



Научно-исследовательский институт
нейронаук и медицины

N* Новосибирский
государственный
университет
*НАСТОЯЩАЯ НАУКА

Моделирование психопатологий на зebraданио: черепно-мозговая травма

Амстиславская Т.Г., Белова А.С.

N*

Зебраданио

- *Danio rerio* - тропическая пресноводная рыба, обитающая в реках Гималаев в Южной Азии
- Длина взрослой особи достигает 3-4 см
- Короткое время развития (3 месяца)
- Эмбрион быстро развивается, прозрачный, оптически чистый и легко доступный для экспериментов и наблюдений
- Паттерны и связи в ЦНС зебраданио расшифрованы и соотносятся с ЦНС человека



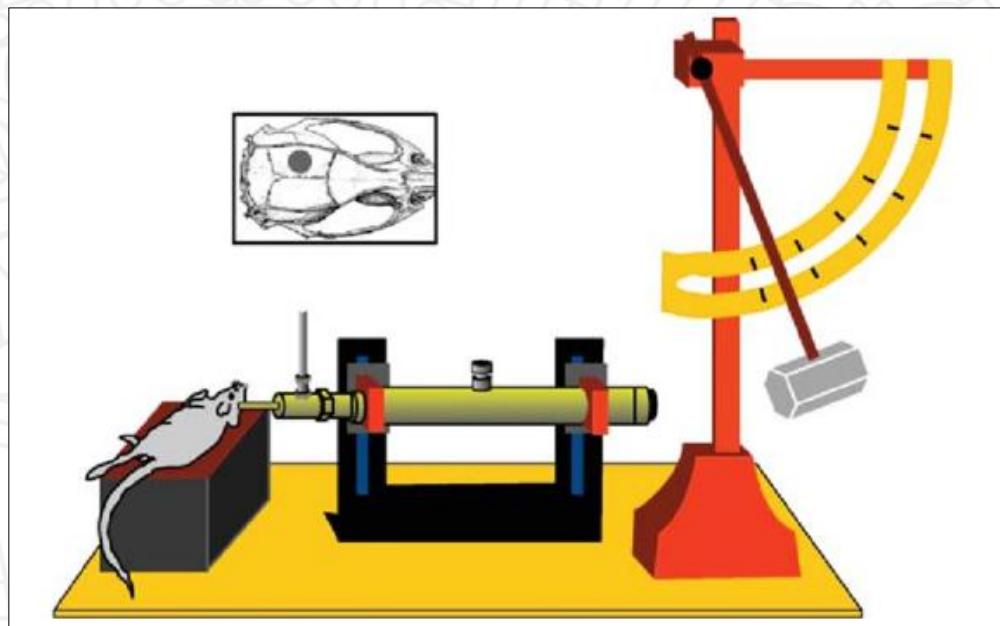
Черепно-мозговая травма

- Черепно-мозговая травма (ЧМТ) представляет собой совокупность патофизиологических и морфологических изменений функции мозга, вызванных внешним воздействием, например - ударом, пенетрацией или сотрясением (Centers for Disease Control and Prevention, 2003)
- Последствия ЧМТ включают в себя развитие заболеваний психиатрического, неврологического и соматического профилей. В этой связи, перспективным для изучения регенеративного потенциала человека является исследование организмов, способных к нейрорегенерации, среди которых *зебраданио* не имеют себе равных.

Модели черепно-мозговой травмы

Модель	Тип повреждения	Плюсы модели	Минусы	Виды
Контролируемый кортикальный ушиб	Очаговое	Хорошо воспроизводима	Необходимость трепанации черепа	Хорек, мышь, крыса, свинья, обезьяна
Падающий груз				
метод Фини	Очаговое	Механизм повреждения близок к ЧМТ человека	Необходимость трепанации черепа	Крыса
метод Шохами	Очаговое	Легкая операция с оценкой неврологической тяжести через 1 ч	Сложно воспроизводима	Крыса, мышь
метод Мармару	Рассеяное	Механизм повреждения близок к ЧМТ человека	Сложно воспроизводима	Крыса, мышь
Мэрилендская модель	Рассеяное	Механизм повреждения близок к ЧМТ человека	Требует дальнейшей характеристики	Крыса
Модели жидкостной перкуссии				
центральное повреждение	Смешанное	Высокая воспроизводимость с тонкими настройками	Необходимость трепанации черепа, высокая смертность	Кошка, кролик, крыса, собака, овца, свинья
латеральное повреждение	Смешанное	Высокая воспроизводимость с тонкими настройками	Необходимость трепанации черепа, высокая смертность	Крыса, мышь, свинья
Взрыв	Рассеяное	Механизм повреждения близок к ЧМТ человека	Необходимость стандартизации	Крыса, мышь, свинья
Repeated mild	Рассеяное	Механизм травмы близок к спортивной ЧМТ	Требует дополнительной характеристики	Крыса, мышь, свинья
проникающее баллистическое повреждение головного мозга	Очаговое	Механизм повреждения близок к ЧМТ человека	Нуждается в стандартизации	Кошка, крыса

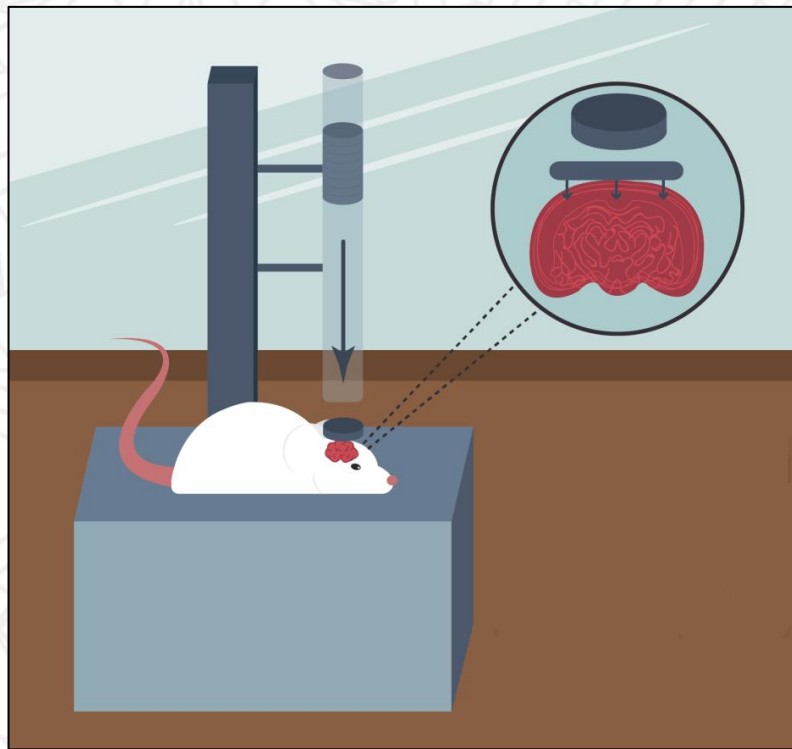
«Золотой стандарт» современных исследований ЧМТ



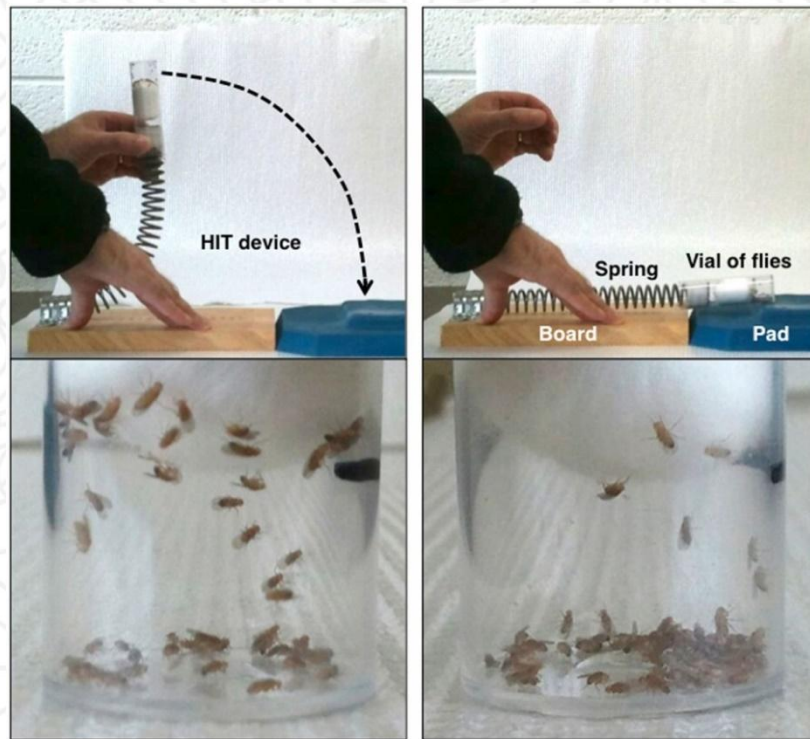
Маятник с известной высоты ударяет по поршню резервуара, заполненного физиологическим раствором с последующим concentрическим распространением жидкости в эпидуральном пространстве, что обуславливает диффузное воздействие на мозг.

Модель латерального гидродинамического удара
(жидкостной перкуссии, Katayama, 1990)

Модели черепно-мозговой травмы



Модель падения груза на грызунах
(Marmarou и др., 1994)



Модель закрытой ЧМТ на дрозофилах
(Katzenberger и др., 2013)

ЧМТ



Модель падения груза

Индукция ЧМТ
ультразвуком

Индукция ЧМТ
иглой

Модели падения груза

Модели
гидродинамического
удара

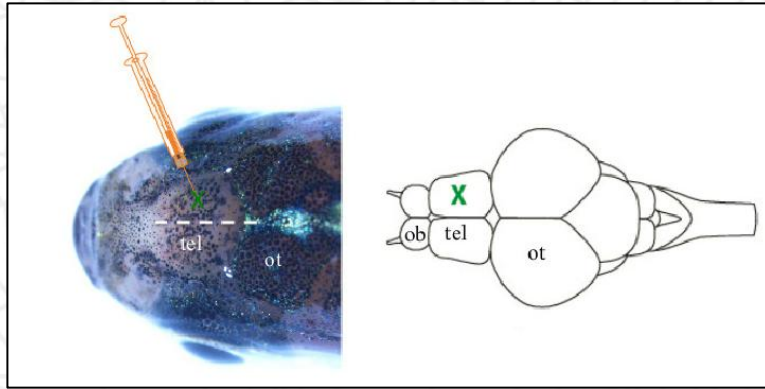
Сотрясение головного
мозга

Ушиб головного мозга

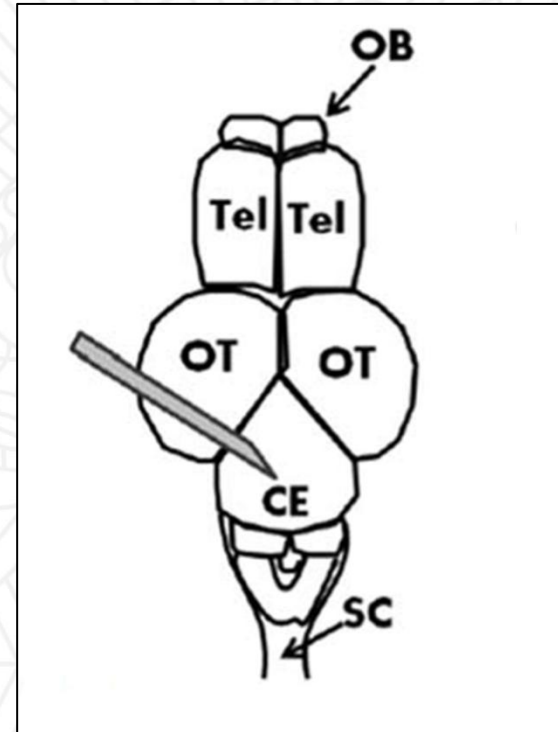
Диффузное аксональное
повреждение мозга

Сдавливание головного
мозга

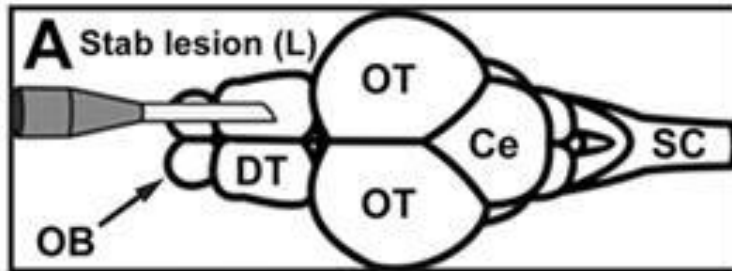
Модели черепно-мозговой травмы на зebraданио



Индукция ЧМТ иглой через ноздрю (Vialws и др., 2014)

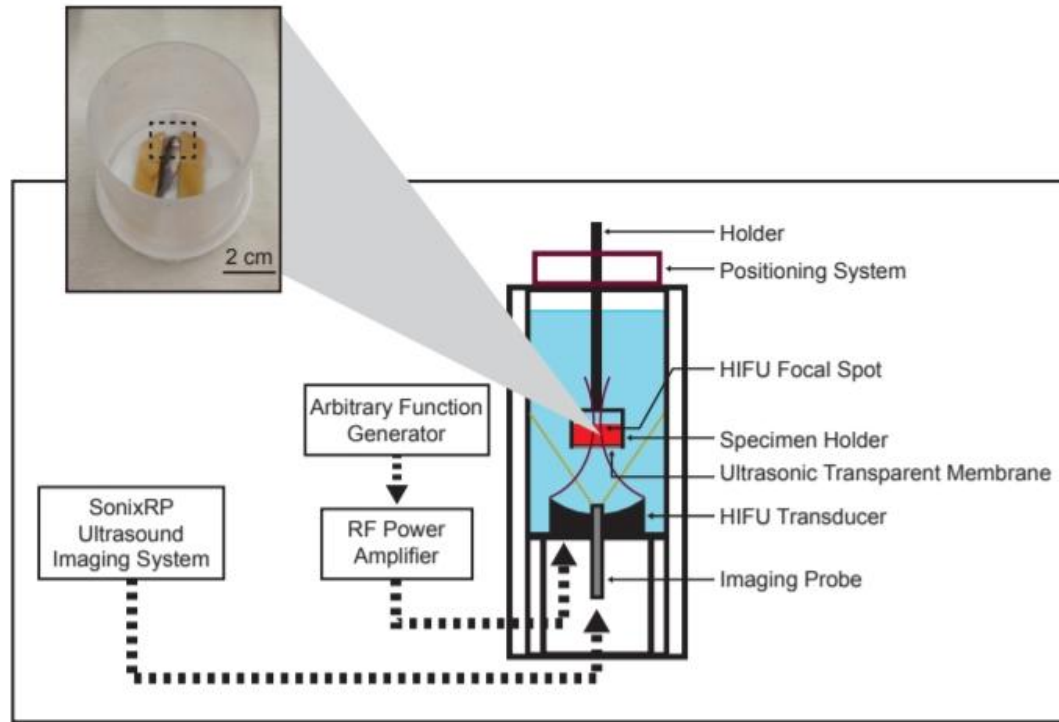


Индукция ЧМТ иглой на мозжечке (Chia-Chou и др., 2014)



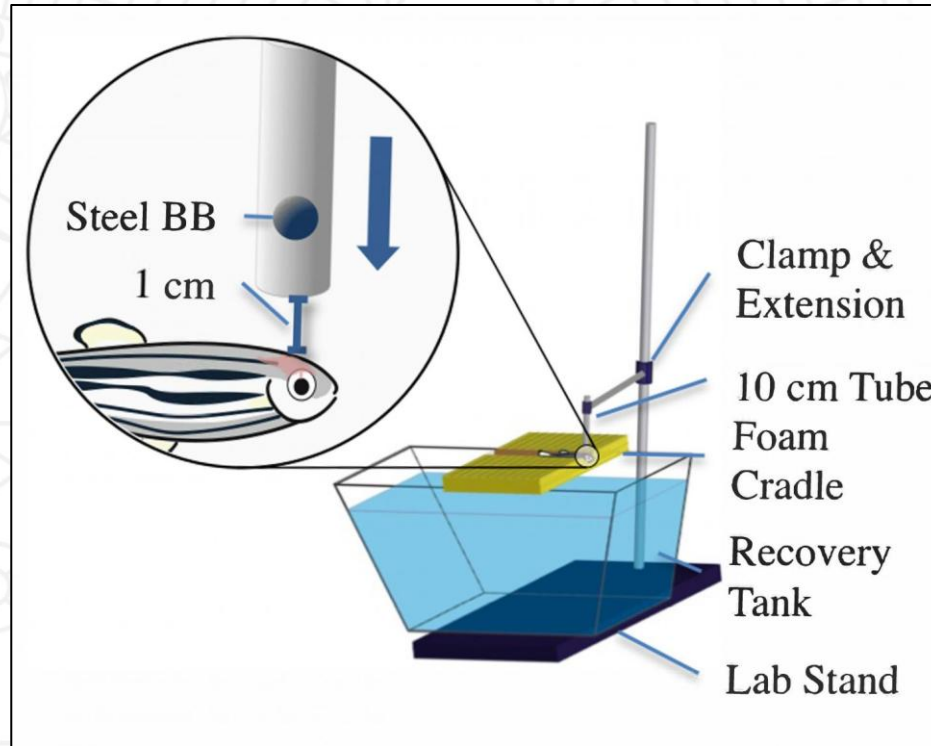
Индукция ЧМТ иглой (Chisholm и др., 2013)

Модели черепно-мозговой травмы на зебраданио



Направленная импульсная система фокусированного ультразвука высокой интенсивности (pHIFU) с частотой 1 МГц (McCutcheon и др., 2017)

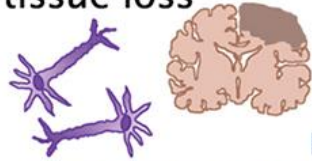
Модели черепно-мозговой травмы на зебраданио



Модель с использованием свободно падающего груза
(Maheras и др., 2018)

Патогенез ЧМТ

Neuronal death
and tissue loss



Neutrophil activity, CXCR2
CCR2, CX3CR1 (early), TNF α ,
TGF β , TNFR1, IL-1 β , GM-CSF,
TREM2

CX3CR1 (late),
TNFR2, IL-10,
IL-6

BBB breakdown
and edema



IL-10

Neutrophil activity



TBI

Secondary immune challenge
Inflammasomes
CCR2, type-1 IFN, CX3CR1 (early)

IL-6, IL-10,
CX3CR1 (late)

Lymphocyte
sequestration
CX3CR1 (late)

Secondary immune challenge
Neutrophil activity
T cell activity
CCR2, CX3CR1 (early), TNFR1, IL-6, IL-1 β ,
G-CSF, GM-CSF, TGF β , TREM2, TGIF

Upregulation of
inflammatory
mediators



Gliosis and
cell
infiltration

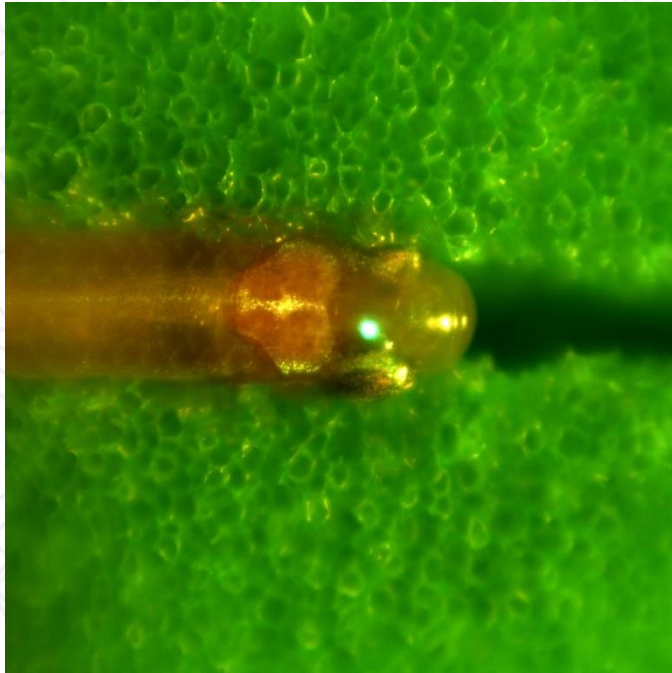


Модель черепно-мозговой травмы, индуцированной лазером



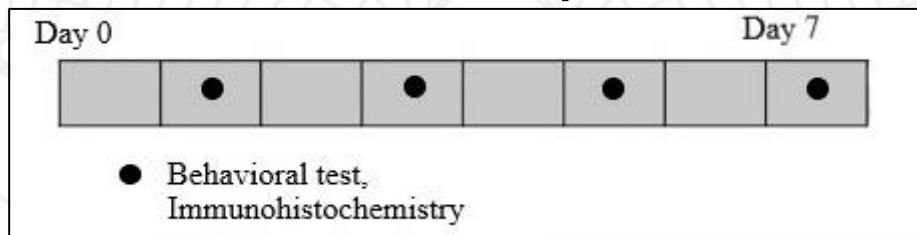
- Лазерная установка состоит из блока управления, видеокамеры и лазера с длиной волны 450 нм.
- Рыба помещается в прорезь влажной губки.
- Теленцефалон зебраданию подвергается излучению мощностью 500 мВт.

Модель черепно-мозговой травмы, индуцированной лазером



Цель работы: Моделирование черепно-мозговой травмы с использованием лазерного излучения на *зебраданию*.

Дизайн эксперимента

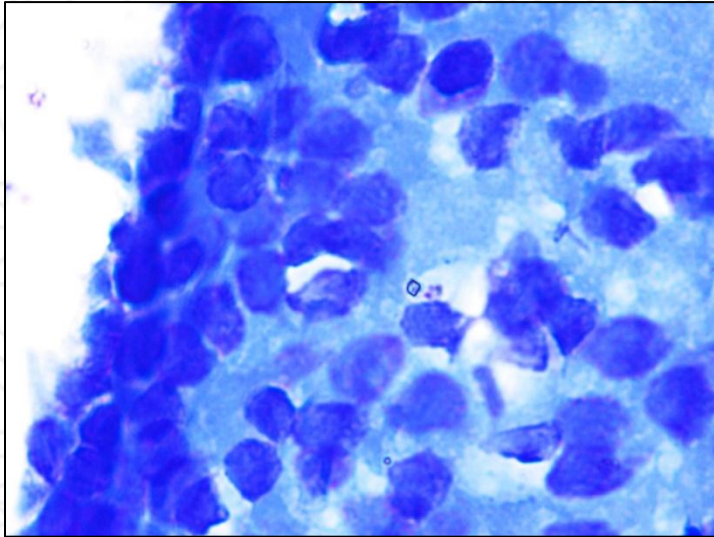


Группа «ЛО»
ложно оперированные
n=16

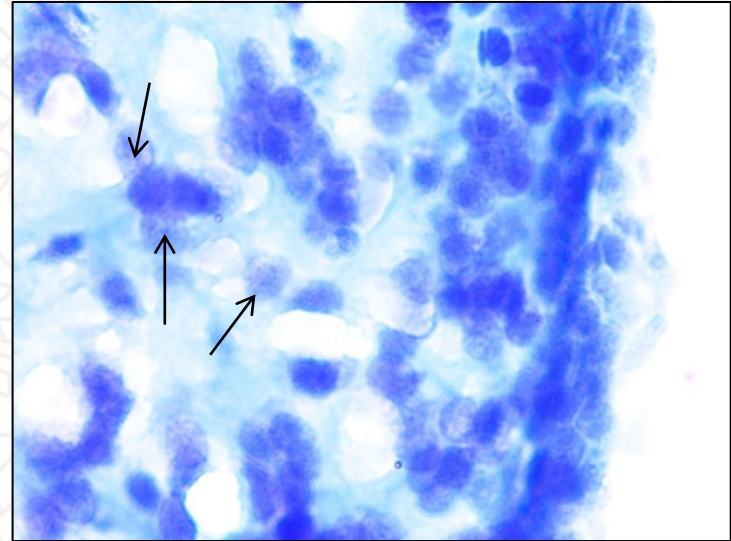
Группа «ЧМТ»
черепно-мозговая травма
n=16
Индукция ЧМТ лазером (0 день)

0, 1, 3, 5, 7 день –
тест «новый аквариум»,
иммуногистохимия

Морфологическая структура теленцефалона зебраданио после ЧМТ



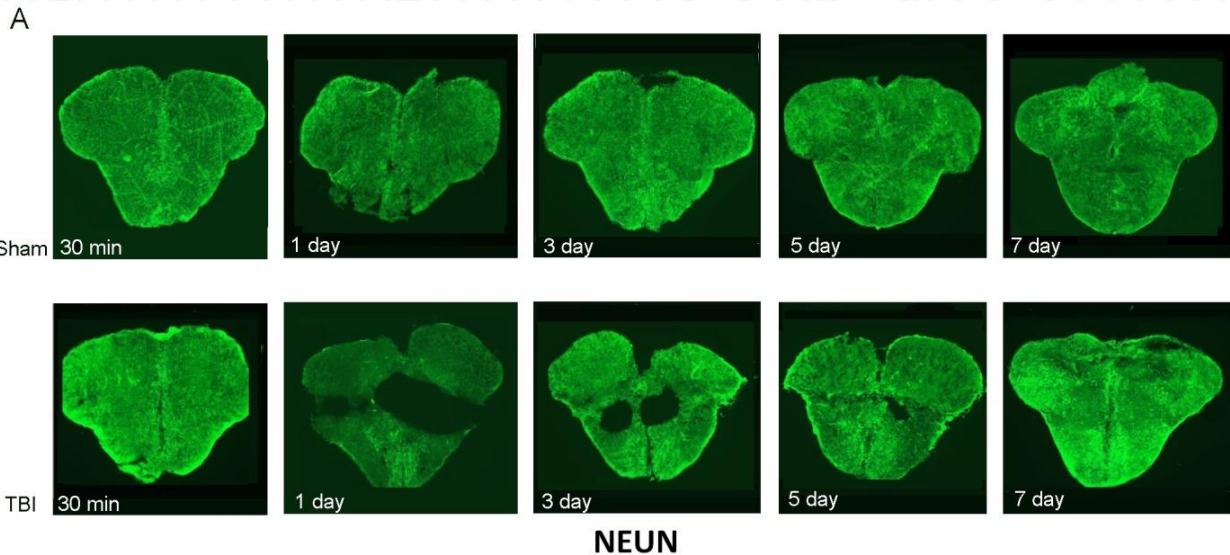
Ложно оперированные



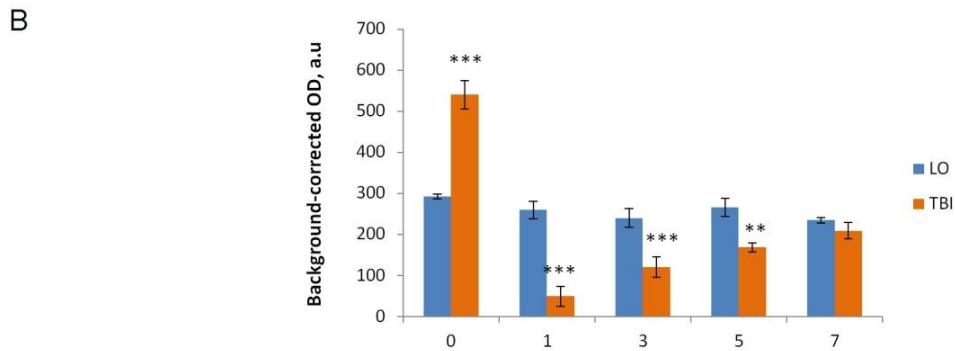
ЧМТ

Окраска криосрезов по Ниссля, увеличение 100x

Влияние лазер-индуцированной ЧМТ на экспрессию NeuN



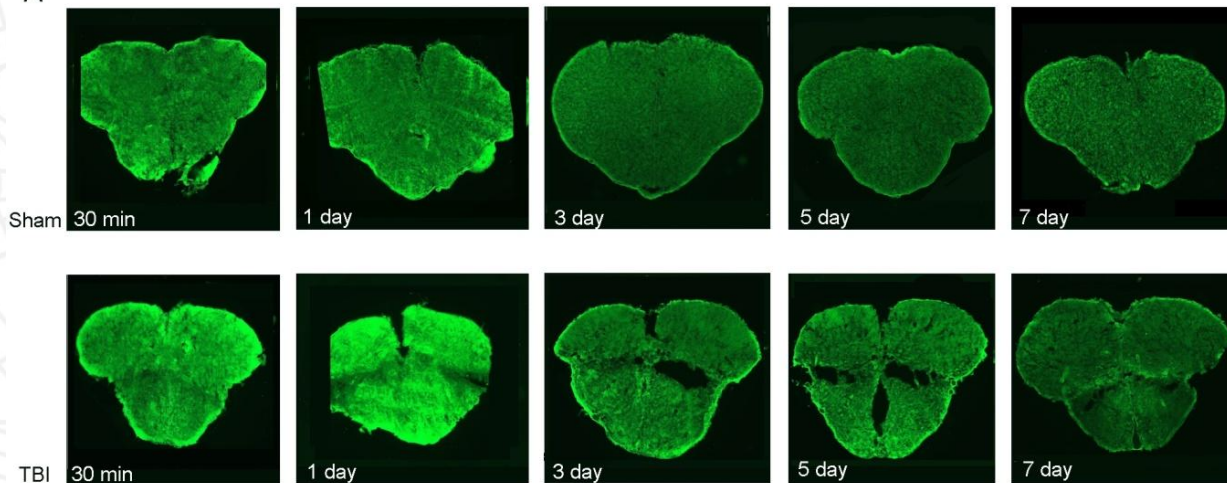
A – изображения ИГХ окрашенных срезов,
B – количественное распределение NeuN-положительных клеток.



** - $p < 0.01$
*** - $p < 0.001$

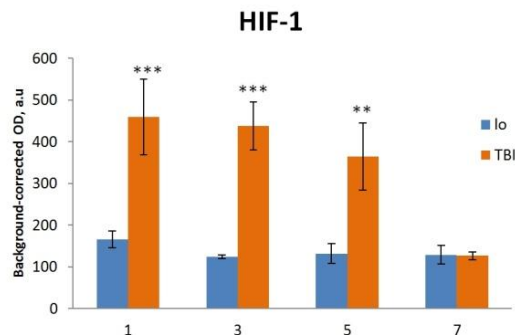
Влияние лазер-индуцированной ЧМТ на экспрессию HIF1A

A



A – изображения ИГХ окрашенных срезов,
B – количественное распределение HIF1A-положительных клеток.

B

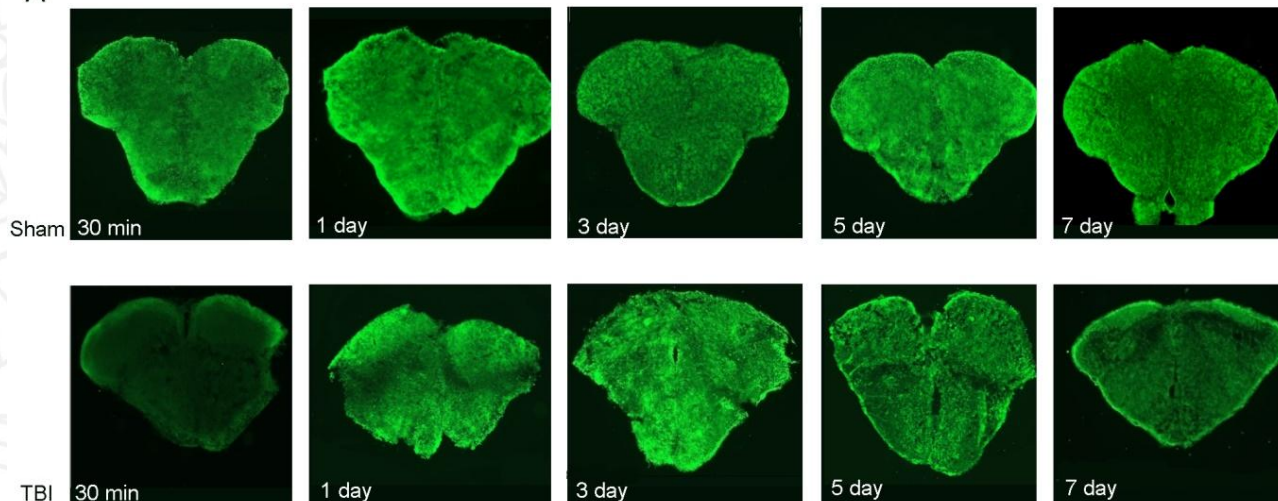


** - $p < 0.01$

*** - $p < 0.001$

Влияние лазер-индуцированной ЧМТ на экспрессию BDNF

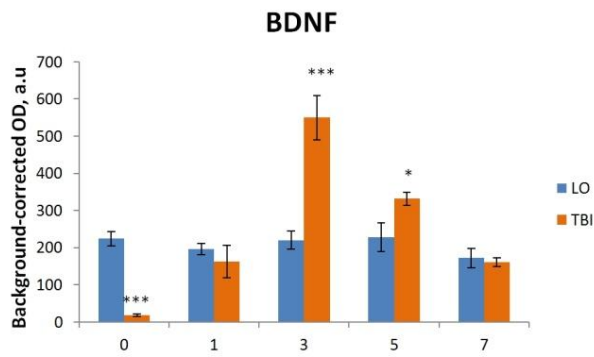
A



A – изображения ИГХ окрашенных срезов, В - количественное распределение BDNF-положительных клеток.

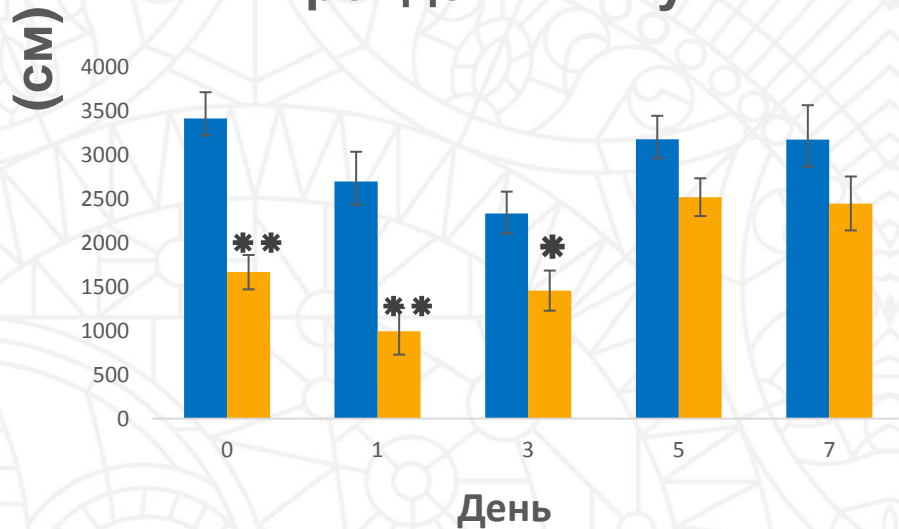
* - $p < 0.05$,
*** - $p < 0.001$

B

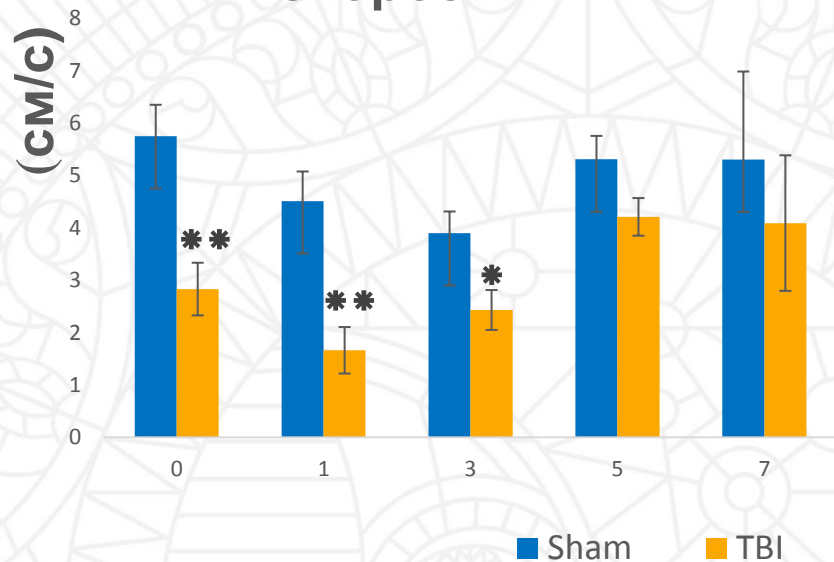


Двигательная активность

Пройденный путь

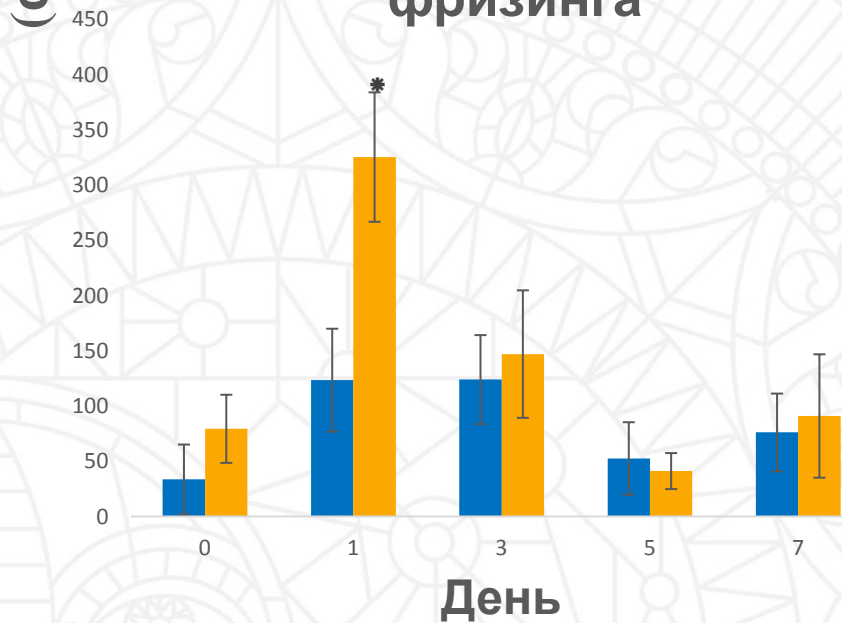


Скорость

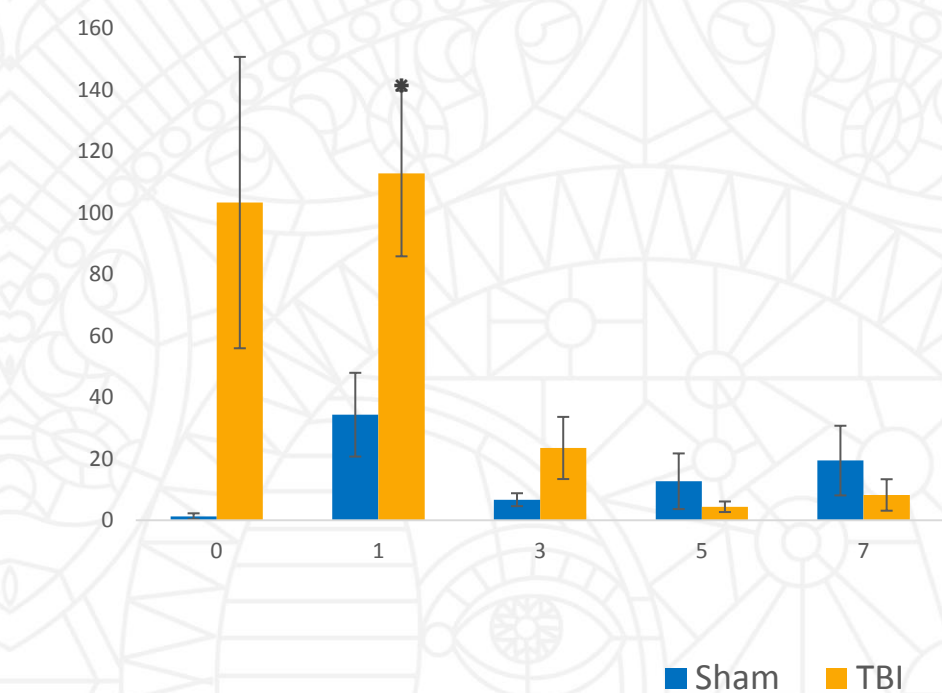


* - $p < 0.05$,
** - $p < 0.01$

(с) Продолжительность фризинга



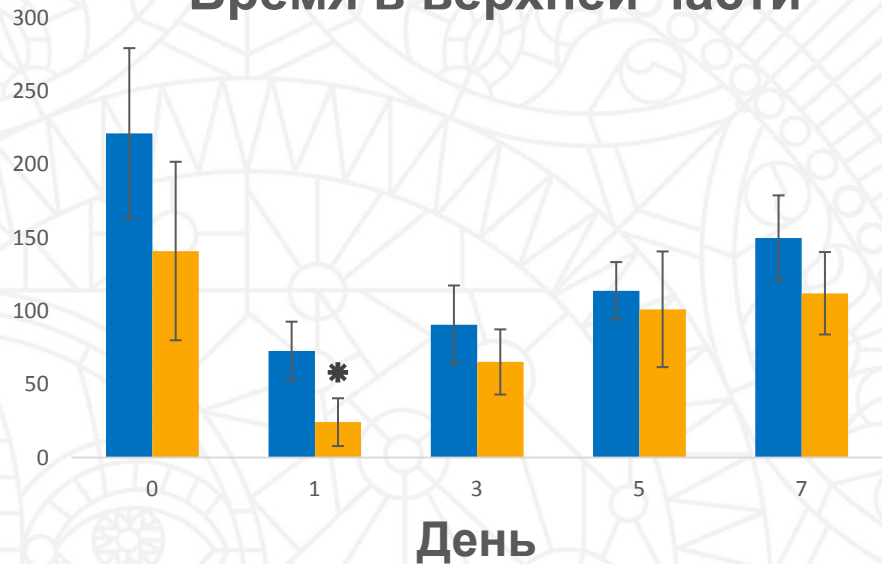
(n) Частота фризинга



* - $p < 0.05$,
** - $p < 0.01$

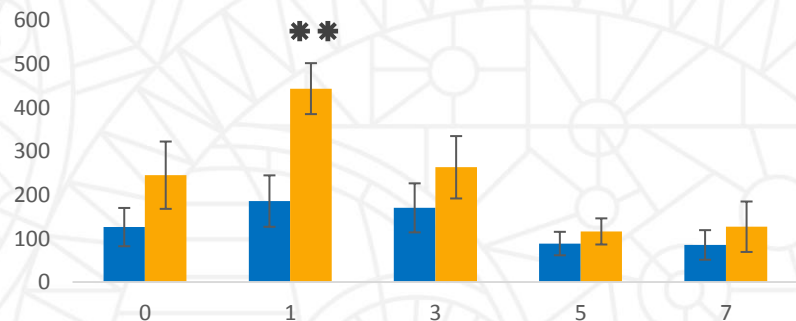
Тревожное поведение

(с) **Время в верхней части**



* - $p < 0.05$,
** - $p < 0.01$

(с) **Латентный период первого перехода**



■ Sham ■ TBI

Выводы

- ЧМТ, индуцированная лазерным облучением, сопровождается выраженным дефицитом локомоторной активности экспериментальных животных в первые трое суток.
- Травма головного мозга вызывает увеличение экспрессии белка NeuN в день травматического воздействия. В дальнейшем наблюдается его резкое снижение с восстановлением на 7 день.
- Травматическое воздействие резко снижает экспрессию BDNF в первые сутки, с последующим ее увеличением и достижением максимума на 3 день, восстановлением до значений в контрольных группах на 5 и 7 сутки.
- ЧМТ сопровождается увеличением уровней экспрессии HIF1A и восстановлением на 7 день после лазер-индуцированной травмы.

Благодарности

Авторы выражают глубокую признательность научному консультанту А.В. Калугеву, благодарность Н. Маслову за создание лазерной установки, А. Баширзаде за проведение поведенческих тестирований и А.А. Акопян за проведение и обработку результатов иммуногистохимических исследований.



*

Работа выполнена при поддержке Российского
научного фонда (грант № 20-65-46006)

N*