

Yu.I. Sysoev, S.V. Okovityi

MODELLING OF CRANIOCEREBRAL INJURY IN LABORATORY ANIMALS IN NEUROPHARMACOLOGY

Yuriy Sysoev – post-graduate student, the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, St. Petersburg; **e-mail: susoyev92@mail.ru.**

Sergey Okovityi – head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, Doctor of Medicine, professor, St. Petersburg; **e-mail: sergey.okovityi@pharminnotech.com.**

We give a characteristic of modern methods of preclinical studies of neuroprotective and neurorestorative activity of pharmacological agents aimed to reduce the consequences of craniocerebral injury. The methods of modelling a dosed craniocerebral injury in laboratory animals and approaches to the assessment of the resulting neurological deficit are analyzed. We demonstrate that the method of controlled cortical cerebral contusion can be optimal for pharmacological screening, and the dynamics of Limb Stimulation test results on the 1st, 3rd and 7th day after the trauma can be relied on to assess the neurological deficit. The detailed elaboration of neurorestorative properties of the compounds studied should be carried out on the 7th day after the injury by applying additional Cylinder and Beam Walking tests. The characteristics of spontaneous behavior tests in rats are informative in the early days after the injury (3rd day, Open Field test), and by the 7th day after the injury they do not contain any significant information (Elevated plus maze test).

Keywords: biological modelling; controlled cortical cerebral contusion; laboratory animals; neuropharmacology; craniocerebral injury.

Ю.И. Сысоев, С.В. Оковитый

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВЫХ ТРАВМ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В НЕЙРОФАРМАКОЛОГИИ

Юрий Игоревич Сысоев – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии ГОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет МЗ РФ», г. Санкт-Петербург; **e-mail: susoyev92@mail.ru.**

Сергей Владимирович Оковитый – зав. кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ГОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет МЗ РФ», доктор медицинских наук, профессор, г. Санкт-Петербург; **e-mail: sergey.okovityi@pharminnotech.com.**

В статье представлена характеристика современных методов доклинического исследования нейропротекторной и нейрореабилитационной активности фармакологических средств, направленных на снижение выраженности последствий черепно-мозговых травм. Проанализированы методы создания дозированной черепно-мозговой травмы у лабораторных животных и оценки возникающего при этом неврологического дефицита. Показано, что для скрининговых фармакологических исследований оптимальным может быть метод контролируемого кортикального ушиба, а для оценки неврологического дефицита – динамика результатов теста «Стимулирование конечностей» на 1, 3 и 7 сутки после травмы. Детализация нейрореабилитационных свойств исследуемых фармакологических средств должна проводиться на 7 сутки с использованием дополнительно тестов «Цилиндр» и «Сужающаяся дорожка». Показатели тестов спонтанного поведения животных имеют информативность в ранние дни после травмы (3-и сутки, тест «Открытое поле»), а к 7 дню после травмы не несут значимой информации («Приподнятый крестообразный лабиринт»).

Ключевые слова: биологическое моделирование; контролируемый кортикальный ушиб; лабораторные животные; нейрофармакология; черепно-мозговая травма.

Черепно-мозговая травма (далее – ЧМТ) является актуальной медико-социальной и экономической проблемой для всех развитых стран, затрагивающей более 10 млн человек ежегодно. Также она связана с высокими показателями летальности, стойкой нетрудоспособностью, инвалидизацией наиболее социально активной части общества. В Российской Федерации летальность в результате ЧМТ занимает второе место среди всех причин и составляет при тяжелой степени тяжести 60% и более, а среди причин развития инвалидизации ЧМТ занимает первое место. Огромны и экономические потери в связи с временной или стойкой утратой трудоспособности у пострадавших с ЧМТ. Например, в США ежегодные расходы, которые включают в себя потерю потенциального дохода пациента и родственников, стоимость неотложной помощи, а также такие медицинские расходы, как постоянный амбулаторный уход и реабилитация и другие, оценивают в среднем в 4 млрд долларов [1].

В нейрофармакологии разработка нейропротекторных и нейрореабилитационных средств, потенциально способных улучшить динамику состояния человека и сократить степень неврологического дефицита в отдаленные сроки после ЧМТ, является одним из активно развиваемых направлений. В связи с этим возникает настоятельная потребность стандартизировать применяемые в доклинических исследованиях как различные способы получения дозированной ЧМТ у лабораторных животных, так и стандартизировать систему оценки и интерпретации регистрируемых у животных признаков неврологического дефицита и его динамики.

Несмотря на то, что крупные животные более близки к людям по размерам и физиологическим параметрам, в доклинических исследованиях гораздо чаще используются мелкие грызуны из-за их низкой стоимости, малого размера и стандартизированной оценки функционального исхода. В то время как ранние модели ЧМТ

были сфокусированы на биомеханических аспектах повреждения головного мозга [12], более поздние методики уже были нацелены на изучение сложных молекулярных процессов, вызываемых повреждением [9; 15].

Среди всех современных моделей ЧМТ три являются наиболее часто используемыми в исследованиях: модели с использованием падающего груза (англ. – weight-drop impact injury), модель жидкостно-перкуSSIONного повреждения (англ. – fluid percussion injury, FPI) и модель контролируемого кортикального ушиба (англ. – controlled cortical impact injury, CCI).

Модели с использованием падающего груза. При использовании данных моделей повреждение наносится в результате падения груза на череп (с предварительной краниотомией или без нее). Тяжесть наносимого повреждения может регулироваться изменением массы груза или увеличением/уменьшением высоты, с которой он падает. В модели D.M. Feeney [5] груз падает на открытую после предварительной трепанации твердую мозговую оболочку, что приводит к контузионному повреждению коры головного мозга. Морфологически такое повреждение начинается с геморрагий в белом веществе мозга непосредственно под местом удара в течение первых нескольких часов после травмы и приводит спустя 24 часа к развитию некротической полости (кавитации), которая может расширяться в течение последующих 2-х недель. Хотя большинство функций у травмированных крыс восстанавливается в течение 2-х недель после травмы, некоторые нарушения могут проявляться даже по истечении 90 дней.

E. Shohami с коллегами разработал модель закрытой ЧМТ, в ходе которой специально разработанное устройство сбрасывает груз на открытую поверхность черепа крысы [19] или мыши [4]. Функциональные расстройства у травмированных мышей и крыс, активация микрогли-

альных клеток и астроцитов, а так же морфологические изменения, фиксируемые с помощью магнитно-резонансной томографии, очень близко напоминают реальную в клинике закрытую черепно-мозговую травму [3].

В методе A. Marmarou et al. [10] травматическое устройство состоит из столба медных грузов, находящихся в трубке из органического стекла и свободно падающих под действием силы тяжести с определенной высоты. У наркотизированных животных череп оголяется срединным разрезом кожи, и диск из нержавеющей стали прикрепляется неподвижно с помощью клея к черепу животного по центру между лямбдой и брегмой. Затем крысы помещаются на вспененную поверхность глубиной 10 см, а повреждение индуцируется посредством сбрасывания медных грузов на диск. Данная модель обеспечивает обширное диффузное аксональное повреждение, особенно в мозолистом теле, внутренней капсуле, зрительном тракте, ножках мозга и проводящих путях ствола мозга. Также при использовании этой методики у травмированных животных наблюдаются двигательные и когнитивные нарушения, степень которых связана с тяжестью травмы [17].

Эти модели ЧМТ не воспроизводят повреждения, возникающие в результате воздействия на переднюю часть головы, встречающиеся в клинической практике, например, в результате автокатастрофы или спортивного столкновения. В методике, названной «Maryland model», повреждающее воздействие направлено на переднюю часть черепа, что приводит к антерио-постериальному плюс саггитальному вращательному ускорению головного мозга в неповрежденном черепе [8]. У травмированных животных не наблюдается кортикальной контузии, обломков черепа в тканях мозга, апноэ и летальных исходов, однако имеются петехиальные гемorragии и диффузионное аксональное повреждение. Поведенческие расстройства, такие как сниженная спонтанная поисково-исследовательская активность наблюдаются более чем 1 неделю.

Модели жидкостной перкуссии.

Модель жидкостно-перкуSSIONного повреждения является на сегодняшний момент самой распространенной из всех моделей ЧМТ, обеспечивая повреждение, клинически сходное с контузией мозга без перелома черепа. Она пригодна для проведения фармакологических, физиологических и патоморфологических исследований на различных лабораторных животных, таких как мыши, крысы, кошки, кролики, свиньи, собаки и овцы. При использовании данной модели повреждение наносится пульсацией давления жидкости на неповрежденную твердую мозговую оболочку по центру черепа [16] или же сбоку (Lateral fluid percussion injury, LFPI) [18]. В случае центральной жидкостной перкуссии определяются билатеральные кортикальные изменения, связанные с прямым аксиальным движением нижней коры головного мозга, при моделировании LFPI возникают, главным образом, одно-сторонние повреждения, редко поражающие контралатеральную кору и ствол головного мозга.

Собственно методика нанесения травмы сводится к тому, что у животного, введенного в наркоз и помещенного в стереотаксическую установку, делается продольный разрез кожи, отгибаются скальп и височные мышцы (в случае LFPI) и осуществляется краниотомия требуемой части черепа. Удар наносится жидкостно-перкуSSIONным устройством, состоящим обычно из цилиндрического резервуара, наполненного стерильным изотоническим раствором, в котором маятник ударяет поршень на противоположном конце устройства, генерируя пульсацию давления, которая переносится на твердую мозговую оболочку и вызывает деформацию головного мозга. Область трепанации и сила последующего удара определяют локализацию и степень повреждения, поэтому, для воспроизводимости данной методики особое внимание должно уделяться точности определения интересующих областей головного мозга, а также правильности дозирования интенсивности пульсации давления.

После нанесения перкуSSIONного удара у животных регистрируется повы-

шение внутричерепного и снижение церебрального перфузионного давления, уменьшение мозгового кровотока и увеличение сопротивления церебральных сосудов. Также для данной модели характерно нарушение функции ГЭБ. Гистопатологические изменения включают в себя петехиальные кровоизлияния в паренхиме головного мозга, которые варьируют от незначительных до смертельных, а также имеет место аксональное повреждение, субарахноидальные кровоизлияния, разрыв мягких тканей с последующим фокальным некрозом и утратой клеток. Для перкуссионного удара характерны как некротические, так и апоптотические типы поражения нейронов [20]. Функционально данный вид травмы проявляется в депрессии ЭЭГ [5], моторных и когнитивных нарушениях.

Таким образом, модель жидкостной перкуссии обладает рядом достоинств, среди которых хорошая воспроизводимость и регулируемость тяжести повреждения, которые делают ее широко используемой в изучении патогенеза нейротравм. Недостатком является необходимость трепанации, а также то, что при увеличении силы удара происходит непропорциональное вовлечение ствола головного мозга, что может исказить полученные результаты исследования, например, вследствие развития нейрогенного отека легких.

Контролируемый кортикальный ушиб. При моделировании контролируемого кортикального ушиба у мелких лабораторных животных используется устройство, представляющее собой цилиндр с расположенным внутри помповым механизмом, с помощью которого и производится удар по неповрежденной твердой мозговой оболочке. При этом есть возможность контролировать параметры механических факторов (скорость удара и глубину получаемой деформации) [14].

Анализ материалов, характеризующих особенности различных биомоделей ЧМТ на крысах, показал, что проще всего решить задачу стандартизации методики в интересах нейрофармакологии при использовании метода контролируемого

кортикального ушиба.

В наших исследованиях, выполненных на белых беспородных крысах – самцах весом 250–300 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская область), в контрольной группе было 20 крыс, и 15 – в группе интактных животных. Все эксперименты проводили в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Крыс содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде. Все животные были взяты из одного привоза и прошли карантин в течение 14 суток.

Черепно-мозговую травму моделировали путем нанесения удара по участку сенсомоторной коры. Мы использовали модифицированную версию модели, представленной Isaev и др. [7]. Локализацию зоны сенсомоторной коры определяли по атласу стереотаксических координат [13]. Для создания травмы животных наркотизировали внутрибрюшинным введением раствора хлоралгидрата (400 мг/кг), после чего проводили трепанацию в левой лобной части черепа над зоной сенсомоторной коры (рис. 1). Центр трепанационного отверстия находился на 3,0 мм роstralнее и 1,5 мм медиальнее брегмы. После этого в трепанационное отверстие помещали подвижный стальной поршень диаметром 3 мм с ходом 4 мм, по которому с высоты 10 см ударял скользящий в стальной трубке груз весом 50 г. Высверленную пластину возвращали на место и зашивали разрез кожи.

Ассоциативная и сенсомоторная области коры, базальные ядра, мозжечок и ствол мозга взаимодействуют между собой, посылая через спинной мозг нисходящие импульсы, оканчивающиеся в скелетных мышцах. Черепно-мозговая травма приводит к нарушению этого взаимодействия, и именно поэтому большинство тестов, направленных на оценку степени неврологического дефицита у травмированных животных, по своей сути сенсомо-

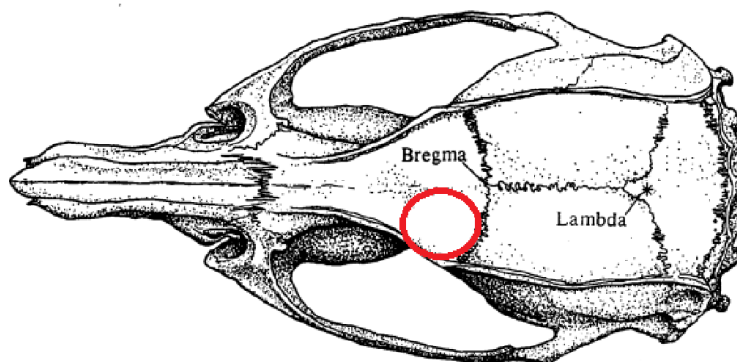


Рис. 1. Область трепанации черепа крысы над зоной сенсомоторной коры

торные. Среди таких тестов наиболее известными являются тест «Цилиндр», «Ротарод», тест «Сила хвата», «Skilled forelimb reaching» и «Staircase» тесты [11]. При травме мозга могут возникать эмоционально-поведенческие и даже психические расстройства. Тесты на животных для оценки уровня тревожности, эмоциональной и исследовательской активности, депрессии могут включать «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Открытое поле» и вынужденное плавание по Порсолту.

В ходе экспериментального исследования на 1, 3 и 7 сутки после ЧМТ у животных оценивали выраженность неврологического дефицита в тесте «Стимулирование конечностей». Тест заключался в ответе задних и передних конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию. Процесс тестирования состоял из 7 различных испытаний, результаты выражали в сумме баллов. Для оценки нарушений в работе конечностей использовалась следующая система подсчета: 2 балла – крыса полностью выполняла испытание; 1 балл – крыса выполняла испытание с задержкой в более чем 2 сек и/или не полностью; 0 баллов – крыса не отвечала на стимулирование конечности. Максимально возможное суммарное количество баллов было равно 14 [2].

На 3 сутки для выявления поведенческих компонентов экспериментальной ЧМТ проводили тест «Открытое поле». На седьмые сутки для дифференцирования особенностей неврологического дефицита у животных на этапе реабилитации проводили тесты «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «Ци-

линдр» и «Лестница».

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Оценивали значимость различий с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

Ударное повреждение зоны сенсомоторной коры у крыс вызывает стойкий неврологический дефицит, наиболее выраженный в первые сутки после операции и постепенно редуцирующийся в течение последующих дней (рис. 2).

Необходимо отметить, что проведение на 7 сутки после ЧМТ дополнительных методик выявления неврологического дефицита показало, что частота использования контрлатеральной конечности в тесте «Цилиндр» соответствует индексу сенсомоторного дефицита, выявляемого в тесте «Стимулирование конечностей» (43%) и не несет в себе дополнительной информации (рис. 3).

В то же время методика «Сужающаяся дорожка», вероятно, может считаться более чувствительной к спонтанному (вне стимуляции) посттравматическому сенсомоторному дефициту, так как его признаки у травмированных крыс превышали уровень интактных животных в 14 раз для передней контрлатеральной лапы, и 12 раз – для задней (рис. 4).

На третьи сутки после ЧМТ в тесте «Открытое поле» выявлено резкое снижение двигательной и поисково-исследовательской активности (в 6 и 12 раз соответственно) (рис. 5).

При проведении теста ПКЛ на 7 сутки после ЧМТ установлено, что у животных

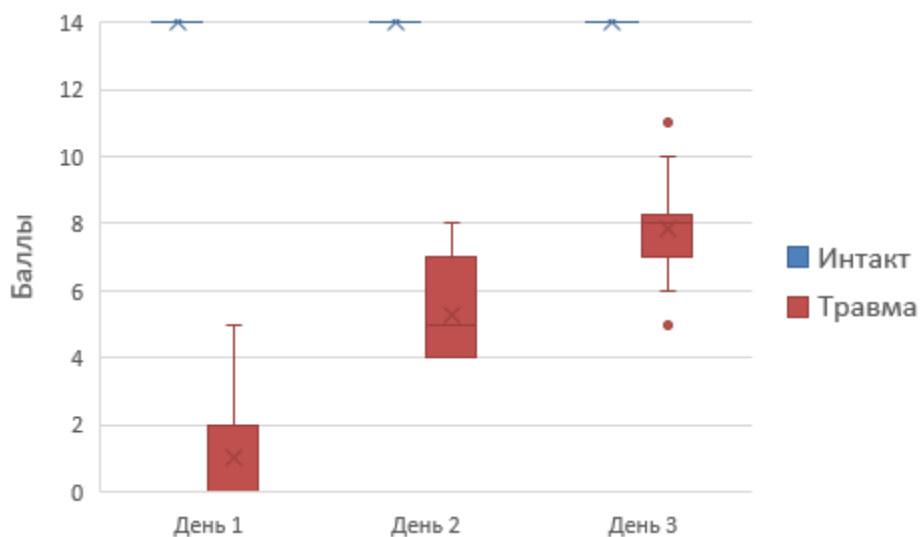


Рис. 2. Функция передних и задних конечностей у крыс в разные сроки после ЧМТ в тесте «Стимулирование конечностей»

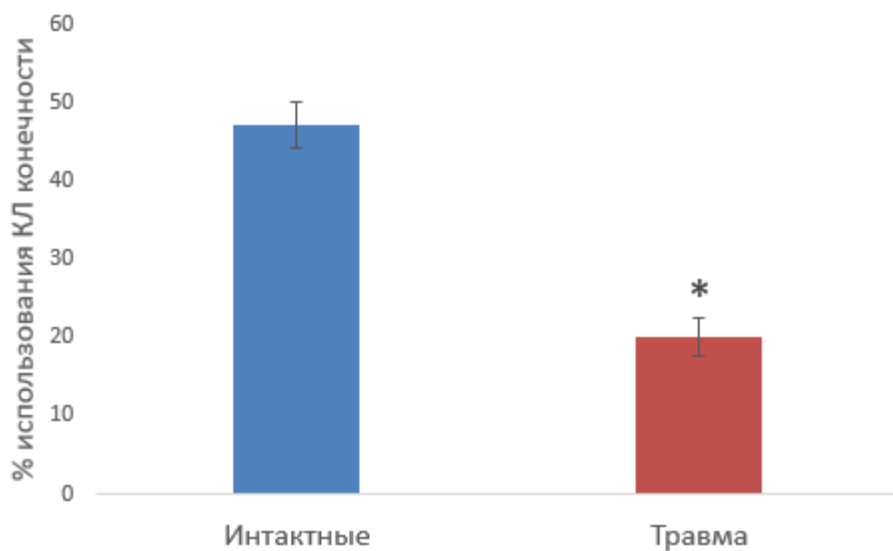


Рис. 3. Частота использования контрлатеральной конечности крысами в тесте «Цилиндр» на 7-е сутки после травмы

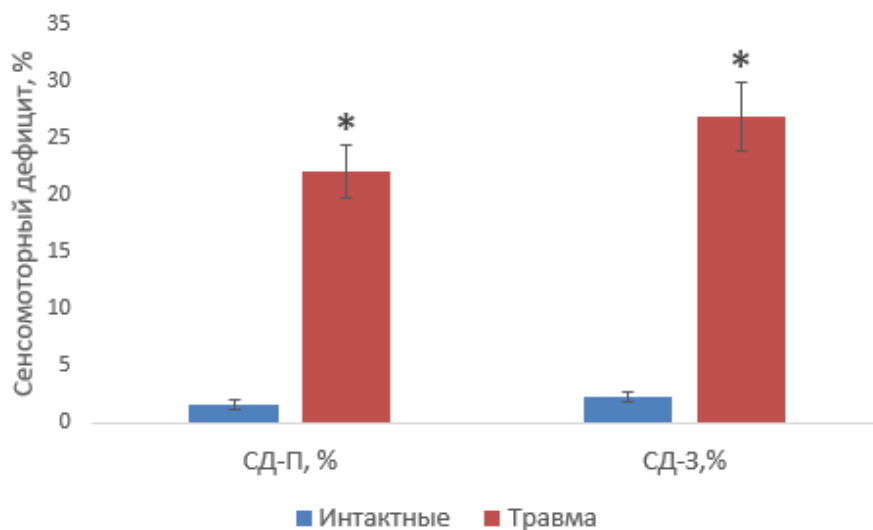


Рис. 4. Сенсомоторный дефицит передней и задней контрлатеральных конечностей крыс в тесте «Сужающаяся дорожка» на 7-е сутки после травмы

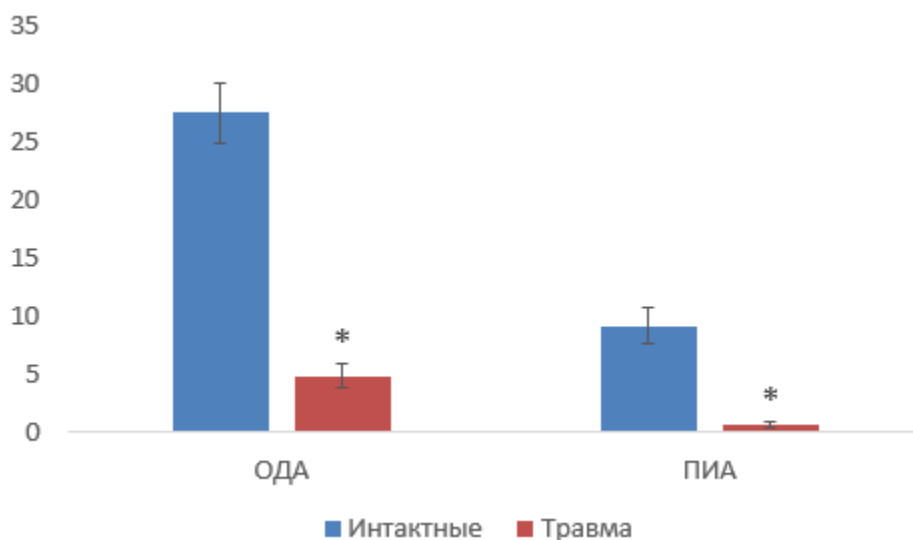


Рис. 5. Общая двигательная и поисково-исследовательская активности крыс в тесте «Открытое поле» на 3-е сутки после травмы

в основном восстанавливается типичное для грызунов предпочтение к пребыванию в затененном рукаве лабиринта (89% времени и 86% – у интактных животных) при отсутствии изменения времени пребывания на центральной площадке (рис. 6).

Таким образом, представленные материалы позволяют считать, что для скрининговых нейрофармакологических исследований, ориентированных на изыскание новых фармакологических средств коррекции последствий черепно-мозговых травм, может быть достаточно корректно использована биомедицинская модель контролируемого кортикального ушиба. Последствия модельной черепно-мозго-

вой травмы у лабораторных животных в динамике отражаются по показателям сенсомоторного дефицита в тестах «Стимулирование конечностей», «Цилиндр», «Сужающаяся дорожка». Для оценки нейротекторной активности лекарственных средств целесообразно проведение тестирования неврологического дефицита у животных через 1–3 сутки после ЧМТ, а для нейрореабилитационной активности – на 7 и более поздние сроки. Восстановление поведенческой активности животных в раннем посттравматическом периоде лучше оценивать по динамике теста «Открытое поле», но не теста «ПКЛ».

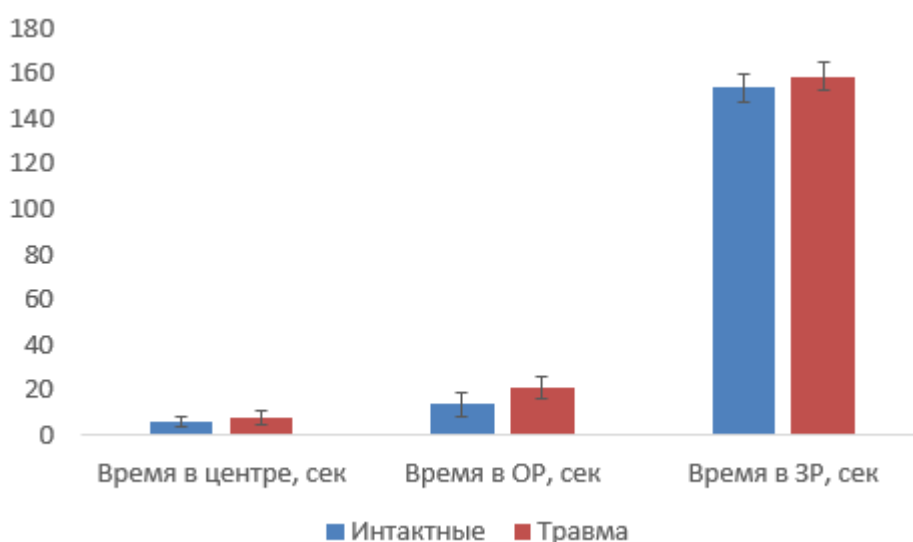


Рис. 6. Время в центре, открытых и закрытых рукавах крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на 7-е сутки после травмы

ЛИТЕРАТУРА

1. Амчелавский В.Г. Применение цитиколина (цераксон) для лечения последствий травмы мозга // *Терапия*. 2016. № 2. С. 76–80.
2. Сулачев Д.Н. Изучение новых нейропротекторов на модели фокальной ишемии головного мозга: дис. ... канд. биол. наук. М.: Моск. гос. университет им. М.В. Ломоносова, 2009.
3. Albert-Weissenberger C., Várrallyay C., Raslan F., Kleinschnitz C., Sirén A.L. An experimental protocol for mimicking pathomechanisms of traumatic brain injury in mice // *Exp. Transl. Stroke. Med.* 2012. № 4. P. 48–54.
4. Chen Y., Constantini S., Trembovler V., Weinstock M., Shohami E. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits // *J. Neurotrauma.* 1996. № 8. P. 557–568.
5. Dixon C.E., Lighthall J.W., Anderson T.E. Physiologic, histopathologic and cineradiographic characterization of a new fluid-percussion model of experimental brain injury in the rat // *J. Neurotrauma.* 1988. № 5. P. 91–104.
6. Feeney D.M., Boyeson M.G., Linn R.T., Murray H.M., Dail W.G. Responses to cortical injury // *Methodology and local effects of contusions in the rat.* *Brain Res.* 1981. P. 67–77.
7. Isaev N.K., Silachev D.N., Skulachev V.P., Zorov D.B., Novikova S.V., Stelmashook E.V., Barskov I.V., Khaspekov L.G. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQR1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat // *Biochemistry (Moscow).* 2012. V. 77. P. 996–999.
8. Kilbourne M., Kuehn R., Tosun C., Caridi J., Keledjian K., Bochicchio G. Novel Model of Frontal Impact Closed Head Injury in the Rat // *J. Neurotrauma.* 2009. V. 26. P. 2233–2243.
9. Madathil S.K., Deng-Bryant Y., Wilfred B.S., Leung L.Y., Gilsdorf J.S., Shear D.A. Alterations in brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 protein levels after penetrating ballistic-like brain injury in rats // *J. Trauma Acute Care Surg.* 2017. V. 83. S. 16–24.
10. Marmarou A., Foda M.A., van den Brink W., Campbell J., Kita H., Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics // *J. Neurosurg.* 1994. V. 80. P. 291–300.
11. Montoya C.P., Campbell-Hope L.J., Pemberton K.D., Dunnett S.B. The “staircase test”: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats // *J. Neurosci. Methods.* 1991. V. 36. P. 219–228.
12. Ommaya A.K., Gennarelli T.A. Cerebral concussion and traumatic unconsciousness. Correlation of experimental and clinical observations of blunt head injuries // *Brain.* 1974. V. 97. P. 633–654.
13. Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th edition // *Academic press.* 2013. P. 12.
14. Povlishock J.T., Kontos H.A. Continuing axonal and vascular change following experimental brain trauma // *Cent. Nerv. Syst. Trauma.* 1985. № 2. P. 285–298.
15. Rail J.M., Matzilevich D.A., Dash P.K. Comparative analysis of mRNA levels in the frontal cortex and the hippocampus in the basal state and in response to experimental brain injury // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2003. V. 29. P. 118–131.
16. Schmidt R.H., Grady M.S. Regional patterns of blood-brain barrier breakdown following central and lateral fluid percussion injury in rodents // *J. Neurotrauma.* 1993. V. 10. P. 415–430.
17. Schmidt R.H., Scholten K.J., Maughan P.H. Cognitive impairment and synaptosomal choline uptake in rats following impact acceleration injury // *J. Neurotrauma.* 2000. P. 1129–1139.
18. Schurman L.D., Smith T.L., Morales A.J., Lee N.N., Reeves T.M., Phillips L.L. Investigation of left and right lateral fluid percussion injury in C57BL6/J mice: In vivo functional consequences // *Neurosci. Lett.* 2017. V. 653. P. 31–38.
19. Shohami E., Shapira Y., Cotev S. Experimental closed head injury in rats: prostaglandin production in a noninjured zone // *Neurosurgery.* 1988. P. 859–863.
20. Yakovlev A.G., Knoblach S.M., Fan L. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. P. 7415–7424.