

DOI 10.31718/2077-1096.24.1.89

УДК: 616-001-092.8: 623.565:159.929:616.89-008.46

Козлова Ю.В.

ДОСЛІДНИЦЬКА ДІЯЛЬНІСТЬ ЩУРІВ У ГОСТРОМУ ПЕРІОДІ ЛЕГКОЇ ВИБУХО-ІНДУКОВАНОЇ ТРАВМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, Україна

Актуальність роботи пов'язана з розповсюдженням застосуванням вибухових пристроїв у воєнних конфліктах. Більш поширеною і «невидимою» є легка вибухо-індукована травма головного мозку. Тривожність, зміни емоційності, порушення просторової пам'яті є основними симптомами. Проте, варіацій способів моделювання вибухо-індукованої травми головного мозку і способів дослідження просторової пам'яті є велика кількість. Тому, метою представленої роботи стало вивчення дослідницької діяльності щурів у гострому періоді легкої вибухо-індукованої травми головного мозку, що відтворювалась із застосуванням розробленого нами пристрою. Дослідження проведено на 18 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар, масою 220-270 г. Відібрані щури були розділені на три групи: експериментальна група (n=6), тваринам якої моделювали вибухо-індуковану травму шляхом генерації повітряної ударної хвилі з надлишковим тиском $26,4 \pm 3,6$ кПа, контрольна (n=6) тварини якої піддавались тільки інгаляційному наркозу галотаном і фіксації в горизонтальному положенні та інтактна (n=6). Дослідження орієнтовно-дослідницької діяльності проводили на 1, 3 та 7 добу посттравматичного періоду із застосуванням лабіринту Барнса. Дослідницьку активність фіксували камерою iPhoneXR, надалі графічно зображали маршрут переміщення по лабіринту щурів трьох груп і візуально аналізували, а також підраховували кількість заходів у «фальшиві притулки» та порівнювали показники експериментальних, контрольних та інтактних щурів. У 1-шу добу посттравматичного періоду у експериментальних щурів спостерігали дослідження більшої кількості «фальшивих притулків» на 72% (p<0.01) порівняно з інтактними тваринами і на 65% (p<0.05) порівняно з контрольними тваринами. У 3-тю добу на 53% (p<0.05) у порівнянні з інтактними і на 67% (p<0.05) у порівнянні з контрольними щурами. На 7-му добу експериментальні щури обстежували більше на 86% (p<0.01) у порівнянні з інтактними і також на 86% (p<0.01) у порівнянні з контрольними тваринами. Отримані результати свідчать про підвищення дослідницької діяльності щурів у гострому періоді легкої вибухо-індукованої травми головного мозку.

Ключові слова: вибух, головний мозок, просторова пам'ять, гіпокамп, лабіринт Барнса.

This study is a part of the initiative research project of the Department of Pathological Anatomy, Forensic Medicine and Pathological Physiology, Dnipro State Medical University: Mechanisms of formation of changes in the central nervous system under the influence of extreme factors, state registration number 0120U105394.

Вступ

Вплив вибуху на організм сьогодні активно досліджується, що пов'язано з розповсюдженням застосуванням вибухових пристроїв у воєнних конфліктах по всьому світу, в тому числі й на території України через повномасштабне російське вторгнення [1, 2]. Відомо, що більш поширеною і «невидимою» є легка вибухо-індукована травма головного мозку (ВІТГМ) через безпосередній вплив вибухової хвилі [3]. Сучасні дані указують на те, що вибухова хвиля, за рахунок надлишкового тиску, розповсюджується швидше звуку середовища, проникає крізь отвори черепа та навіть тканини голови і призводить до дифузного пошкодження позаклітинного матриксу і нейронів за рахунок ефекту кавітації [4, 5]. Також, надлишковий тиск вибухової хвилі створює навантаження, що стискає і призводить до розпаду молекул [6]. Такі первинні зміни призводять до активації процесів вторинного пошкодження, серед яких встановленими є оксидативний стрес, метаболічні порушення нейронів у гострому періоді з наступним накопиченням речовин - факторів нейродегенерації у віддаленому періоді [7, 8].

Клінічними ознаками легкої ВІТГМ є різноманітні психіатричні захворювання, в тому числі посттравматичний стресовий розлад, депресія, тривога, агресивність, апатія, порушення пам'яті

та ін. Симптоми цих захворювань визначаються й при експериментальних дослідженнях [9, 10]. Зокрема, установлені тривожність, зміни емоційності, порушення просторової пам'яті [11]. Такі симптоми пов'язують з високою чутливістю до вибухової хвилі гіпокампу, хоча ВІТГМ є дифузним пошкодженням [12]. Одним з ключових показників, що характеризують просторову пам'ять є здатність до дослідження і наступної адаптації у новому та подальша орієнтація у знайомому середовищі [13]. Проте, варіацій способів моделювання ВІТГМ і способів дослідження просторової пам'яті є велика кількість, а дослідження проводяться в різні періоди посттравматичного періоду.

Тому, метою представленої роботи стало вивчення дослідницької діяльності щурів у гострому періоді легкої вибухо-індукованої травми головного мозку, що відтворювалась із застосуванням розробленого нами пристрою.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на 18 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар, масою 220-270 г. Тварини утримувались у стандартних умовах та на стандартному раціоні віварію Дніпровського державного медичного університету (ДДМУ). Процедури відповідали "Загальним етичним принципам експериментів на тваринах", прийня-

тим П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013), та керувалися рекомендаціями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних досліджень та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Було докладено максимум зусиль, щоб звести до мінімуму як страждання, так і кількість тварин, про що свідчить витяг з протоколу засідання комісії з питань біомедичної етики ДДМУ № 3 від 02.11.2021.

Відібрані щури були розділені на три групи: експериментальна група (n=6), тварин якої піддавали інгаляційному наркозу галотаном (Halothan Hoechst AG, Germany), фіксували в горизонтальному положенні на животі головою до дульного кінця на відстані 5 см та моделювали вибухо-індуковану травму головного мозку шляхом генерації повітряної ударної хвилі з надлишковим тиском $26,4 \pm 3,6$ кПа на пристрої, що виготовлений власноруч [14], контрольна (n=6) тварини якої піддавались тільки інгаляційному наркозу галотаном і фіксації в горизонтальному положенні та інтактна (n=6). Щури контрольної та інтактною груп створені для відмежування дії додаткових патогенних факторів (наркоз, фіксування).

Дослідження дослідницької діяльності проводили на 1, 3 та 7 добу посттравматичного періоду із застосуванням лабіринту Барнса, що представлений ареною діаметром 122 см з пластику чорного кольору, яка зафіксована на рівні 100 см від поверхні полу на металевій підставці. По периметру арени було розташовано на однаковій відстані один від одного та від центра 20 отворів діаметром 10,5 см. Один з отворів перетворено на притулок. Решта отворів є «фальшивими притулками» - не глибокі, в яких неможливо сховатись. В центрі арени знаходилась закрита камера, яку можливо було прибрати. Перед тестуванням усі тварини проходили 5-ти денне навчання, після якого було відібрано тільки тих тварин, які знаходили притулок протягом 5 хвилин [15]. Для проведення експерименту щурів за 30 хвилин заносили з віварію в лабораторію. Кожну тварину на 2 хвилини розміщали в притулок, після чого діставали і переміщували в закриту камеру в центрі арени, яку відразу прибирали, і щур опинявся на відкритій площі. Після кожної тварини арену обробляли спиртовим розчином. Дослідницьку активність від початку до того моменту, коли щур знаходив справжній притулок, фіксували камерою iPhoneXR на штативі у процесі навчання та у 1, 3 і 7 добу після відтворення ВІТГМ. Надалі графічно зображали маршрут переміщення по лабіринту щурів трьох груп і візуально аналізували, а також підраховували кількість заходів у «фальшиві притулки» та порівнювали показники експериментальних, контрольних та інтактних щурів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою Excel 2016 та програмного проду-

кту STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., серійний № AGAR909E415822FA). Математична обробка включала розрахунки середніх арифметичних значень (M) та стандартних відхилень ($M \pm SD$). Для визначення ступеню та характеру зв'язку між параметрами дослідження було використано порівняльний аналіз (U-критерій Манна-Уїтні) при порогах достовірності $p < 0.01$, $p < 0.05$ [16].

Результати дослідження

Лабіринт Барнса дозволяє вивчати здатність тварин досліджувати та орієнтуватися на відкритому просторі, а також їхню здатність до формування нових просторових стратегій, що підкріплюється можливістю сховатись [15].

На рис. 1 представлено динаміку навчання щурів трьох груп у лабіринті Барнса. В 1-шу добу тварин розміщали у центрі арени і чекали, поки кожна тварина знайде притулок. З кожним днем навчання тварини все менше обстежували «фальшиві» притулки. І у 5 добу навчання всі тварини добре пам'ятали про те, що у них є можливість сховатись при потраплянні на відкриту арену лабіринту, про що свідчило зменшення кількості обстежених «фальшивих» притулків.

Після 5-го дня навчання щурам експериментальної групи відтворювали ВІТГМ і через 1 добу проводили дослідження орієнтовно-дослідницької діяльності в лабіринті Барнса за тих самих умов, що і навчання та підраховували кількість обстежених «фальшивих» притулків (табл. 1).

Вже у 1-шу добу посттравматичного періоду (рис. 2) у експериментальних щурів спостерігали дослідження більшої кількості «фальшивих» притулків на 72% ($p < 0.01$) порівняно з інтактними тваринами і на 65% ($p < 0.05$) порівняно з контрольними тваринами.

На 3-тю добу щури експериментальної групи все ще активно досліджували арену лабіринту Барнса (рис. 3).

Так, кількість обстежених «фальшивих» притулків експериментальними щурами була більшою на 53% ($p < 0.05$) у порівнянні з інтактними і на 67% ($p < 0.05$) у порівнянні з контрольними щурами. Порівняння показників експериментальної групи у 1-шу та 3-тю добу показало зменшення кількості обстежених «фальшивих» притулків на 40% ($p > 0.05$) у 3-тю добу.

На 7-му добу посттравматичного періоду орієнтовно-дослідницька діяльність експериментальних щурів була вищою, ніж у 3-тю добу на 49% ($p > 0.05$) і ніж у 1-шу добу на 15% ($p > 0.05$). Порівняння експериментальної групи з інтактною і контрольною групами також свідчило про збільшення активності щурів з ВІТГМ (рис. 4).

Кількість «фальшивих» притулків, що обстежували експериментальні щури була більшою на 86% ($p < 0.01$) у порівнянні з інтактними і також на 86% ($p < 0.01$) у порівнянні з контрольними тваринами.

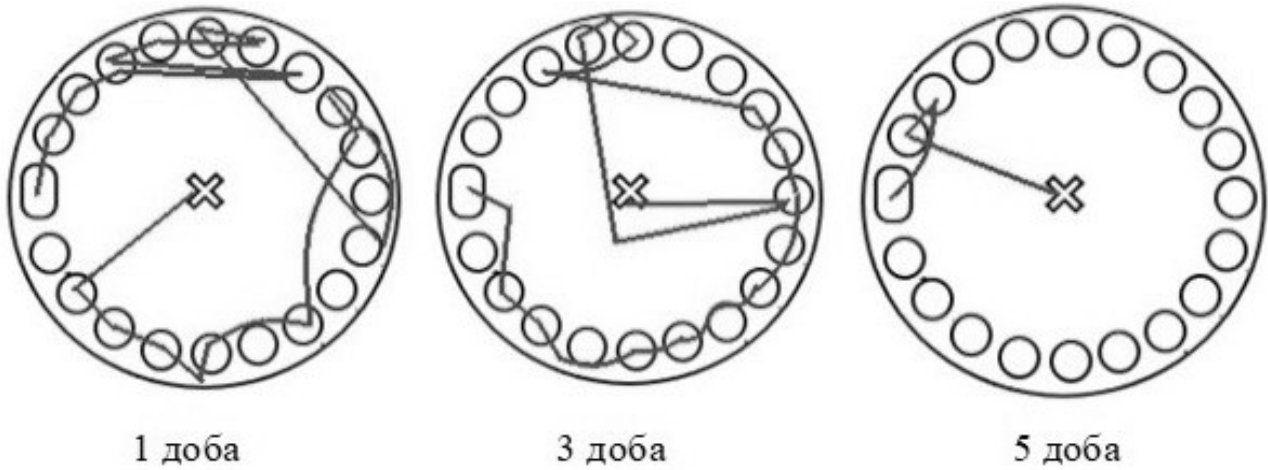


Рис. 1. Динаміка навчання щурів у лабіринті Барнса.

Таблиця 1.
Кількість заходів у «фальшиві» притулки у лабіринті Барнса

Група тварин	Інтактна	Контрольна	Експериментальна
1 доба	2,8±1,5	3,5±1,8	10±6,7 ^{*/**}
3 доба	2,8±1,6	2±1,2	6±3 ^{**/*}
7 доба	1,7±1,5	1,7±0,9	11,8±3 ^{*/*}

Примітка: результати вважались статистично достовірними

* - $p < 0.01$ між експериментальною та інтактною/контрольною групами,

** - $p < 0.05$ між експериментальною та інтактною/контрольною групами



Рис. 2. Динаміка дослідницької діяльності щурів у лабіринті Барнса в 1-шу добу посттравматичного періоду експериментальних щурів.



Рис. 3. Динаміка дослідницької діяльності щурів у лабіринті Барнса в 3-тю добу посттравматичного періоду експериментальних щурів.



Рис. 4. Динаміка дослідницької діяльності щурів у лабіринті Барнса в 7-му добу посттравматичного періоду експериментальних щурів.

Обговорення одержаних результатів

Методика вивчення дослідницької діяльності щурів за допомогою лабіринту Барнса ґрунтується на простому та малостресовому експерименті, спрямованому на оцінку здібності запам'ятовування та просторової навігації тварин [17]. У цьому експерименті на відкритому майданчику тварина шукає лише одним справжній притулок, де тварина відчуває себе безпечно. Зменшення кількості обстежених «фальшивих» притулків вважається індикатором збереження пам'яті у щурів.

Проведене вивчення дослідницької діяльності щурів у гострому періоді ВІТГМ, що відтворювалась із застосуванням розробленого нами пристрою показало значне пошкодження просторової пам'яті у щурів експериментальної групи у весь термін спостереження. Подібні результати були отримані й іншими науковцями із застосуванням різних лабіринтів [11]. Проте, у 3-тю добу кількість обстежених «фальшивих» притулків була найменшою. Вважаємо, що саме у цей період розвиваються компенсаторні механізми, що підвищують функціональну активність головного мозку. А у 7-му добу відбувається декомпенсація, про що свідчить погіршення у порівнянні з 1-ою добою, про що свідчить підвищення дослідження лабіринту Барнса.

Центром просторової пам'яті у головному мозку вважається гіпокамп, про що свідчать дослідження на щурах [18]. Гіпокамп допомагає орієнтуватися у просторі, зберігаючи інформацію про місця та навколишнє середовище. Це дозволяє щурам і людям навчатися та запам'ятовувати, як дістатися до різних місць та навколишніх об'єктів [19]. Гіпокамп також відомий своєю здатністю до нейропластичності, тобто здатністю перебудовуватися та адаптуватися до нових умов, що дозволяє адаптуватися до змін у навколишньому середовищі [20].

Враховуючи ці дані, а також результати нашого дослідження, можна зазначити, що ВІТГМ призводить до порушення просторової пам'яті у

гострому періоді з погіршенням на 7-му добу.

Висновки

1. У 1-шу добу посттравматичного періоду у експериментальних щурів спостерігали дослідження більшої кількості «фальшивих» притулків на 72% ($p < 0.01$) порівняно з інтактними тваринами і на 65% ($p < 0.05$) порівняно з контрольними тваринами.

2. У 3-тю добу кількість обстежених «фальшивих» притулків експериментальними щурами була більшою на 53% ($p < 0.05$) у порівнянні з інтактними і на 67% ($p < 0.05$) у порівнянні з контрольними щурами.

3. На 7-му добу експериментальні щури обстежували «фальшиві» притулки більше на 86% ($p < 0.01$) у порівнянні з інтактними і також на 86% ($p < 0.01$) у порівнянні з контрольними тваринами.

4. Отримані результати свідчать про підвищення дослідницької діяльності щурів у гострому періоді легкої вибухо-індукованої травми головного мозку, що відтворювалась із застосуванням розробленого нами пристрою, і вказують на порушення просторової пам'яті.

Конфлікт інтересів:

Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів.

References

1. Varghese N, Morrison B 3rd. Partial depletion of microglia attenuates long-term potentiation deficits following repeated blast traumatic brain injury in organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurotrauma*. 2023;40(5-6):547-560. doi: 10.1089/neu.2022.0284.
2. Zhang JK, Botterbush KS, Bagdady K, Lei CH, Mercier P, Mattei TA. Blast-related traumatic brain injuries secondary to thermobaric explosives: implications for the war in Ukraine. *World Neurosurg*. 2022;167:176-183.e4. doi: 10.1016/j.wneu.2022.08.073.
3. McNamara EH, Tucker LB, Liu J, Fu AH, Kim Y, Vu PA, McCabe JT. Limbic responses following shock wave exposure in male and female mice. *Front Behav Neurosci*. 2022;16:863195. doi: 10.3389/fnbeh.2022.863195.
4. Huang X, Xia B, Chang L, Liao Z, Zhao H, Zhang L, Cai Z. Experimental study on intracranial pressure and biomechanical response in rats under the blast wave. *J Neurotrauma*. 2022;23. doi: 10.1089/neu.2022.0229.
5. Kingston ACN, Woodin SA, Wethey DS, Speiser DI. Snapping shrimp have helmets that protect their brains by dampening shock waves. *Curr Biol*. 2022;32(16):3576-3583.e3. doi: 10.1016/j.cub.2022.06.042.

6. Mahmud KAHA, Hasan F, Khan MI, Adnan A. Shock-induced damage mechanism of perineuronal nets. *Biomolecules*. 2021;12(1):10. doi: 10.3390/biom12010010.
7. Kuriakose M, Younger D, Ravula AR, Alay E, Rama Rao KV, Chandra N. Synergistic role of oxidative stress and blood-brain barrier permeability as injury mechanisms in the acute pathophysiology of blast-induced neurotrauma. *Sci Rep*. 2019;9(1):7717. doi: 10.1038/s41598-019-44147-w.
8. Acosta G, Race N, Herr S, Fernandez J, Tang J, Rogers E, Shi R. Acrolein-mediated alpha-synuclein pathology involvement in the early post-injury pathogenesis of mild blast-induced Parkinsonian neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci*. 2019;98:140-154. doi: 10.1016/j.mcn.2019.06.004.
9. Ratliff WA, Mervis RF, Citron BA, Schwartz B, Rubovitch V, Schreiber S, Pick CG. Mild blast-related TBI in a mouse model alters amygdalar neurostructure and circuitry. *Exp Neurol*. 2019;315:9-14. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.01.020.
10. Anderson LM, Samineni S, Wilder DM, Lara M, Eken O, Urioste R, Long JB, Arun P. The Neurobehavioral effects of Buprenorphine and Meloxicam on a blast-induced traumatic brain injury model in the rat. *Front Neurol*. 2021;12:746370. doi: 10.3389/fneur.2021.746370.
11. Nonaka M, Taylor WW, Bukalo O, Tucker LB, Fu AH, Kim Y, McCabe JT, Holmes A. Behavioral and myelin-related abnormalities after blast-induced mild traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*. 2021;38(11):1551-1571. doi: 10.1089/neu.2020.7254.
12. Ratliff WA, Mervis RF, Citron BA, Schwartz B, Rubovitch V, Schreiber S, Pick CG. Effect of mild blast-induced TBI on dendritic architecture of the cortex and hippocampus in the mouse. *Sci Rep*. 2020;10(1):2206. doi: 10.1038/s41598-020-59252-4.
13. Glikmann-Johnston Y, Fink KD, Deng P, Torrest A, Stout JC. Spatial memory in Huntington's disease: A comparative review of human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019;98:194-207. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.01.015.
14. Kozlova YuV, Abdul-Ogly LV, Kosharnyj AV, Kytova IV, Korzachenko MA, inventors; Kozlova YuV, assignee. Device for studying the effect of the shock wave of an explosion on the body. Ukraine patent 146858. 2021 Mar 25. (Ukrainian).
15. Cheryl SR, Sherry AF. Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. *J. Vis. Exp.* 2014;84:1-15. doi: 10.3791/51194.
16. Antomonov MY, Korobeinikov HV, Khmelnytska IV, Kharkoviuk-Balagina NV. Matematychni metody obrobky ta modeliuвання rezultativ eksperymentalnykh doslidzhen [Mathematical methods of processing and modeling the results of experimental studies]. Kyiv; 2021. 216 p. (Ukrainian).
17. Dyomina AV, Smolensky IV, Zaitsev AV. Refinement of the Barnes and Morris water maze protocols improves characterization of spatial cognitive deficits in the lithium-pilocarpine rat model of epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2023;147:109391. doi: 10.1016/j.yebeh.2023.109391.
18. Duda W, Weśnierska M. Spatial working memory in rats: Crucial role of the hippocampus in the allothetic place avoidance alternation task demanding stimuli segregation. *Behav Brain Res*. 2021;412:113414. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113414.
19. Nemati SS, Sadeghi L, Dehghan G, Sheibani N. Lateralization of the hippocampus: A review of molecular, functional, and physiological properties in health and disease. *Behav Brain Res*. 2023;454:114657. doi: 10.1016/j.bbr.2023.114657.
20. Goto A. Synaptic plasticity during systems memory consolidation. *Neurosci Res*. 2022;183:1-6. doi: 10.1016/j.neures.2022.05.008.

Summary

EXPLORATORY ACTIVITY OF RATS IN THE ACUTE PERIOD OF MILD BLAST-INDUCED TRAUMATIC BRAIN INJURY

Kozlova Yu.V. Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine

Key words: explosion, brain, spatial memory, hippocampus, Barnes maze.

The relevance of this work is related to the widespread use of explosive devices in military conflicts. More common and "invisible" is mild blast-induced brain injury. This can manifest through anxiety, emotional dysregulation, and spatial memory impairments. However, significant variability exists in modeling blast-induced traumatic brain injury and spatial memory assessment methods. This study aimed to investigate the exploratory activity of rats during the acute phase of mild blast-induced traumatic brain injury modelled by using a newly developed device.

The study carried out on 18 sexually mature male Wistar rats weighing 220-270 g. The selected rats were divided into three groups: an experimental group (n=6), animals were modeled with blast-induced trauma by generating an air shock wave with an overpressure of 26.4±3.6 kPa, sham group (n=6), animals were subjected only to inhalation anesthesia with halothane and fixed in a horizontal position, and an intact group (n=6). The exploratory activity was recorded by the iPhoneXR camera; the route of movement through the maze of rats from three groups was graphically depicted and visually analyzed, as well as the number of entries into the "false shelters" was counted and the performance of experimental, sham and intact rats was compared. On the 1st day of the post-traumatic period, the experimental rats explored a greater number of "false shelters", by 72% (p<0.01) compared to intact animals and by 65% (p<0.05) compared to control animals. On the 3rd day, this activity was higher by 53% (p<0.05) compared to intact and by 67% (p<0.05) compared to control rats. On day 7, experimental rats explored more, by 86% (p<0.01) compared to intact rats and also by 86% (p<0.01) compared to control animals. The obtained results indicate an increase in the exploratory activity of rats in the acute period of mild blast-induced brain injury.