту 9000 м над уровнем моря, что соответствовало давлению 224 мм рт.ст. и насыщению кислорода 42 мм рт.ст. Ежесуточную 4-часовую экспозицию проводили с 9 до 13 ч в течение 6 дн. После рождения крысят в каждой выводке оставляли по 8-10 животных, у которых проводили регистрацию ряда показателей развития. Уравнивание выводков было необходимо для исключения влияния на регистрируемые параметры нутритивного фактора. Осуществляли наблюдение за подопытными животными до достижения ими репродуктивного возраста. В динамике оценивали массу тела животных. 30-суточных белых крыс подвергали тестированию в «открытом поле» и приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ).

Повторное тестирование в ПКЛ осуществляли в подгруппе крыс-самцов в 60-суточном возрасте.

После эвтаназии мозг 60-суточных животных подвергали гравиметрии. Для анализа процессов свободнорадикального окисления (СРО) в гомогенатах полушарий мозга 60-суточных животных проводили хемиллюминесцентное исследование (ХМЛ). Регистрацию ХМЛ осуществляли на люминесцентном спектрометре LS 50B «PERKIN ELMER». Стандартизацию сигнала и математическую обработку кривых ХМЛ выполняли с помощью встроенной программы Finlab. Спонтанную и индуцированную Fe^{2+} ХМЛ исследовали по методу [2]. Определяли: светосумму за 1 мин спонтанной ХМЛ ($S_{сп.}$), величина которой коррелирует с интенсивностью свободнорадикальных процессов; максимум быстрой вспышки (H_1), индуцированной ХМЛ, свидетельствующий о содержании гидроперекисей липидов; светосумму ($S_{инд.1}$) за 2 мин после «быстрой» вспышки, отражающую скорость образования перекисных радикалов липидной природы. Кинетику ХМЛ, инициированную H_2O_2 в присутствии люминола, анализировали по двум параметрам: максимуму свечения (H_2), указывающему на потенциальную способность биологического объекта к перекисному окислению, и светосумме за 2 мин ХМЛ ($S_{инд.2}$), величина которой свидетельствует об активности антиоксидантной антирадикальной защиты. Интенсивность ХМЛ, измеренную в милливольт-секундах, рассчитывали на 1 г влажной ткани и выражали в условных единицах.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли по критерию Стьюдента при помощи пакета прикладных программ Statistika 5.0. Всего в эксперименте было использовано 56 животных.

Результаты и обсуждение

Исследование массы тела половозрелых белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию с 14 по 19 сут гестации, выявило достоверное снижение показателя в 60-суточном возрасте (табл. 1). Как правило, уменьшение массы тела белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию, регистрируется в течение первого месяца жизни [5]. В последующие возрастные периоды происходит нивелирование отличий между контрольными и подопытными животными по показателю массы тела. Вместе с тем, мы зарегистрировали у половозрелых животных подопытной группы достоверно меньшую массу тела по сравнению с контрольными показателями, как в подгруппе самцов, так и самок. Сниженная масса тела у подопытных животных сопровождалась достоверным снижением массы мозга (табл. 1). Эффект снижения массы мозга животных, перенесших антенатальную гипоксию, сохраняется и при сопоставлении экспериментальных групп «контроль» — «гипоксия», стандартизованных по массе тела. Таким образом, снижение массы мозга подопытных животных не может быть обусловлено только микросомией.

Сохранение отставания массы тела и мозга у половозрелых животных подопытной группы нарушает принцип эквивалентности. Рост мозга на более поздних стадиях развития не может компенсировать его отставание в ранние периоды онтогенеза [11]. О невозможности реализации принципа эквивалентности в развитии мозга свидетельствуют и данные Б.Я. Рыжовского [9].

Наблюдаемые структурные нарушения сопровождались выраженными функциональными изменениями. В тесте «открытого поля» у 30-суточных животных, перенесших антенатальную гипоксию, регистрировалось увеличение количества посещенных квадратов (как пери-

Таблица 1

Масса тела и масса мозга 60-суточных белых крыс контрольной и подопытной групп

Показатель	Контроль	Гипоксия
Масса тела самцов (г)	224,00±3,71	197,92±4,46*; p=0,0007
Масса тела самок (г)	192,78±3,11	167,67±4,90*; p=0,0001
Масса мозга самцов (мг)	1265,83±35,60	1117,04±30,66*; p=0,005

Примечание. * — p<0,05 по отношению к контролю.

Таблица 2

Результаты теста «открытого поля» в группе 30-суточных животных, перенесших антенатальную гипоксию

Показатели	Контроль (самцы)	Гипоксия (самцы)	Контроль (самки)	Гипоксия (самки)
Центральные квадраты	0,25±0,13	1,83±0,71* p=0,038	0,33±0,33	1,00±0,51
Периферические квадраты	20,00±4,63	52,75±6,39* p=0,0004	22,92±4,28	50,50±6,09* p=0,01
Стойки	6,50±1,51	11,08±1,79 p=0,06	5,75±1,02	9,58±1,16* p=0,02
Груминг (с)	2,25±1,38	4,08±1,42	3,17±2,04	5,42±1,93
Кол-во дефекаций	1,17±0,44	0,17±0,17* p=0,045	1,25±0,63	0,17±0,11

Примечание. * — p<0,05 по отношению к контролю.

Резюме

Целью данной работы являлось выяснение функциональных показателей ЦНС у половозрелых крыс, перенесших действие антенатальной гипоксии с 14 по 19 сут гестации. У 60-суточных подопытных животных обнаружено достоверное снижение масса тела и абсолютной массы мозга. В 30- и 60-суточном возрасте у животных, перенесших антенатальную гипоксию, зарегистрированы ряд поведенческих отклонений в тесте открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта. Выявлено увеличение двигательной активности и снижение естественного страха высоты, что свидетельствует о проявлении рискованного поведения и заниженной оценке опасности в стрессовой ситуации. Поведенческие отклонения у половозрелых животных подопытной группы сопровождались усилением процессов свободнорадикального окисления в гомогенатах переднего мозга.

Ключевые слова: антенатальная гипоксия, мозг, поведенческие реакции.

E.N. Sazonova, A.A. Simankova, O.A. Lebedko,
C.Yu. Krizhanovskaya, S.S. Timoshin

EFFECT OF ANTENATAL HYPOXIA ON BEHAVIORAL REACTIONS OF MATURE RATS

The Far eastern state medical university;
Khabarovsk Faculty of State Founding
Scientific research institute of Mother and Child Care;
Railroad hospital, Khabarovsk

Summary

The aim of study was to investigate the physiological development of the brain and behavior in rats subjected to antenatal hypoxia from 14th till 19th day of gestation. We had found that body weight and absolute brain mass of the adult rats were significantly decreased. In adult rats that underwent the action of antenatal hypoxia increased locomotor activity and reduction of the fear of heights have been revealed, that confirms manifestation of risky behavior and underestimation of risk stress. Deviation behavior of adult animals of experimental group was accompanied by strengthening of processes of free radical oxidation in the central nervous system.

Key words: antenatal hypoxia, brain, behavioral responses.

ферических, так и центральных), возрастание количества стоек и снижение количества дефекаций (табл. 2). Кроме того, наблюдалось отчетливое, хотя и недостоверное, увеличение времени груминга. Однотипные изменения имели место как в подгруппе самцов, так и в подгруппе самок. Однако более выраженные изменения поведения в «открытом поле» регистрировались в подгруппе самцов.

Сходные поведенческие изменения были зарегистрированы у 30-суточных подопытных животных в тесте ПКЛ. При тестировании 30-суточных самцов в подопытной группе было выявлено достоверное увеличение времени движения на 53,2%; количества заходов в открытые рукава на 72,1%, числа свешиваний на 73,8% (табл. 3). Сходные по направленности изменения были выявлены в этом тесте у подопытных животных половозрелого

Поведение 30- и 60-суточных самцов белых крыс, перенесших антенатальную гипоксию, в тесте «приподнятого крестообразного лабиринта»

Показатель	Контроль (30-сут)	Гипоксия (30-сут)	Контроль (60-сут)	Гипоксия (60-сут)
Время бездействия (с)	51,35 ±8,23	23,28 ±8,45* p=0,026	50,28 ±13,84	34,05 ±10,08
Время движения (с)	40,17 ±8,31	95,81 ±11,01* p=0,0006	31,96 ±6,49	61,92 ±7,78* p=0,01
Время нахождения в открытых рукавах (с)	57,13 ±17,10	65,61 ±13,80	55,69 ±17,90	47,44 ±10,13
Время нахождения в закрытых рукавах (с)	118,50 ±17,20	111,95 ±13,70	121,08 ±18,03	128,77 ±10,11
Кол-во заходов в открытые рукава	2,08 ±0,36	3,58 ±0,56* p=0,03	2,52 ±0,26	2,94 ±0,32
Кол-во свешиваний	2,33 ±0,53	5,42 ±0,87* p=0,006	2,42 ±0,56	2,78 ±0,45
Кол-во стоек	4,33 ±1,12	4,17 ±0,98	1,50 ±0,50	3,17 ±0,81
Время груминга (с)	5,12 ±1,15	8,34 ±2,72	0,36 ±0,22	4,64 ±1,84 p=0,07

Примечание. * — $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль».

возраста (60 сут): наблюдалось достоверное повышение двигательной активности на 93,7%. При этом у половозрелых животных подопытной группы регистрировалось значительное, в 12,9 раза, увеличение среднего времени груминга. Отличие показателя было статистически недостоверно из-за большой вариабельности, однако можно говорить о статистической тенденции изменения параметра ($p=0,07$).

При обсуждении отдаленных поведенческих отклонений у животных, подвергнутых антенатальной гипоксии, необходимо отметить следующее.

Во-первых, обращает внимание значительное увеличение двигательной активности подопытных животных в обоих проведенных тестах. Этот факт соответствует многочисленным клиническим наблюдениям о гиперактивности детей с минимальной мозговой дисфункцией, как правило, гипоксического генеза. Повышение двигательной активности в тесте открытого поля было показано у 24-суточных белых крыс, подвергнутых с рождения по 24 сут жизни ежедневному введению блокатора NO-синтазы [15]. Подобное воздействие, по данным P. Olivier et al. [14], вызывает существенный дефект миелинизации в ЦНС млекопитающих. Н.В. Маркиной и соавт [8] показана повышенная двигательная активность у мышей, селективированных по малому размеру мозга. Н.Р. Григорьев и соавт. [4] выявили, что животные, имеющие по тестам «отрытого поля» и ПКЛ высокую двигательную активность, характеризуются наименьшими показателями эффективности поискового поведения. По мнению Р. Шовен [10], целенаправленное поисковое поведение — основная форма взаимодействия организма с внешней средой, обеспечивающая его быструю адаптацию к изменяющимся условиям существования.

Во-вторых, существенное увеличение выходов в открытые рукава и свешиваний в ПКЛ у 30-суточных крыс-

Показатели хемилюминесценции гомогенатов тканей головного мозга 60-суточных белых крыс-самцов, подвергнутых антенатальной гипоксии

Показатель	Контроль	Антенатальная гипоксия
$S_{\text{сн}}$ (отн. ед.)	0,102±0,008	0,190±0,020*
Инд. ХМЛ (Fe^{2+})		
H_1 (отн. ед.)	0,650±0,030	1,188±0,060*
$S_{\text{инд.1(2min)}}$ (отн. ед.)	0,405±0,027	0,840±0,062*
Инд. ХМЛ (люминол- H_2O_2)		
H_2 (отн. ед.)	1,410±0,037	2,320±0,070*
$S_{\text{инд.2}}$ (отн. ед.)	2,944±0,090	4,046±0,265*

Примечание. * — $p < 0,05$ по отношению к группе «контроль».

самцов свидетельствует о снижении естественного и имеющего большое защитное значение страха высоты у подопытных животных. Это может быть аналогом рискованного поведения некоторых индивидов в человеческом обществе. Напротив, поведение контрольных животных в открытых рукавах ПКЛ отражает нормальное восприятие опасности, что является адаптивной реакцией [10].

Поведенческие отклонения у половозрелых животных, подвергнутых антенатальной гипоксии, сопровождались интенсификацией в ЦНС процессов свободнорадикального окисления. Анализ ХМЛ-показателей гомогенатов головного мозга 60-суточных животных (табл. 4) продемонстрировал, что антенатальная гипоксия интенсифицировала СРО в тканях головного мозга крыс: величина $S_{\text{сн}}$ возросла в 1,86 раза. Значительный вклад в этот процесс вносит активация перекисного окисления липидов, о чем свидетельствуют: увеличение концентрации гидроперекисей (амплитуда H_1 возросла в 1,83 раза) и ускорение образования перекисных радикалов (величина $S_{\text{инд.1}}$ возросла в 2,10 раза). Выявленные нарушения свободнорадикального статуса обусловлены ослаблением антиоксидантной антирадикальной защиты (величина $S_{\text{инд.2}}$ возросла в 1,37 раза соответственно) и снижением резистентности к перекисному окислению (амплитуда H_2 увеличилась в 1,65 раза). Подобные изменения свободнорадикального статуса расцениваются как наличие оксидативного стресса на органном уровне.

Таким образом, антенатальная гипоксия индуцирует многочисленные структурно-функциональные нарушения в головном мозге млекопитающих, протекающие на фоне оксидативного стресса и сохраняющиеся до половозрелого возраста. Результаты проведенного исследования определяют необходимость дальнейших поисков коррекции отдаленных последствий антенатальной гипоксии.

Выводы

1. Снижение массы тела и массы мозга у белых крыс-самцов, перенесших антенатальную гипоксию, сохраняется, как минимум, до 60-суточного возраста.

2. У 30-суточных животных, перенесших антенатальную гипоксию, по тестам «открытого поля» и «приподнятого крестообразного лабиринта» наблюдается достоверное увеличение общей двигательной активности, возрастание количества вертикальных стоек и снижение количества дефекаций. Увеличение двигательной

активности у крыс-самцов, перенесших антенатальную гипоксию, сохраняется, как минимум, до 60-суточного возраста.

3. Поведенческие отклонения у половозрелых животных, перенесших антенатальную гипоксию, сопровождаются хемилюминесцентно регистрируемой активацией процессов свободнорадикального окисления на органном уровне.

Л и т е р а т у р а

1. Великанова Л.П. Клинико-эпидемиологический мониторинг: состояния нервно-психического здоровья детей и подростков // Педиатрия. - 2004. - №1. - С. 67-70.

2. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Биофизика. - М., 1991. - Т. 29. - С. 147.

3. Граф А.В., Гончаренко Е.Н., Соколова Н.А. и др. Антенатальная гипоксия: участие в развитии патологии ЦНС в онтогенезе // Нейрохимия. - 2008. - Т. 25, №1-2. - С. 11-16.

4. Григорьев Н.Р., Баталова Т.А., Кириченко Е.Ф. и др. Типологические особенности поведения крыс // Рос. физиол. журнал. - 2007. - №8. - С. 817-826.

5. Журавин И.А., Дубровская Н.М., Туманова Н.Л. Постнатальное физиологическое развитие крыс после острой пренатальной гипоксии // Рос. физиол. журнал. - 2003. - №5. - С. 522-532.

6. Игнатъева Р.К. Перинатальные проблемы в России. - М., 2006. - 40 с.

7. Лебедев С.В., Карасев А.В., Рогаткин С.О. и др. Проблемы и перспективы экспериментального моделирования перинатальных гипоксически-ишемических повреждений центральной нервной системы // Вестник Рос. АМН. - 2009. - № 2. - С. 21-26.

8. Маркина Н.В., Попова Н.В., Салимов Р.М. Сравнение уровня тревожности и стресс-реактивности мышей, селектированных на большой и малый вес мозга // Журн. высш. нервн. деятельности. - 1999. - Т. 49, №5. - С. 789-797.

9. Рыжавский Б.Я. Развитие головного мозга: отдаленные последствия влияния некомфортных условий. - Хабаровск, 2009. - 278 с.

10. Шовен Р. Поведение животных. - М.: Мир, 1972. - 487 с.

11. Gale C.R., O'Callaghan F.J., Bredow M., Martyn C.N. The influence of head growth in fetal life, infancy, and childhood on intelligence at the ages of 4 and 8 years // Pediatrics. - 2006. - Vol. 118, №4. - P. 1486-1492.

12. Gross J., Burgoyne R.D., Rose S.P. Influence of prenatal hypoxia on brain development: effect on body weight, brain weight, DNA, protein, acetylcho-linesterase, 3-quinuclidinyl benzilate binding, and in vivo incorporation of lysine into subcellular fraction // Pediatr Res. - 1999. - Vol. 46, №2. - P. 41-45.

13. Li G., Xiao Y., Estrella J.L. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat // J Soc Gynecol Investig. - 2003. - Vol. 10, №5. - P. 265-74.

14. Olivier P., Loron G., Fontaine R.H. et al. Nitric oxide plays a key role in myelination in the developing brain // J Neuropathol Exp Neurol. - 2010. - №69(8). - P. 828-837.

15. Prickaerts J., De Vente J., Markerink-Van Ittersum M. et al. Behavioural, neurochemical and neuroanatomical effects of chronic postnatal N-nitro-L-arginine methyl ester treatment in neonatal and adult rats // Neuroscience. - 1998. - №87(1). - P. 181-195.

Координаты для связи с авторами: Сазонова Елена Николаевна — доктор мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ, зав. кафедрой нормальной физиологии ДВГМУ, тел.: 8(924) 206-34-63, e-mail: sazen@mail.ru; Симанкова Анна Александровна — студентка 5 курса педиатрического факультета ДВГМУ, тел.: 8(962) 229-12-26; Лебедько Ольга Антоновна — доктор мед. наук, вед. науч. сотр. НИИ ОМиД, e-mail: leoaf@mail.ru; Крыжановская Светлана Юрьевна — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. ЦНИЛ ДВГМУ; Тимошин Сергей Серафимович — зав. ЦНИЛ ДВГМУ, тел.: 8(4212) 32-99-64, e-mail: timoshinss@yandex.ru.

