

## МОДЕЛИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНОГО ПО ОБЪЕМУ ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ И МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ УТРАЧЕННЫХ ФУНКЦИЙ (ЧАСТЬ 1)

С.П. Миронов, С.В. Колесов, Г.А. Степанов, М.Л. Сажнев,  
С.П. Губин, Ю.В. Иони, В.Г. Мотин, А.А. Пантелеев

ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова»  
Минздрава России, ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова» РАН, Москва, РФ

*В статье представлен метод моделирования различного по объему повреждения спинного мозга для изучения возможностей его регенерации. Работа проведена на 80 лабораторных крысах, разделенных на 5 групп в зависимости от объема наносимого повреждения. Разработан оригинальный инструмент с ограничителями для нанесения точного, дозированного по объему повреждения спинного мозга лабораторного животного. Степень восстановления функций оценивали на основании результатов регистрации вызванных потенциалов области коры головного мозга и данных шкалы тяжести повреждения BBB. Показатели в группах были распределены однородно, что указывает на состоятельность и воспроизводимость разработанной модели неполного пересечения спинного мозга.*

**Ключевые слова:** спинной мозг, повреждение, двигательная активность, вызванные потенциалы.

### *Modeling of a Different Volume Spinal Cord Injury in Rats and Methods for Evaluation of Lost Functions Restoration*

S.P. Mironov, S.V. Kolesov, G.A. Stepanov, M.L. Sazhnev,  
S.P. Gubin, Yu.V. Ioni, V.G. Motin, A.A. Panteleev

Central Institute of Traumatology and Orthopaedics named after N.N. Priorov;  
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia

*The method for modelling of a different volume spinal cord injury to study potentialities for its regeneration is presented. The work was performed on 80 laboratory rats divided into 5 groups according to the volume of inflicted injury. Original instrument with restrictors for the infliction of the accurate and measured by volume spinal cord injuries was elaborated. The degree of function restoration was evaluated by the results of visual assessment of the movements in animals' hind paws, records of induced potentials of the cerebral cortex region and by BBB scale. In every separate group the obtained indices were distributed uniformly that indicated justifiability and reproducibility of the elaborated model of incomplete spinal cord injury.*

**Key words:** spinal cord, injury, motor activity, injury, motor activity, induced potentials.

**Введение.** Проблема регенерации спинного мозга при его повреждении и дефектах сегодня является одной из наиболее актуальных и требующих комплексного решения. Всевозможные микрохирургические операции, направленные на прямое сшивание концов спинного мозга или использование аутоневральной пластики, не приводят к желаемому эффекту — восстановлению проводимости путей спинного мозга.

Попытки создания экспериментальной модели повреждения спинного мозга предпринимались неоднократно. Ehrlich и Brieger в 1884 г. впервые показали, что сдавление брюшной аорты у кроликов в течение 1 ч вызывает поражение серого вещества спинного мозга [1]. Известен метод моделирования травмы спинного мозга по Allen, при

котором после предварительной анестезии у животных обнажают спинной мозг и травмируют его падающим предметом определенной массы [2]. В настоящее время наиболее широко применяются методики контузионного и компрессионного повреждения, а также хирургического пересечения, так как с их помощью можно добиться нарушения проведения нервных импульсов по спинному мозгу в полном объеме.

Контузионная модель наиболее применима при необходимости изучения патофизиологии вторичного повреждения, так как она обеспечивает повреждение разной степени тяжести с соответствующими нарушениями двигательных и сенсорных функций при сохранении структурной целостности тканей. Для реализации этой модели в

последние годы было разработано несколько устройств, позволяющих довольно точно контролировать объем повреждения. Часто используется методика с падающим грузом, подразумевающая применение устройства New York University (NYU)/MASCIS или его аналогов, преимущество которой заключается в наличии специальной системы оценки силы удара, а также характеристики поверхности спинного мозга при ударе, что позволяет более точно контролировать параметры повреждения [3]. Существуют и другие методики, при которых механическое воздействие контролируется датчиками давления на ткани спинного мозга [4, 5].

Компрессионная модель имитирует устойчивое сдавление спинного мозга при сужении позвоночного канала. Для достижения компрессионного эффекта применяются хирургические клипсы с установленной силой компрессии, модифицированные пинцеты, а также устройства для контролируемой пневматической компрессии. Наиболее воспроизводимых результатов удается добиться при использовании пневматических устройств, которые обеспечивают достаточно высокую точность моделирования компрессионных повреждений и дают возможность контролировать биомеханические параметры повреждения (сила, скорость компрессии, степень смещения ткани и др.) [6, 7].

Недостатками описанных моделей являются малодоступность устройств [8], а также невозможность оценки повреждения спинного мозга с нарушением непрерывности его структуры.

Наиболее доступными и часто используемыми способами повреждения спинного мозга являются полное пересечение, фокальная миелотомия, дорсальная или латеральная гемисекция, резекция и аспирационные нарушения целостности нервной ткани спинного мозга. Преимущество данных методов заключается в достоверном полном нарушении структурной непрерывности аксонов в зоне вмешательства, что важно при исследовании регенерационных возможностей ткани спинного мозга, так как на практике такие повреждения высоко вероятны. Кроме того, они обеспечивают условия для изучения механизмов, которые препятствуют регенерации нервной ткани ЦНС в зоне механического повреждения; позволяют оценить степень последующих утраты и восстановления функций соответствующих путей проведения.

При пересечении спинного мозга создаются идеальные условия для изучения регенеративных процессов. Так, например, в работе [9] после частичного пересечения (фокальная миелотомия на уровне С4) для оценки координации движений передних конечностей у лабораторных крыс применяли поведенческие тесты. Одностороннее пересечение отдельно взятых спинальных путей проведения на одном уровне с последующим электромеханическим тестированием использу-

ется для исследования локомоторных и сенсорных нарушений, а также компенсаторного восстановления [10]. Альтернатива одностороннему пересечению — более полное дорсовентральное или вентродорсальное пересечение [11]. Недавно разработанная экспериментальная установка вибро-нож (VibraKnife) позволяет с высокой точностью выполнять миелотомии и дорсальные гемисекции, которые вызывают строго определенные сенсомоторные нарушения [8, 12]. Однако высокая стоимость и малодоступность установки значительно ограничивают возможности ее применения.

Целью настоящего исследования было разработать модель дозированного повреждения спинного мозга лабораторных животных для изучения возможностей регенерации спинного мозга.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 80 лабораторных самках крыс породы Вистар массой тела 220–260 г. Эксперименты выполняли в соответствии с «Рекомендациями комитета по этике, проводящего экспертизу биомедицинских исследований» (ВОЗ, 2000) и «Директивами Европейского сообщества» (86-609 ЕЕС). В зависимости от объема повреждения животные были разделены на 5 групп по 16 животных: 1-я группа — пересечение 50% спинного мозга; 2-я группа — пересечение 80–90% спинного мозга; 3-я группа — полное пересечение спинного мозга (плотный контакт поврежденных концов спинного мозга); 4-я группа — резекция сегмента спинного мозга длиной 1 см; 5-я группа — полное пересечение с отсутствием контакта в зоне повреждения (концы спинного мозга в зоне повреждения разведены).

*Ход операции.* Все операции осуществлялись одной хирургической бригадой с использованием оптического микроскопа Carl Zeiss и микрохирургического инструментария. Для наркоза применяли золетил 100 в дозе 0,1 мл. Разрез кожи выполняли в проекции остистых отростков позвонков в грудном отделе позвоночника от Th6 до Th8 с помощью скальпеля, доступ к позвончику — с помощью микрохирургических ножниц. Необходимый уровень оперативного вмешательства определяли пальпаторно по соответствующим ребрам. Для визуализации спинного мозга и доступа к нему кусачками проводили ламинэктомию в проекции Th6–Th7. Затем рассекали ткани спинного мозга в грудной части (pars thoracica) при помощи скальпеля и специального инструмента, разработанного для дозированного повреждения спинного мозга. Инструмент снабжен двумя ограничителями, позволяющими наносить травму в объеме 50 и 80–90% соответственно (рис. 1). По данным [13], диаметр спинного мозга крысы в рассматриваемом сегменте составляет 5 мм. Руководствуясь этими данными, ограничитель А сделали так, чтобы он обеспечивал разрез глубиной 2,5 мм, что соответ-

ствуется 50% диаметра спинного мозга, ограничитель В — 4 мм, что соответствует 80% указанного диаметра.

Ведение животных в послеоперационном периоде осуществляли в условиях, способствовавших наиболее эффективному восстановлению. Крыс содержали в оптимальных температурных условиях (27–28°C), обеспечивали доступ к еде и воде в необходимых количествах, восполняли кровопотерю путем введения физиологического раствора, в течение первых 3–4 сут после операции проводили антибиотикотерапию ветбицином (2 мл), обработку послеоперационной раны спреем тетрациклинов. Кроме того, осуществляли массаж и мануальную экскурсию мочевого пузыря с целью его опорожнения и профилактики застойных явлений и инфекционных осложнений.

Для определения степени восстановления функций использовали следующие методы:

- шкалу тяжести повреждения BBB (Basso, Beattie and Bresnahan) для объективной визуальной оценки уровня неврологических расстройств и функционального исхода повреждения [14];
- регистрацию вызванных потенциалов области коры головного мозга с помощью специального оборудования.

Исследования проводили до операции, непосредственно после операции, а также на 14-е сутки после вмешательства;

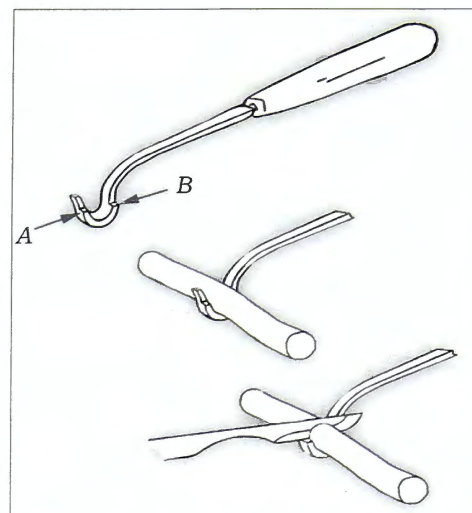
Оценка неврологического статуса при помощи шкалы BBB заключалась в визуальном анализе поведения животного и степени нарушения двигательных функций нижних конечностей в послеоперационном периоде сторонними наблюдателями, не имеющими информации о степени тяжести повреждения спинного мозга у крысы [14]. Шкала предусматривает оценку движений в диапазоне от 0 (отсутствие движений) до 21 (передвижение без нарушений) баллов, при этом оценка от 0 до 7 баллов свидетельствует о наличии движений в тазобедренных, коленных и голеностопных суставах; от 8 до 13 — о постановке лап и координации движений; от 14 до 21 — о стабильности корпуса и балансировке хвоста.

Регистрирующий игольчатый электрод для получения соматосенсорных вызванных потенциалов устанавливали в череп животного в область проекции сенсомоторной коры, а стимулирующий — в область мышц сгибателей бедра. Стимуляцию проводили при помощи изолированного стимулятора постоянным током в соответствии со следующими параметрами: сила тока 3 мА, продолжительность стимула 20 мс, частота 0,5 Гц.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения MATLAB и



**Рис. 1.** Инструмент для дозированного повреждения спинного мозга с ограничителями. Объяснения в тексте.



StatSoft STATISTICA 8.0. Для определения статистической значимости использовали тест Краскела — Уоллиса и U-тест Манна — Уитни. Критический уровень статистической значимости в данном исследовании был принят равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Выживаемость животных напрямую коррелировала с тяжестью повреждения спинного мозга. Среди крыс с пересеченным на 50% спинным мозгом показатель выживаемости составил 81,3% (13 из 16 животных). Во 2, 3 и 4-й группах выживаемость животных в 1-е сутки после вмешательства составила соответственно 63% (10 из 16), 69% (11 из 16) и 50% (8 из 16). В группе с разведенными концами полностью пересеченного спинного мозга выжило 9 (56%) животных.

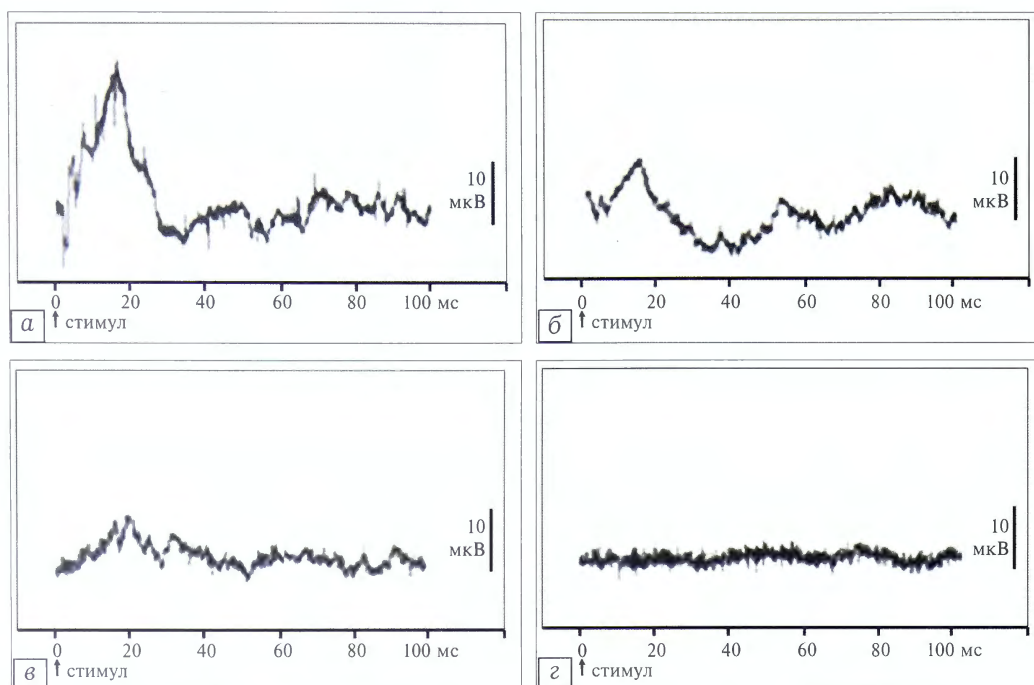
Выживаемость животных к концу 2-й недели эксперимента также соответствовала степени повреждения. В 1-й группе выжили все кроме одного животного. Во 2, 3, 4 и 5-й группах выжили соответственно 8, 8, 5 и 3 крысы. Наиболее вероятной причиной смерти животных являлся острый воспалительный процесс, осложненный инфекцией мочевыводящих путей.

Результаты комплексной оценки состояния животных в 1-е и 14-е сутки после операции представлены в таблице. В 1-е сутки умеренно выраженные движения в задних конечностях определялись только в 1-й группе, где, согласно критерию

*Результаты оценки состояния животных на разных сроках наблюдения*

| Группа | Амплитуда вызванных потенциалов, мкВ |            | Оценка по шкале BBB, баллы |            |
|--------|--------------------------------------|------------|----------------------------|------------|
|        | 1-е сутки                            | 14-е сутки | 1-е сутки                  | 14-е сутки |
| 1-я    | 5,5±3,7                              | 8,9±4,4*   | 2,7±2,1                    | 4,6±3,3*   |
| 2-я    | 1,8±1,1                              | 3,0±0,9*   | 1,1±0,7                    | 2,2±1,5*   |
| 3-я    | —                                    | 1,2±0,8*   | 0,5±0,4                    | 0,7±0,3    |
| 4-я    | —                                    | —          | —                          | —          |
| 5-я    | —                                    | —          | —                          | —          |

\*  $p < 0,05$



**Рис. 2.** Репрезентативные кривые вызванных потенциалов в сенсомоторной области коры крысы в ответ на стимуляцию мышц задней лапы.

а — до пересечения спинного мозга,  
б — сразу после пересечения 50% спинного мозга,  
в — 80% спинного мозга,  
г — после полного пересечения спинного мозга (сигнал отсутствует).

ям шкалы BBB, регистрировали умеренные движения в двух или более крупных суставах (чаще всего в тазобедренном и коленном). Во 2-й группе у большинства животных были выявлены слабые или умеренно выраженные движения только в одном крупном суставе и у некоторых животных — слабые движения во втором суставе. У животных остальных групп движения в нижних конечностях практически не определялись.

Регистрируемые потенциалы в 1-е сутки после операции демонстрировали значительное снижение амплитуды, что соответствовало механическому нарушению целостности проводящих путей. Репрезентативные графики кривых вызванных потенциалов представлены на рис. 2. Значение средней по выборке исходной амплитуды вызванных потенциалов составило  $41,7 \pm 7,5$  мкВ, при этом статистически значимых различий между группами выявлено не было. В 1-й группе снижение амплитуды составило в среднем  $86,5 \pm 3,7\%$ , во 2-й —  $95,6 \pm 4,7\%$ , в остальных группах потенциал практически не вызывался.

На 14-е сутки после операции движения различной степени выраженности в задних конечностях животных определялись только в первых трех группах. При этом в 1-й группе у всех животных отмечались выраженные движения в задних конечностях и у большинства животных — движения во всех трех крупных суставах с периодическими попытками переставлять конечность, что соответствует 4–8 баллам по шкале BBB. В группе с пересечением 80% спинного мозга у всех животных имели место умеренные движения в двух или более крупных суставах. При полном пересечении спинного мозга у части животных определялись только слабые движения в одном крупном суставе. В остальных двух группах у выживших животных движений в задних конечностях по-прежнему не

отмечалось. По результатам регистрации вызванных потенциалов установлено, что их средняя амплитуда несколько увеличилась в 1-й и 2-й группах (на 7,7 и 2,8% соответственно), а также появились слабые регистрируемые потенциалы у некоторых животных в группе со 100% пересечением ( $p < 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Задачей проведенной экспериментальной работы было разработать модель механического повреждения спинного мозга, которая могла бы быть использована при дальнейших исследованиях восстановления функций, утраченных в результате повреждения спинного мозга. Была отработана методика хирургического доступа к спинному мозгу животных посредством ламинэктомии с последующим его пересечением при помощи специального инструмента, задающего определенный объем повреждения. Такой подход обеспечил высокую воспроизводимость результатов различного по объему повреждения спинного мозга.

Использованные в ходе работы методы оценки (шкала BBB, регистрация вызванных потенциалов) позволили достоверно подтвердить нарушение непрерывности проводящих путей спинного мозга, оценить динамику восстановления проводимости и двигательной активности. Показатели были однородно распределены по группам, что подтвердило состоятельность данной модели повреждения. На основании полученных данных можно предположить, что частичное восстановление нейронных связей происходит спонтанно, однако оно коррелирует с объемом повреждения, а также с расстоянием между поврежденными фрагментами спинного мозга. Представленная модель может быть использована в исследованиях по регенерации клеток спинного мозга, так как обеспечивает досто-

верное и воспроизводимое нарушение проводимости спинного мозга. Кроме того, она дает возможность вводить в область повреждения необходимые экспериментальные агенты и достоверно оценивать динамику и степень восстановления проводимости поврежденных тканей. В целях повышения выживаемости экспериментальных животных необходимо строго соблюдать условия, обеспечивающие наиболее быстрое и эффективное послеоперационное восстановление.

### ВЫВОДЫ

1. При пересечении 50% спинного мозга его проводимость практически полностью нарушается, однако через 14 дней происходит спонтанное восстановление проводимости до уровня  $4,6 \pm 3,3$  балла по шкале BBB и увеличение амплитуды регистрируемых вызванных потенциалов на 7,7%.

2. Пересечение 80–90% спинного мозга сопровождается практически полным нарушением проводимости с незначительным спонтанным восстановлением проводимости через 14 дней до уровня  $2,2 \pm 1,5$  балла по шкале BBB и увеличением амплитуды вызванных потенциалов на 2,8%.

3. Результатом полного пересечения спинного мозга является полное нарушение проводимости. Через 14 дней у единичных животных отмечается спонтанное появление вызванных потенциалов низкой амплитуды и слабо выраженных движений.

4. При резекции спинного мозга на протяжении 1 см и его пересечении с разведением концов проводимость нарушается полностью без последующего восстановления.

5. На процесс восстановления проводимости спинного мозга влияет расстояние между его проксимальным и дистальным фрагментом.

6. Динамика моторных функций после различного по объему пересечения спинного мозга соответствует изменениям амплитуды вызванных потенциалов.

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-15-00880 «Разработка новых методов лечения повреждений спинного мозга с использованием магнитных наночастиц в различных средах в сочетании с электромагнитным полем».*

**Сведения об авторах:** Миронов С.П. — доктор мед. наук, профессор, академик РАН и РАМН, директор ЦИТО; Колесов С.В. — доктор мед. наук, профессор, зав. отделением патологии позвоночника ЦИТО; Степанов Г.А. — доктор мед. наук, профессор, науч. сотр. ЦИТО; Сажнев М.Л. — канд. мед. наук, врач отделения патологии позвоночника ЦИТО; Губин С.П. — доктор мед. наук, профессор, зав. лабораторией химии наноматериалов ИОНХ РАН; Иони Ю.В. — канд. мед. наук, науч. сотр. лаборатории химии наноматериалов ИОНХ РАН; Мотин В.Г. — доктор мед. наук, старший науч. сотр. группы экспериментальной травматологии и ортопедии ЦИТО; Пантелеев А.А. — ординатор ЦИТО.

**Для контактов:** Сажнев Максим Леонидович. 127299, Москва, ул. Приорова, д. 10, ЦИТО. Тел.: 8 (495) 450-44-51. E-mail: mak.sajnev@yandex.ru.

### ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Ehrlich u. Brieger. Ueber die Aussrhaltung des Lendenmarks. Zeitschr. f. klin. Medicin. Bd. VII; 1884.
2. Allen A. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: A preliminary report. JAMA. 1911; 37: 878–80.
3. Gruner J.A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. J. Neurotrauma. 1992; 9: 123–6.
4. Scheff S.W., Rabchevsky A.G., Fugaccia I., Main J.A., Lump J.E. Jr. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. J. Neurotrauma. 2003; 20 (2): 179–93.
5. Stokes B.T., Jakeman L.B. Experimental modelling of human spinal cord injury: a model that crosses the species barrier and mimics the spectrum of human cytopathology. Spinal Cord. 2002; 40 (3): 101–9.
6. Cao Q., Zhang Y.P., Iannotti C., DeVries W.H., Xu X.M., Shields C.B., Whittemore S.R. Functional and electrophysiological changes after graded traumatic spinal cord injury in adult rat. Exp. Neurol. 2005; 191 Suppl 1: S3–S16.
7. Rabchevsky A.G., Sullivan P.G., Fugaccia I., Scheff S.W. Creatine diet supplement for spinal cord injury: Influences on functional recovery and tissue sparing in rats. J. Neurotrauma. 2003; 20: 659–69.
8. Beaumont E., Onifer S.M., Reed W.R., Magnuson D.S. Magnetically evoked inter-enlargement response: An assessment of ascending propriospinal fibers following spinal cord injury. Exp. Neurol. 2005; 201: 428–40.
9. Schrimsher G.W., Reier P.J. Forelimb motor performance following dorsal column, dorsolateral funiculi, or ventrolateral funiculi lesions of the cervical spinal cord in the rat. Exp. Neurol. 1993; 120: 264–76.
10. Webb A.A., Muir G.D. Course of motor recovery following ventrolateral spinal cord injury in the rat. Behav. Brain Res. 2004; 155: 55–65.
11. Schucht P., Raineteau O., Schwab M.E., Fouad K. Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord. Exp. Neurol. 2002; 176: 143–53.
12. Onifer S.M., Zhang Y.P., Burke D.A., Brooks D.L., Decker J.A., McClure N.J., Floyd A.R., Hall J., Proffitt B.L., Shields C.B., Magnuson D.S. Adult rat forelimb dysfunction after dorsal cervical spinal cord injury. Exp. Neurol. 2005; 192: 25–38.
13. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы. СПб.: Лань; 2001 [Nozdrachev A.D., Polyakov E.L. Anatomy of the rat. Sankt-Peterburg: Lan'; 2001].
14. Basso D.M. Behavioral testing after spinal cord injury: Congruities, complexities, and controversies. J. Neurotrauma. 2004; 21: 395–404.