

УДК 57

ВЛИЯНИЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА В ПОЛОСТЬ НОСА КРЫС НА УСЛОВНЫЙ РЕФЛЕКС ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ И УРОВЕНЬ МОНОАМИНОВ В ГИПОТАЛАМУСЕ

© 2024 г. А. Г. Королев^{1,2,*}, И. В. Кастыро², А. Н. Иноземцев¹, А. В. Латанов¹

Представлено академиком РАН И.В. Решетовым

Поступило 15.01.2024 г.

После доработки 07.02.2024 г.

Принято к публикации 08.02.2024 г.

В биологической модели септопластики на крысах исследовано влияние операции на выработку условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Показано, что септопластика усиливает тревожность и уменьшает исследовательскую активность грызунов в условиях УРПИ. Нейрохимический анализ гипоталамуса, проведенный сразу после окончания эксперимента, выявил повышение метаболизма норадреналина у крыс после септопластики, что может быть связано с активацией гипоталамо-гипофизарной-надпочечниковой оси.

Ключевые слова: крысы, септопластика, пассивное избегание, память, стресс, норадреналин

DOI: 10.31857/S2686738924030028, **EDN:** VUVPIO

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее распространенных хирургических вмешательств в отоларингологии является септопластика — операция на носовой перегородке. Особенностью области, в которой проводится данная процедура, является ее анатомическая близость к головному мозгу и обширная иннервация черепно-мозговыми нервами. Эта особенность обусловила большой интерес исследователей. Большинство работ касается регенерации тканей в месте повреждения и поиска оптимального метода их иссечения. Исследования на людях и животных показали, что в результате операции формируются продолжительные морфологические изменения в области оперативного вмешательства [1], болевой синдром, гипоксия и гиперкапния [2]. Было показано также, что в течение недели после операции у крыс выявляются увеличение экспрессии белков апоптоза и морфологические изменения нейронов в различных отделах

гиппокампа [3]. Кроме того, после операции развивались неспецифические адаптационные реакции на хирургический стресс в виде чрезмерной активации симпатических реакций организма [4].

Влияние септопластики на обучение и память до настоящего времени не изучалось. Целью нашей работы стал анализ влияния септопластики на выработку условного рефлекса пассивного избегания в трехкамерной установке, позволяющей исследовать процесс формирования памяти, включая ее пространственный компонент. Дополнительно исследовались изменения в метаболизме норадреналина в гипоталамусе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 16 самцах крыс Вистар (питомник — Филиал “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства” России) массой 320–360 г, в возрасте 3.5 месяца. Животных содержали по 4 крысы в клетке в условиях 12-часового светового дня при свободном доступе к воде и корму. Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU.

Крысы контрольной группы (n = 8) подвергались общей анестезии посредством внутрибрюшинной инъекции комбинированного препарата “Золетил 100” (телетамин + золазепам в дозировке 30 мг/кг).

¹Кафедра высшей нервной деятельности, Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Медицинский институт ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Россия

*e-mail: korolevpost@gmail.com

Экспериментальным крысам ($n = 8$) под общей анестезией проводили септопластику.

Суть методики состоит в формировании морфологических изменений слизистой оболочки и подслизистого слоя перегородки носа, а также местных реакций иммунной системы, аналогичных тем, что возникают после операции септопластики на человеке.

Для унилатерального повреждения носовой перегородки крысе в ноздрю на глубину 20–25 мм вводили металлический зонд длиной 100 мм. После введения зонда зигзагообразными движениями проводилась скарификация слизисто-надхрящечного слоя носовой перегородки. Для предупреждения асфиксии кровь аспирировали электроаспиратором.

На 4-й послеоперационный день начинали выработку УРПИ [5]. Опыт проводили в установке ($90 \times 30 \times 30$ см), состоящей из центрального освещенного отсека (90 лк) с гладким полом и двух боковых темных отсеков с решетчатым электрифицированным полом из стальных прутьев. Отсеки были разделены перегородками с дверками. В первый день крысу сажали в центральный освещенный отсек и в течение 5 мин наблюдали за ее поведением. Через 24 ч начинали выработку УРПИ. Для этого крысу снова сажали в центральный отсек, и когда животное переходило в один из боковых темных отсеков, дверка за ней закрывалась, блокируя выход, и крыса получала удар током силой 0.7 мА в течение 5 с. Далее крысу возвращали в домашнюю клетку. Темный отсек, в котором крыса получила удар током, в протоколе отмечали как “опасный”, а противоположный темный отсек — как “безопасный”. На третий день, через 24 ч, тестировали след памяти об ударе током. Для этого крысу, как и в день выработки УРПИ, сажали на обычную стартовую позицию и в течение 5 мин регистрировали активность животного. В ходе опыта регистрировали латентный период перехода в темный отсек (ЛП, в секундах) и выбор отсека, время обследования входов в отсеки (продолжительность обнюхиваний входов и заглядывания в них, с), стойки (n) и замирания (с).

После тестирования УРПИ крыс декапитировали и извлекали головной мозг. На льду из мозга выделяли гипоталамус, помещали его в эппендорф, взвешивали и немедленно замораживали в жидком азоте. Содержание моноаминов и их метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, США) с аналитической колонкой ReproSil-Pur ODS (C18, 100×4 мм, 3 мкм) (Dr. Maisch, Германия). Скорость элюции подвижной фазы составляла 1.0 мл/мин, давление ~200 атм. Перед экспериментами по определению содержания нейротрансмиттеров пробы размельчали в гомогенизаторе Поттера (тефлон–стекло) в 1 мл 0.1 N HClO₄

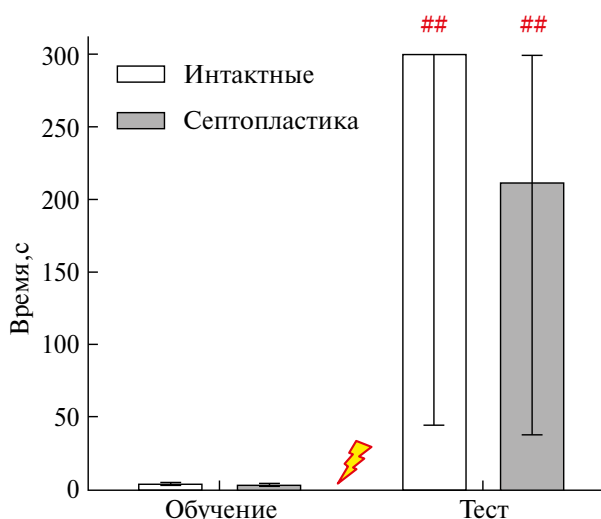


Рис. 1. ЛП ухода в темный отсек до и после выработки УРПИ.

* – различие значимо ($p < 0.05$) по U-критерию Манна–Уитни при сравнении с контрольной группой; # – ($p < 0.05$) и ## ($p < 0.01$) по T-критерию Вилкоксона.

с добавлением 3,4-диоксибензиламина (0.5 нмоль/мл) в качестве внутреннего стандарта. Пробы центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин. Мобильная фаза состояла из: 0.1 М цитратно-фосфатного буфера, содержащего 1.1 mM октансульфоновой кислоты, 0.1 mM ЭДТА и 9%-го ацетонитрила (pH 3.0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4B (BAS, США) на двойном стеклоугольном электроде (+0.85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Для регистрации образцов и обработки данных использовали программу “Мультихром” 1.5 (“Амперсенд”, Россия). Расчет концентрации моноаминов проводили методом “внутреннего стандарта”, который анализирует отношения площади пиков хроматограммы для образцов головного мозга и в стандартной смеси (для калибровки использовали смесь рабочих стандартов определяемых веществ в пикомолярных концентрациях) [6].

Оценку значимости межгрупповых различий и внутригрупповых различий проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни и T-критерия Вилкоксона в GraphPad Prism 8.0 (“GraphPad Software”, США). Значимость различий частоты заходов в опасный и безопасный отсеки рассчитывали с помощью критерия согласия частот [7] в STADIA 8.0 (Россия). На графиках данные представлены в виде медиан с межквартильным размахом (Q25–Q75).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Контрольные и опытные крысы, помещенные в центральный отсек до удара током, быстро переходили в один из темных отсеков, что отразилось

Таблица 1. Выбор крысами отсека в день тестирования УРПИ

Группа	Выбранный отсек							
	Опасный		Центральный		Безопасный			
	n	%	n	%	n	%	Z	p
Интактные	3	37.5	5	62.5	0	0	2.562	0.0104*
Септопластика	1	12.5	4	50	3	37.5	1.732	0.08327

* — величины критериев согласия частот и уровней значимости указаны относительно величины выбора “опасного” отсека (Опасный отсек vs, Безопасный отсек, $p < 0.05$).

в одинаково коротких ЛП соответствующей реакции (рис. 1). Удар током крыс контрольной и опытной групп привел к многократному росту ЛП ухода из центрального отсека, в среднем увеличившись в 100 и 60 раз соответственно. Согласно классическим представлениям [8], увеличение ЛП этой реакции свидетельствует о формировании следа памяти об ударе током в темном отсеке, позволяющем избегать захода в него при повторном помещении в установку и оставаться в освещенном отсеке.

Использованная нами модификации теста позволила получить данные о пространственном компоненте УРПИ. Результаты опыта показывают, что крысы заходят в опасный отсек не реже, чем выбирают безопасный отсек или остаются в центральном отсеке (табл. 1). Более того, контрольные крысы парадоксальным образом статистически значимо чаще заходят в опасный отсек, если не остаются в центральном

отсеке. Эти результаты согласуются с полученными ранее [5]. Из результатов следует заключить, что след памяти отражает только электроболевое воздействие как таковое безотносительно к месту его нанесения. Таким образом, септопластика не повлияла на оба использованных показателя памяти. Это произошло, по нашему мнению, по следующим причинам. Септопластика не уменьшила выбор безопасного отсека из-за того, что этот показатель исходно находился на минимальном уровне; для выявления влияния на ЛП, как показывает экспериментальная практика, требуются большие выборки.

Дополнительная информация об эффектах септопластики была получена из анализа 5-минутных наблюдений за поведением крыс. Было установлено, что до удара током время обследования входов и число стоек у опытных и контрольных крыс значимо не отличались (рис. 2, а–б).

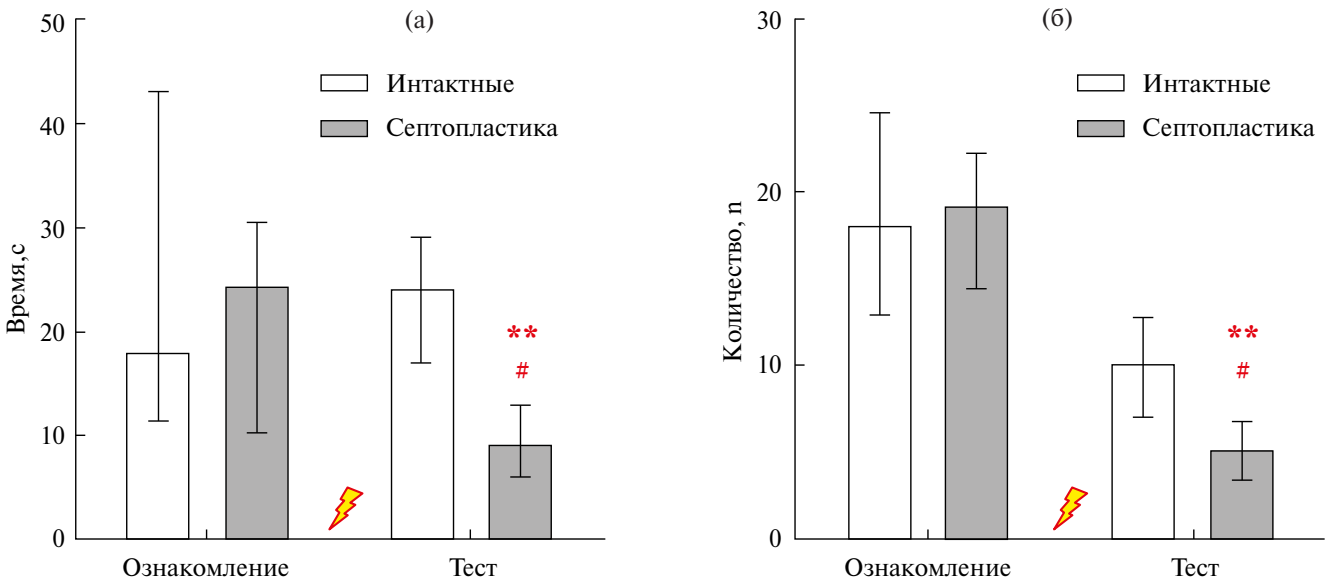


Рис. 2. Влияние септопластики на а — время обследования входов и б — количество стоек до и после выработки УРПИ.

** — различие значимо ($p < 0.01$) по U-критерию Манна–Уитни при сравнении с контрольной группой; # — различие значимо ($p < 0.05$) по T-критерию Вилкоксона при сравнении показателей до и после удара током.

Таблица 2. Содержание моноаминов и их метаболитов (нмоль/г ткани) в гипоталамусе крыс

Группа	НА	МОФЕГ	МОФЕГ/НА
Интактные	9.5 ± 3.2	0.06 ± 0.04	0.006 ± 0.004
Септопластика	9.05 ± 3.4	0.10 ± 0.04*	0.011 ± 0.006*

*— различие значимо ($p < 0.05$) по U-критерию Манна-Уитни при сравнении с контрольной группой.

При тестировании УРПИ у опытных крыс, как это следует из рис. 2, обнаружены уменьшение времени обследования входов в темные отсеки и числа стоек относительно как исходных, так и контрольных значений. Это свидетельствует об уменьшении исследовательской активности у крыс под влиянием септопластики. Кроме того, выявлены значимые различия ($p = 0.004$) во времени реакции замирания: у крыс опытной группы оно составило 19.1 (12.1–41.9) с, а контрольной 2.8 (0–8.2) с, что свидетельствует о повышенном уровне тревожности у опытных животных в условиях УРПИ.

Из литературы известно, что тревожность связана с повышением уровня глюкокортикоидов в крови [9]. Спустя несколько дней после септопластики наблюдается повышение уровня кортизола у человека [10] и кортикостерона у крыс [11], что свидетельствует о продолжительной активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Операция влияет на вариабельность сердечного ритма у крыс в результате усиления симпатического тонуса ЦНС [11]. На фоне физиологического стресса, предварительно вызванного социальной изоляцией [12], происходит изменение выработки УРПИ в виде уменьшения ЛПУхода в темный отсек.

Так как нейрогуморальные механизмы тревожности и стресса во многом зависят от активности гипоталамуса, мы исследовали изменения концентрации и метаболизма норадреналина в данной структуре. Обнаружено, что у опытных животных наблюдалось значимое увеличение относительно контроля метаболита норадреналина 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля (МОФЕГ) и соотношение МОФЕГ/НА (табл. 2).

Из литературных данных известно, что воздействие различных стрессирующих факторов, в том числе тока при выработке рефлексов, приводит к усилению активности норадренергической системы и метаболизма данного нейромедиатора в гипоталамусе и миндалине [13]. Перечисленные изменения связаны с повышенной тревожностью и психоэмоциональным стрессом, а также выработкой и воспроизведением следа памяти [14]. Зафиксированный нами рост метаболизма НА согласуется с перечисленными фактами и высокой тревожностью крыс, перенесших септопластику.

Таким образом, на биологической модели септопластики было показано усиление тревожности,

сопровождающееся ростом метаболизма норадреналина у крыс, перенесших операцию, в условиях УРПИ. Полученные результаты согласуются с имеющимися представлениями о механизмах развития физиологического стресса, в частности, активации гипоталамо-гипофизарной-надпочечниковой оси. Модель эффективно воспроизводит поведенческие и нейрохимические изменения после хирургического вмешательства в носовую полость. Полученные в ходе исследования результаты расширяют представления о возможных послеоперационных изменениях высших психических функций и когнитивной деятельности человека, вызванных хирургическим вмешательством в челюстно-лицевой области и затрагивающих периферический отдел обонятельного анализатора. Данные эксперимента могут быть использованы в доклинических исследованиях для оценки эффективности и поиска новых медикаментозных препаратов, используемых в восстановительном периоде после септопластики.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке задания “Нейробиологические основы поведения животных” (номер гостемы 11-1-21, номер ЦИТИС 121032500080-8).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования одобрены этическим комитетом Медицинского института Российского университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы от 18.09.2020 (протокол № 1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ozdemir S., Celik H., Cengiz C., et al. Histopathological Effects of Septoplasty Techniques on Nasal Septum Mucosa: an Experimental Study // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2019. V. 276. № 2. P. 421–427.
2. Koumpa F.S., Ferguson M., Saleh H.A. Delayed-Onset Neuropathic Pain after Septoplasty // Case Rep. Otolaryngol. 2021. № 7. P. 9966318.
3. Кастыро И.В., Хамидулин Г.В., Дьяченко Ю.Е. и др. Исследование экспрессии белка p53 и образования темных нейронов в гиппокампе у крыс при моделировании

- септопластики // Российская ринология. 2023. Т. 31. № 1. С. 27–36.
4. Королёв А.Г., Шмаевский П.Е., Мнацаканян А.Г. и др. Изменения в частотном диапазоне вариабельности сердечного ритма у крыс при моделировании депривации обонятельного анализатора в периферическом и центральном отделах // Head and neck. Голова и шея. Российский журнал. 2023. Т. 11. № 2. С. 38–43.
 5. Inozemtsev A.N., Berezhnoy D.S., Novoseletskaya A.V. Effects of Diazepam, Piracetam, and Mexidol on Passive Avoidance Response // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2019. V. 74. № 4. P. 215–220.
 6. Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Алымов А.А. и др. Динамика формирования нарушений моноаминергических систем мозга потомства мышей линии BALB/c при введении вальпроата натрия беременным самкам: нейрохимическое изучение // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 1. С. 52–58.
 7. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного статистического анализа данных: учеб. пособие. М.: Высшее образование: Бакалавриат, 2017. 484 с.
 8. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991. 119 с.
 9. Dzirzkowska E., Wesolowski M. Cortisol as a Biomarker of Mental Disorder Severity // J. Clin. Med. 2021. V. 10. № 21. P. 5204.
 10. Chung D.H., Lee K.H., Kim S.W., et al. Comparison of Pre- and Post-operative Stress Levels in Patients with Allergic Rhinitis and Non-allergic Rhinitis // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2012. V. 269. № 11. P. 2355–2359.
 11. Kastyro I.V., Popadyuk V.I., Reshetov I.V., et al. Changes in the Time-domain of Heart Rate Variability and corticosterone after Surgical Trauma to the Nasal Septum in Rats // Dokl. Biochem. Biophys. 2021. V. 499. № 1. P. 247–250.
 12. Krupina N.A., Shirenova S.D., Khlebnikova N.N. Prolonged Social Isolation, Started Early in Life, Impairs Cognitive Abilities in Rats Depending on Sex // Brain Sci. 2020. V. 10. № 11. P. 799.
 13. Tsuda A., Ida Y., Satoh H., et al. Stressor Predictability and Rat Brain Noradrenaline Metabolism // Pharmacol. Biochem. Behav. 1989. V. 32. № 2. P. 569–572.
 14. Song Q., Tan Y. Knowledge Mapping of the Relationship between Norepinephrine and Memory: A Bibliometric Analysis // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2023. V. 14. P. 1242643.

THE EFFECT OF SURGICAL PROCEDURE IN THE NASAL CAVITY IN RATS ON THE PASSIVE AVOIDANCE CONDITIONING AND THE LEVEL OF MONOAMINES IN THE HYPOTHALAMUS

A. G. Korolev^{a,b,#}, I. V. Kastyro^b, A. N. Inozemtsev^a, and A. V. Latanov^a

^aM.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^bPeoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: korolevpost@gmail.com

Presented by Academician of the RAS I.V. Reshetov

In a biological model of septoplasty in rats, the effect of the operation on the passive avoidance conditioning (PAC) was studied. It has been shown that septoplasty increases anxiety and reduces exploratory activity in rodents under PAC. Neurochemical analysis of the hypothalamus carried out immediately after the end of the experiment revealed an increase in norepinephrine metabolism in rats after septoplasty, which may be associated with activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

Keywords: rats, septoplasty, passive avoidance, memory, stress, norepinephrine