

УДК 616.8-091.931: 57.089.62: 57.084.1

# Хирургическое моделирование посттравматического глиального рубца спинного мозга у крыс

Г. Б. Телегин<sup>1\*</sup>, А. Н. Минаков<sup>1</sup>, А. С. Чернов<sup>1</sup>, В. Н. Манских<sup>3</sup>, Д. С. Асютин<sup>2</sup>,  
Н. А. Коновалов<sup>2</sup>, А. Г. Габибов<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пущино, просп. Науки, 6

<sup>2</sup>Национальный научно-практический медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., 16

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

<sup>4</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: telegin@bibch.ru

Поступила в редакцию 24.06.2019

Принята к печати 02.08.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-75-81

**РЕФЕРАТ** Разработан и верифицирован оригинальный минимально инвазивный метод хирургического моделирования посттравматического глиального рубца спинного мозга у крыс. Модель предназначена для использования в качестве биологической платформы при тестировании методов стимулирования регенеративных процессов центральной нервной системы. Унифицированность модели делает ее универсальной как для имплантационных методик, так и для разработки подходов системного действия. Имея в распоряжении стандартный структурный дефект спинного мозга, исследователи получают уникальную возможность апробации *in vivo* перспективных методик восстановления спинальных функций в посттравматическом периоде. Разработаны анестезиологическое пособие, хирургическая тактика и комплекс реабилитационных мероприятий в хроническом постоперационном периоде. Предварительную оценку степени тяжести последствий экспериментального воздействия осуществляли прижизненно с использованием стандартной методики регистрации двигательной активности крыс в послеоперационном периоде спинальной травмы. Окончательные выводы делали на основании изучения гистологических срезов глиального рубца спинного мозга крыс в трех взаимно перпендикулярных пространственных плоскостях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** глиальный рубец, криоапликация, лабораторная крыса, регенерация аксонов, травма спинного мозга, унилатеральная гемилеминэктомия, хирургическое биомоделирование.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** СМ – спинной мозг; ТСМ – травма спинного мозга; 3Rs – принципы биоэтики использования лабораторных животных в эксперименте: уменьшение (Reduce), ограничение (Refine), замена альтернативными методами (Replace); BBB-шкала – балльная шкала Basso, Beattie, Bresnahan для оценки локомоторной активности крыс в экспериментах по изучению нарушений проводимости нервных импульсов.

## ВВЕДЕНИЕ

Травма спинного мозга (ТСМ) – одна из основных причин инвалидности [1], сопряжена с неизбежным формированием в посттравматическом периоде глиального рубца, препятствующего регенеративному росту аксонов и проведению нервных импульсов. В клинической практике повреждения СМ сопровождаются серьезным функциональным дефицитом, имеющим перспективы развития необратимого па-

ралича областей тела, расположенных дистально от области травмы. Спустя несколько недель после травмы у 30% пациентов развивается посттравматическая сирингомиелия, которая приводит к ослаблению их неврологического статуса [2].

Перспективы лечения пациентов с повреждением спинного мозга будут зависеть от успеха экспериментальных исследований, основанных на использовании животных моделей надлежащего качества.

В соответствии с принципами 3R для использования в биомоделировании предпочтение отдается животным как можно меньшего размера. Однако в отношении биомоделирования на спинном мозге, сопряженного с высокой степенью хирургической интервенции, минимизация размеров животного имеет очевидные ограничения ввиду необходимости достаточного объема моделируемого посттравматического рубца, позволяющего использовать его в разработках методик восстановления спинальных функций. Использование мелких грызунов считается самым удачным для моделирования ТСМ из-за общности патофизиологии травмы с клинической практикой [3, 4]. Исходя из всех описанных условий, видовое предпочтение использования в качестве животной модели было отдано лабораторной крысе.

Из большинства моделей ТСМ у крыс наибольшее распространение получили модели повреждений СМ закрытого типа: компрессионная, имитирующая сдавливание, и контузионная, имитирующая ушиб. Однако эти модели труднопроизводимы и не могут использоваться для изучения регенерации спинного мозга при структурных повреждениях [3].

Нашей исследовательской группой разработан подход к моделированию ТСМ с использованием криоапликатора оригинальной конструкции. В основу предложенного инновационного способа моделирования стандартного глиального рубца посредством криоапликации легли работы Васильева С.А. и соавт. по изучению криодеструкции спинного мозга [5, 6], а также методы криоанальгезии нервного волокна [7].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В целях оптимальной визуализации и идентификации анатомических структур, а также в виду необходимости обеспечения оперативному приему достаточного пространства использовали крупных, массой 320–358 г, самцов крыс стока SD, SPF-статуса. Животных содержали в стандартных условиях НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН. Все манипуляции с животными одобрены Институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФИБХ РАН.

Всего в экспериментах по апробации использования криотехнологий при моделировании структурного дефекта спинного мозга крыс использовано 26 животных: 14 – на этапах отработки методологии эксперимента, включая разработку конструкции криопроводника, выбор экспозиции охлаждения спинного мозга и контроль доступа, и 12 – на стадии верификации избранной методики низкотемпературного воздействия (локальной криоапликации).

### Предоперационная подготовка и анестезиологическое пособие

За 24 ч до операции животных пересаживали в клетки с чистой подстилкой и водой. Оперативное вмешательство проводили под общим ингаляционным наркозом изофлюраном, премедикацию не использовали.

### Хирургический доступ

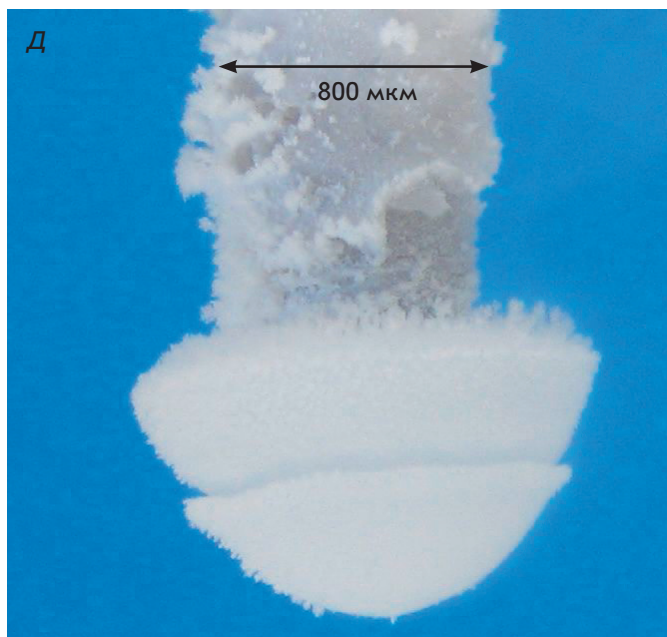
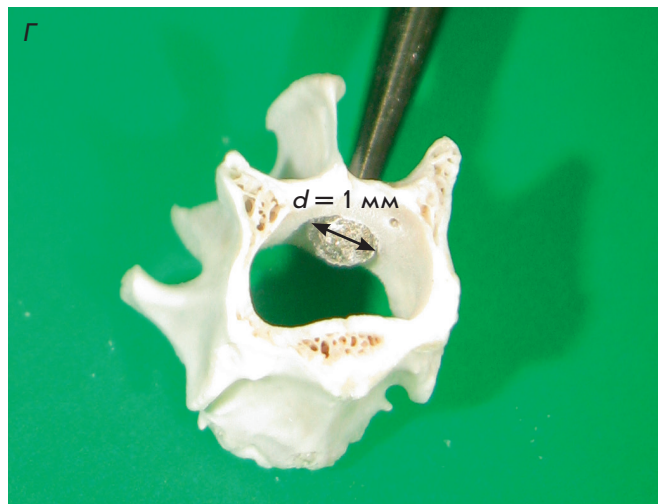
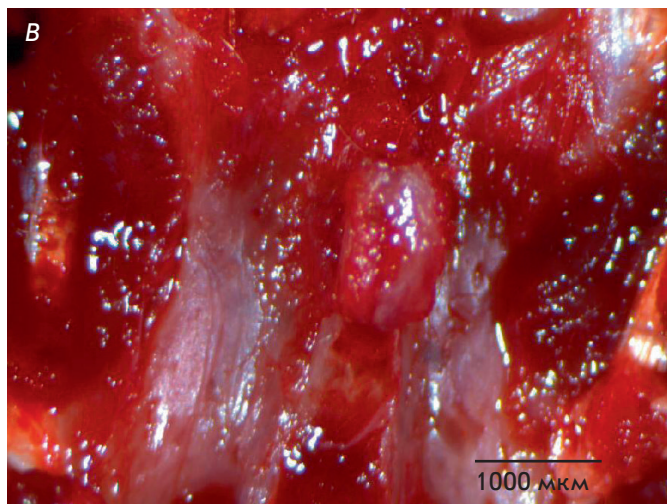
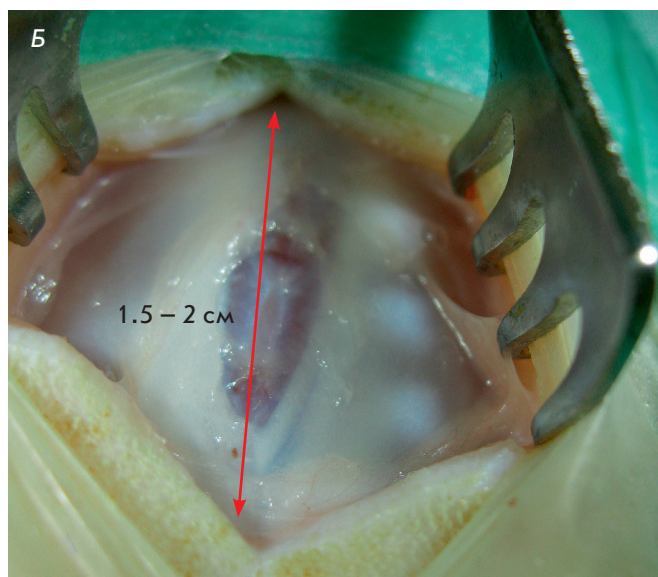
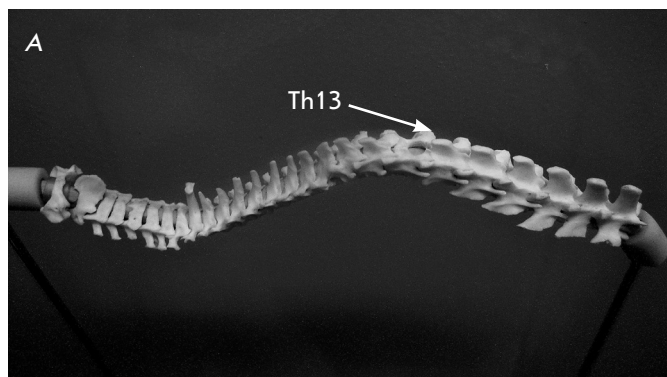
Используя стандартный микрохирургический набор инструментов, в проекции пересечения позвоночного столба с реберной дугой животного производили медианное рассечение кожи, подкожной фасции и жировой клетчатки протяженностью около 2 см (рис. 1Б). Краниальнее схождения апоневрозов дорсальной группы мышц позвоночного столба (*musculus erector spinae*) к остистым отросткам позвонков поясничного отдела определяли остистый отросток последнего грудного позвонка Th13 (рис. 1А). Под визуальным контролем при помощи операционного бинокулярного микроскопа (Optika, Италия) скелетировали остистый отросток и дорсальную дужку позвонка доступа (рис. 1В). Гемостаз обеспечивали посредством использования термокаутера (FTS, Англия). В целях обеспечения достаточного пространства оперативному приему остистый отросток резецировали. Унилатеральную гемиламинэктомию осуществляли оригинальным способом – посредством портативного стоматологического микромотора. Использовали метод торцевой парамедианной перфорации бором с алмазным напылением, диаметром 1.0 мм при 30 тыс. об/мин (рис. 1Г). Твердую мозговую оболочку при этом не затрагивали, в чем убеждались по факту отсутствия ликвореи. После завершения ламинэктомии область доступа промывали физиологическим раствором, избытки которого синхронно аспирировали вакуумным отсосом (Millipore, Германия).

### Оперативный прием

Спинной мозг всех животных опытной группы подвергали локальному охлаждению посредством апплицирования криопроводника через твердую мозговую оболочку (рис. 1Д,Е). Диаметр проводника в зоне контакта с тканью биологического субстрата – 0.8 мм, материал – медь, удаленность от источника холода (жидкого азота) в приборе оригинального конструктивного исполнения – 9 см, экспозиция апплицирования – 1 мин, собственная температура проводника в зоне контакта – 20°C.

Животным контрольной группы (четыре особи) оперативный доступ к спинному мозгу организован, как у опытных, но без локального охлаждения.

Рис. 1. Этапы разработки оперативного доступа: А – анатомическая 3D-реконструкция; Б – топографические ориентиры; В – скелетирование; Г – односторонняя гемиламинэктомия; Д – криозонд; Е – охлаждение спинного мозга



### Закрытие операционной раны

Ушивание тканей производили послойно, используя атравматический нерассасывающийся монофиламентный материал Prolene 6/0 (Ethicon, США).

Для защиты поверхности операционной раны применяли однократное нанесение суспензии микропористого алюминия (Vetoquinol, Франция).

### Температурный режим

В целях компенсации гипотермии, возникающей во время наркоза, в течение операции животных фиксировали на операционном столике с температурой 38°C. Сразу после операции и до полного выхода из наркоза животных помещали в клетку, установленную на электрическом подогреваемом столике, и организовывали принудительное обогащение воздуха кислородом.

### Послеоперационный мониторинг

Период клинического наблюдения в опыте составил 30 дней. Отработанный протокол хирургической интервенции и схема клинического мониторинга обеспечивали 100% выживаемость крыс.

Для профилактики раневой инфекции, ввиду значительного объема хирургической травмы и хронического периода постоперационного наблюдения, проводили превентивную антибиотикотерапию посредством внутримышечного введения препарата «Байтрил» (энрофлоксацин, 25 мг/мл) в дозе 10 мг/кг 1 раз в день курсом 10 дней.

Для послеоперационной анальгезии крысам назначали препарат «Норокарп» (карпрофен) в дозировке 10 мг/кг живого веса 1 раз в день курсом 4–6 дней.

В целях регидратации, сразу после операции, животным вводили предварительно нагретый до 38°C физиологический раствор натрия хлорида в объеме 5 мл, подкожно.

На всем протяжении хронического опыта оценивали внешний вид прооперированных животных, неспровоцированное поведение, частоту дыхания, потребление корма и воды, наличие естественных отпавлений, строительство гнезда, реакцию на руки, цвет слизистых оболочек, тургор кожи, состояние операционной раны, динамику изменений массы тела, температуру тела (ректально), а также выраженность моторной и чувствительной функций тазовых конечностей и хвоста.

### Оценка локомоторной активности

Степень влияния экспериментального воздействия на локомоторную активность крыс тестировали «в открытом поле», согласно традиционно используемой при моделировании спинальной травмы 21-балльной шкале BBB [8].

### Морфологическое исследование

Спинной мозг из позвоночного канала (в пределах позвонков T12–L1) выделяли пересечением боковых стенок дорсальных дужек позвонков фрезой, что гарантировало максимальную сохранность дорсальной поверхности спинного мозга в месте воздействия. Ориентировочно место холодового воздействия макроскопически определяли по светло-коричневому окрашиванию тканей, сопоставимым по размеру с 3/4 диаметра спинного мозга. Образцы фиксировали в течение 24 ч в 10% растворе формалина на фосфатном буфере (pH 7.4). После фиксации материал дегидратировали в изопропиловом спирте (Isoprep, Биовитрум), заливали в парафин, готовили срезы (толщиной 5 мкм) на ротационном микротоме (RM2245, Leica) и окрашивали гематоксилином и эозином по рутинным протоколам [9].

С целью всесторонней оценки морфологических характеристик поражения были изготовлены серийные срезы в трех взаимно перпендикулярных плоскостях – саггитальной (оценивали глубину и продольную протяженность дефекта), фронтальной (площадь в плоскости пятна контакта) и сегментарной (поперечный размер дефекта относительно диаметра сечения спинного мозга). Для морфологических измерений в каждой плоскости отбирали срез с максимальной площадью дефекта. Топографию пораженных структур спинного мозга определяли согласно данным [10].

Фотографирование препаратов и морфометрические процедуры выполняли с помощью микроскопа Axioscope A1 и камеры MRc5 с использованием программы AxioVision 3.0 (Carl Zeiss, Германия). Полученные данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ SigmaPlot statistic (v. 13.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка оперативного доступа

Изучение возможностей восстановления спинальных функций требует моделирования посттравматического глиального рубца – стандартного и минимального по объему. В отличие от преимущественно механических контузионных воздействий на спинной мозг, применявшихся при моделировании спинальной травмы, мы моделировали глиальный рубец с использованием оригинальной методики локального низкотемпературного воздействия на спинной мозг. Прообразом идеи послужил опыт применения криотехнологий в целях криоанальгезии периферических нервов и криодеструкции участков ткани центральной нервной системы [5–7].

В целях обеспечения максимально корректной интерпретации результатов, полученных на моде-

ли посттравматического глиального рубца спинного мозга, при разработке методик восстановления спинных функций было решено прибегнуть к унилатеральному воздействию на спинной мозг, предоставляющему возможность использования в качестве контроля клинических и патоморфологических изменений в интактную сторону.

В связи с необходимостью стандартизации уровня доступа к спинному мозгу предложены такие оригинальные подходы, как использование топографии схождения апоневрозов дорсальной группы мышц позвоночного столба в качестве интраоперационного ориентира последнего грудного позвонка со стороны вектора операционного действия (рис. 1Б) и использование твердой мозговой оболочки в качестве своеобразного демпфера прямому холодовому воздействию на спинной мозг. Необходимо отметить, что у более молодых животных, имеющих соответственно меньший размер, а также у крыс с темной пигментацией (например, линия Dark Agouti), интраоперационная навигация может быть существенно затруднена – идущие к остистым отросткам поясничных позвонков апоневрозы дорсальной группы мышц позвоночного столба выглядят гораздо менее контрастно, чем у крупных крыс-альбиносов.

Таким образом, методика апплицирования криопроводника на спинной мозг позволяет максимально локализовать зону низкотемпературного воздействия и минимизировать неспецифические контузионные повреждения органа в процессе проведения оперативного приема. Индикатором структурной сохранности спинного мозга во время унилатеральной гемилияминэктомии, выполняемой методом торцевой перфорации, было отсутствие ликвореи. Животных с ятрогенным дуроцентезом из использования в эксперименте исключали. В целях организации чрескостного доступа к спинному мозгу предложено использование стоматологического бора (рис. 2).

#### Показатели клинического мониторинга

У большинства крыс с моделируемым посттравматическим рубцом спинного мозга в соответствии со шкалой ВВВ [9] наблюдалась моноплегия со стороны воздействия, сохраняющаяся в течение 21 дня. Животные опытной группы показывали средний уровень нарушения локомоторных функций, соответствующий 2,3 балла по шкале ВВВ, в то время как в контрольной группе, без холодового воздействия, полное восстановление двигательной активности наблюдали через 5 дней после оперативного вмешательства.

Используемые в настоящее время модели ТСМ приводят к существенному нарушению функций мочевыделительной системы у крыс, что является

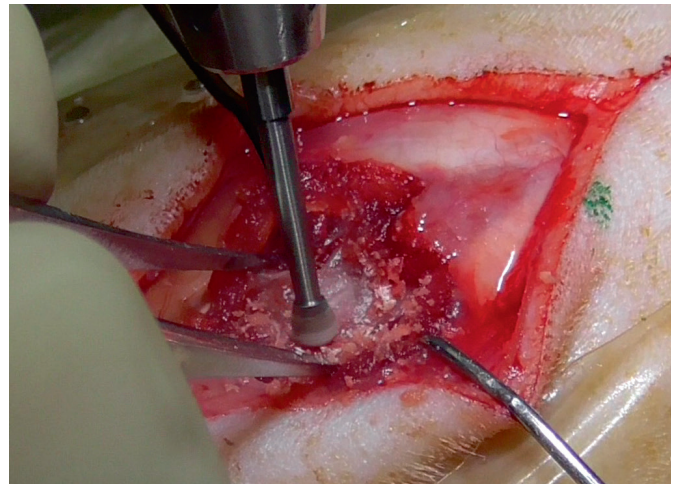
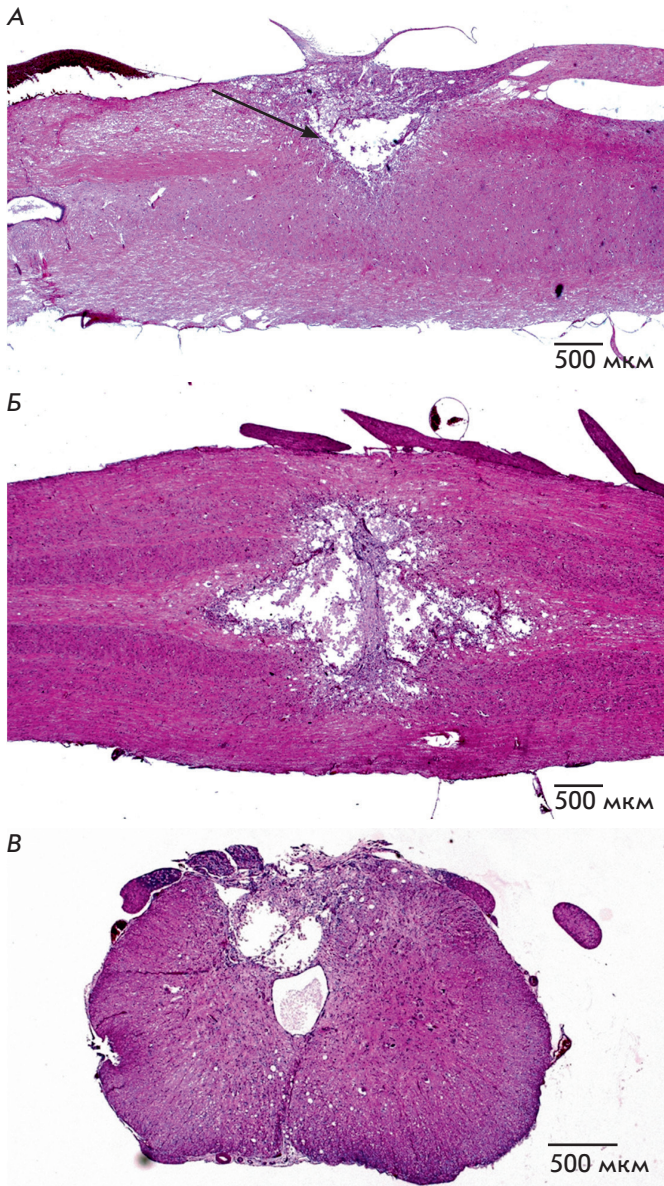


Рис. 2. Гемилияминэктомия дорсальной дужки Th13-позвонка крысы стоматологическим бором

серьезным недостатком [11]. Приходится несколько раз в день вручную опорожнять мочевой пузырь у животных после нанесения травмы во избежание разрыва мочевого пузыря и развития инфекционного воспаления [12, 13]. Разработанная нами модель не имеет подобного недостатка благодаря минимизации хирургической травмы. После нанесения травмы у животных на протяжении всего времени наблюдения сохранялась способность к естественному опорожнению мочевого пузыря и кишечника на фоне стабильно сохраняющейся моноплегии. Способность к самостоятельному мочеиспусканию и дефекации является залогом жизнеобеспечения в хроническом постоперационном периоде, профилактирует развитие у крыс дистресса и неспецифическое травмирование спинного мозга при стимулировании естественных отпавлений методом пальпаторного воздействия на стенки кишечника и мочевого пузыря через брюшную стенку животного.

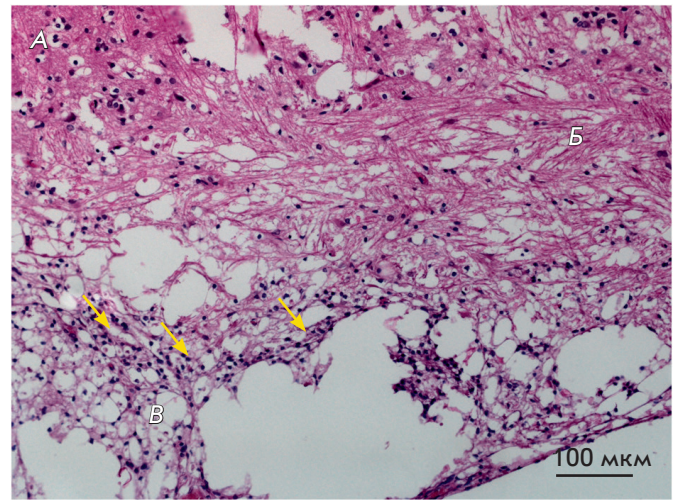
#### Результаты гистологического исследования

Согласно данным гистологического исследования спинного мозга у всех животных на 30-й день после криодеструкции наблюдалась в целом одинаковая гистологическая картина (рис. 3). В центре зоны дефекта образовывалась полость, в той или иной степени заполненная клеточным дебрисом и макрофагоподобными клетками. Часть полости выполнена элементами созревающего глиомезодермального рубца, более выраженными со стороны мозговых оболочек и образующими тяжи и шварты. Большая часть стенки, в том числе и участки, прилегающие к рубцовой ткани, представлены разволокненным и вакуолизированным нейропилем, без резких гра-



**Рис. 3.** Типичная гистологическая картина криодеструкции спинного мозга на 30-й день после операции по предложенному методу. А – сагиттальное сечение (стрелкой показаны стенки кратерообразного дефекта). Б – фронтальное сечение (отчетливо видна полость структурного дефекта). В – сегментарное сечение (отчетливо видна полость структурного дефекта). Окраска гематоксилином и эозином (увеличение  $\times 25$ )

ниц переходящим в интактную нервную ткань. В зоне вакуоляризации нейроны полностью отсутствовали, зато имелись клетки неопределенной морфологии с признаками апоптоза (кариорексис и кариопикноз ядер). Острое экссудативное воспаление в зоне дефекта отсутствовало, хотя имела место



**Рис. 4.** Морфология пораженного участка спинного мозга при проведении гемилеминэктомии (увеличение  $\times 200$ ). А – интактная ткань; Б – зона реактивных изменений (рарификация нейропиля); В – зона некроза, стрелки – клетки воспалительного инфильтрата (лимфоциты или микроглиальные элементы)

умеренно выраженная инфильтрация лимфоцитами и микроглиальными элементами. Площадь общей зоны повреждения в сагиттальной плоскости составила  $3.6 \pm 0.25 \text{ мм}^2$  ( $n = 6$ ) (рис. 3А), на фронтальном срезе  $3.2 \pm 0.36 \text{ мм}^2$  ( $n = 4$ ) (рис. 3Б), а в поперечном сечении  $1.1 \pm 0.1 \text{ мм}^2$  ( $n = 4$ ) (рис. 3В). Во всех случаях экспериментального воздействия структурным изменениям подвергались дорсальные рога серого вещества и прилежащие части боковых канатиков спинного мозга в области *tractus pyramidalis et tractus dorsolateralis*.

Стоит отметить, что в группе контроля, где осуществлялась только гемилеминэктомия без какого-либо воздействия на спинной мозг, зарегистрировано образование в зоне доступа структуры типа глиомезодермального рубца (рис. 4). Этот факт можно отнести к техническим погрешностям методики выполнения доступа, однако он же свидетельствует и о том, насколько чувствителен спинной мозг к любого рода воздействиям.

Дальнейшая оптимизация технологии локального охлаждения спинного мозга будет заключаться в усовершенствованиях оригинальной конструкции криопроводника и оптимизации условий низкотемпературного воздействия. Проведение детальных исследований на животных моделях, связанных с совершенствованием хирургических техник, использованием инновационных оптико-лазерных технологий и других методик, приблизит практических хирургов к решению проблемы функционального

восстановления спинного мозга в посттравматическом периоде [14–16].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании обоснован, разработан и верифицирован метод моделирования посттравматического глиального рубца спинного мозга у крыс. Точное следование установленным анатомическим ориентирам, использование оригинального инструментального обеспечения и методик локального холодового воз-

действия на спинной мозг позволили унифицировать моделируемый объект. Согласно данным клинических наблюдений и гистологических исследований, предлагаемая методика позволяет говорить о создании адекватной животной модели посттравматического рубца спинного мозга. ●

*Результаты работы получены с использованием животных из УНУ «Био-модель» ИБХ РАН.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nas K., Yazmalar L., Şah V., Aydın A., Öneş K. // World J. Orthop. 2015. V. 18. № 6 (1). P. 8–16.
- Falci S.P., Indeck C., Lammertse D.P. // J. Neurosurg. Spine. 2009. V. 11. P. 445–446.
- Minakov A.N., Chernov A.S., Asutin D.S., Konovalov N.A., Telegin G.B. // Acta Naturae. 2018. V. 10. № 3 (38). P. 4–10.
- Minakov A., Chernov A., Sirotkin A., Asutin D., Konovalov N., Telegin G. // Lab. Animals. 2019. V. 53(1S). P. 130.
- Vasiliev S.A., Krylov V.V., Pesnya-Prasolov S.B., Zuev A.A., Levin R.S., Pavlov V.N., Zhidkov I.L., Khovrin V.V., Fedorov D.N., Vetsheva N.N. // Neurosurgery. 2010. № 4. P. 58–64.
- Vasiliev S.A., Pesnya-Prasolov S.B., Kungurtsev S.V., Pavlov V.N. // Clin. Exp. Surg. Petrovsky J. 2015. № 1. P. 15–21.
- Ilfeld B.M., Gabriel R.A., Trescot A.M. // Br. J. Anaesth. 2017. V. 119. № 4. P. 703–706.
- Bispo dos Santos G., Cristante A.F., Marcon R.M., Inácio de Souza F., Pessoa de Barros Filho T.E., Damasceno M.L. // Acta Ortop. Bras. 2011. V. 19. № 2. P. 87–91.
- Trofimenko A.I., Chitanava T.V., Dzhopua M.A., Kade A.Kh., Egiev I.K., Chechelyan V.N., Sergeeva Y.A. // Modern Problems Sci. Edu. 2017. № 3. P. 22–31.
- Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы. СПб.: Издательство «Лань», 2001. 464 с.
- Krishna V., Andrews H., Jin X., Yu J., Varma A., Wen X., Kindy M.A. // J. Vis. Exp. 2013. V. 78. e50111, doi: 10.3791/50111.
- David B.T., Steward O. // Exp Neurol. 2010. V. 226. № 1. P. 128–135. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.08.014.
- Wada N., Shimizu T., Takai S., Shimizu N., Kanai A.J., Tyagi P., Kakizaki H., Yoshimura N. // Neurourol. Urodyn. 2017. V. 36. № 5. P. 1301–1305. doi: 10.1002/nau.23120.
- Marcol W., Slusarczyk W., Gzik M., Larysz-Brysz M., Bobrowski M., Gryniewicz-Bylina B., Rosicka P., Kalita K., Węglarz W., Barski J.J. // J. Reconstr. Microsurg. 2012. V. 28. № 8. P. 561–568.
- Kuzmina A.G., Baranov K.K., Gorbatova N.E., Kurilov V.P., Kuzmin G.P., Sirotkin A.A., Tikhonovich O.V., Zolotov S.A. // J. Appl. Spectroscopy. 2016. V. 83. № 6–16. P. 708.
- Bogachouk A.P., Storzheva Z.I., Telegin G.B., Chernov A.S., Proshin A.T., Sherstnev V.V., Zolotarev Yu.A., Lipkin V.M. // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 3(34). P. 64–70.