

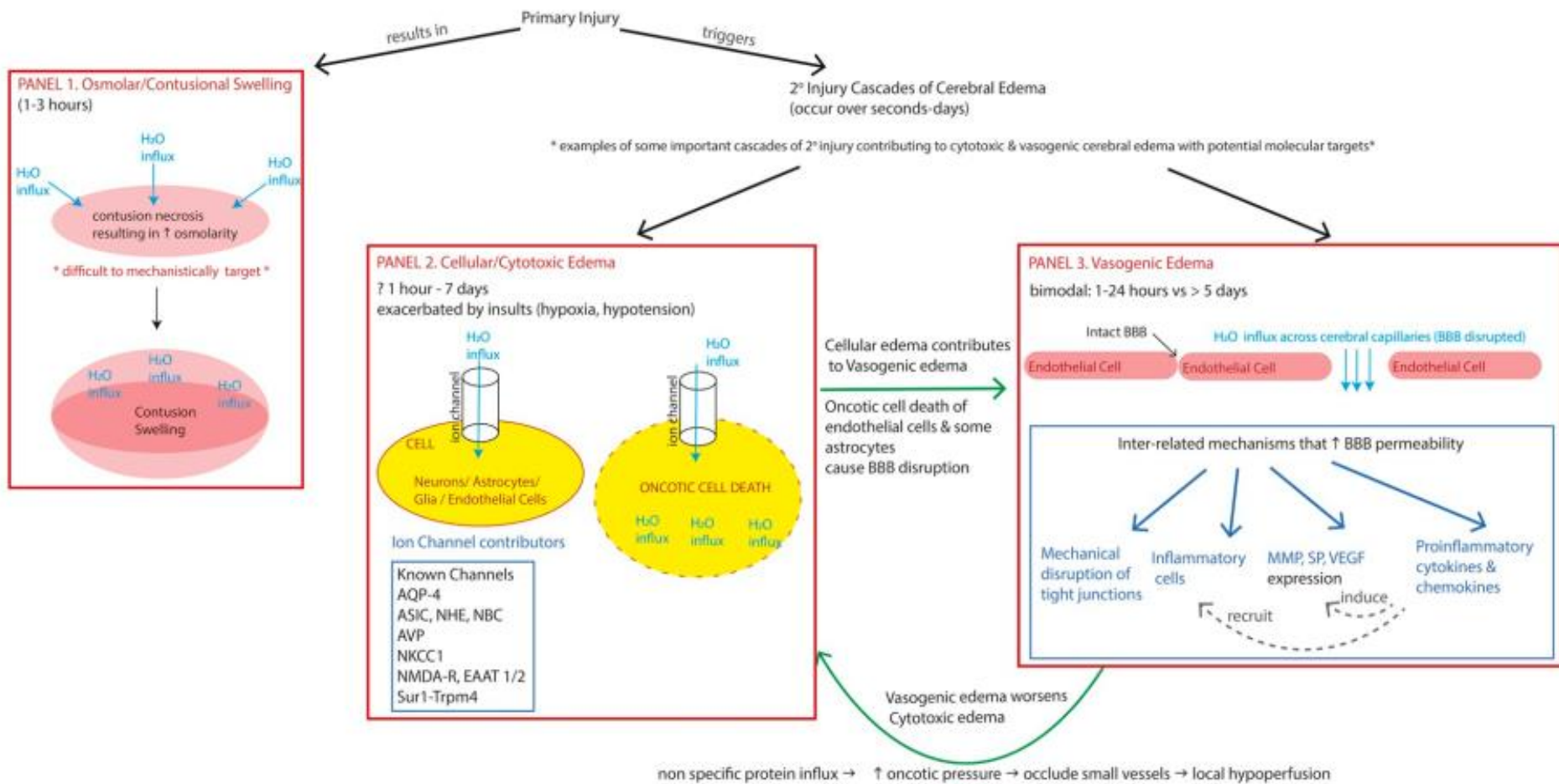
Моделирование отека головного мозга. Параметры для оценки фармакологической активности вещества.

Лычева Наталья Александровна, к.б.н., научный
сотрудник НОИ фармации им. К.М. Лакина ФГБОУ ВО
«Российский университет медицины» Минздрава
России

Актуальность

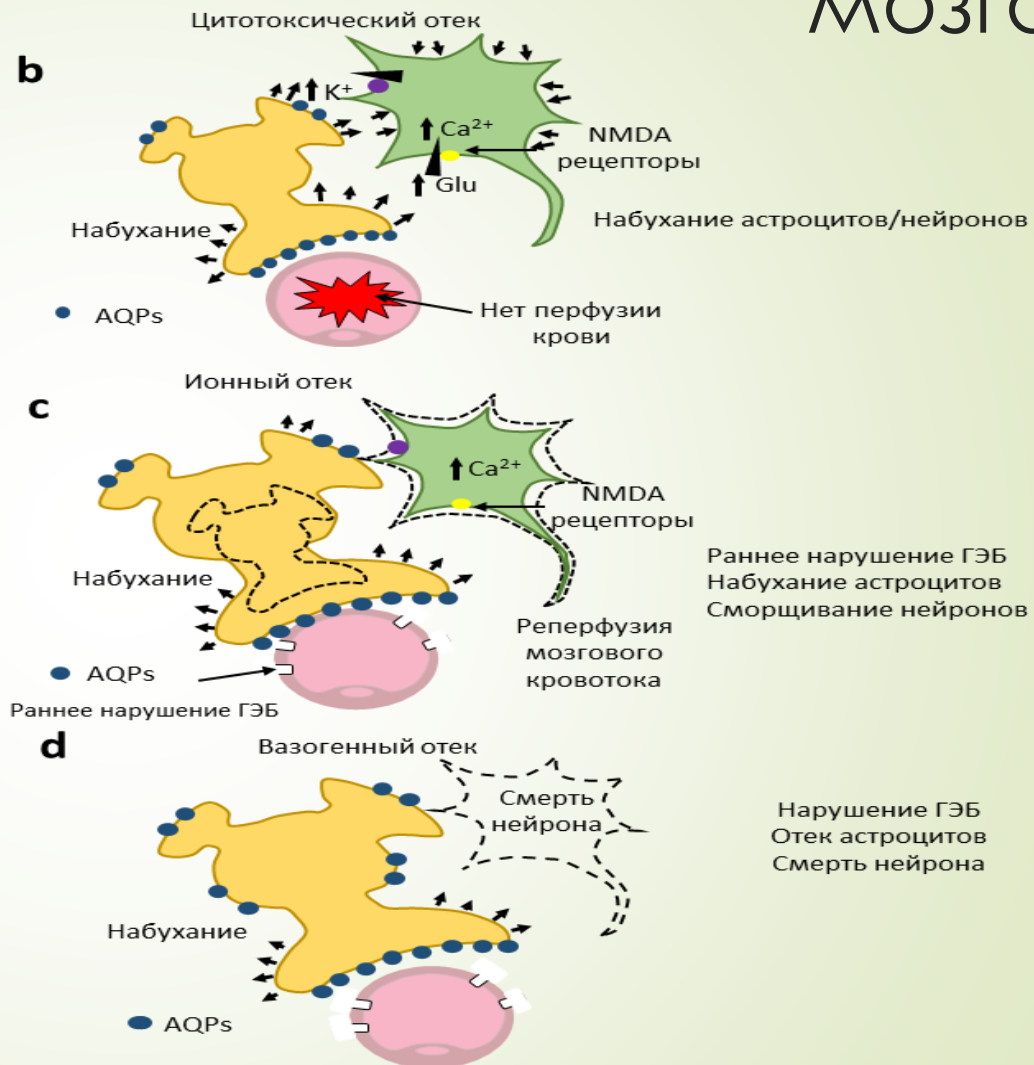
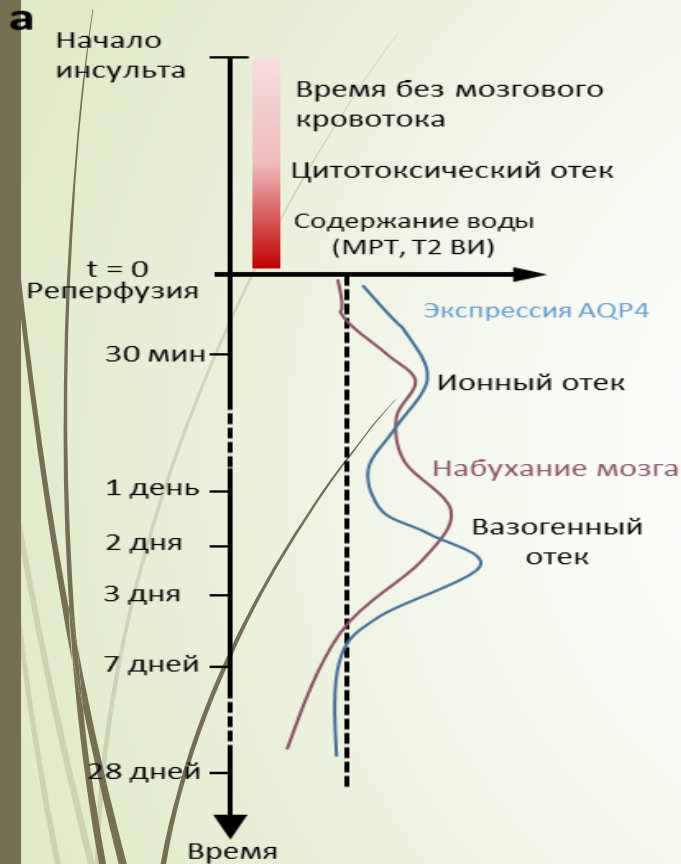
- Отек головного мозга и возникающая в результате внутричерепная гипертензия связаны с неблагоприятным прогнозом при ЧМТ. Отек головного мозга является ведущей причиной внутрибольничной летальности, встречающейся у >60% пациентов с массовыми поражениями и ~15% пациентов с нормальными начальными компьютерными томографическими изображениями [Jha R.M., 2019].
- Инсульт – основная причина смертности во всем мире. На ишемический инсульт приходится 69,6-70,8% всех инсультов. Смертность пациентов с острым ишемическим инсультом достигает 2,3-3,2% в течение последующего месяца [Feigin V.L., 2015, Wang W., 2017]

Черепно-мозговая травма



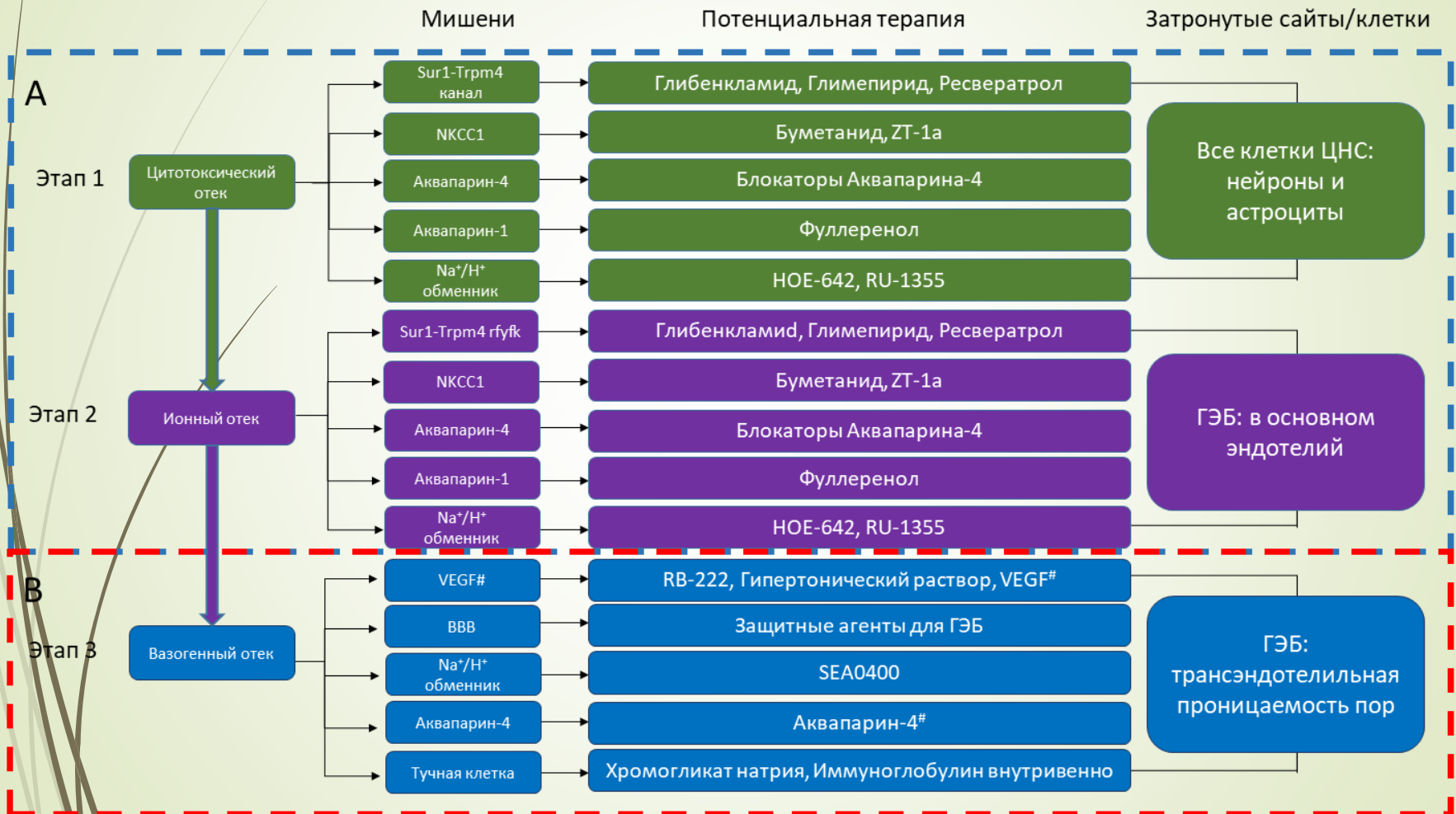
Ишемическое повреждение головного мозга

МОЗГ



Badaut J, Ashwal S, Obenaus A. Aquaporins in cerebrovascular disease: a target for treatment of b
 Cerebrovasc Dis. 2011;31(6):521-31.

Молекулярные мишени и противоотечная терапия



(A) Гематоэнцефалический барьер на этом этапе остается неизменным.

(B) Гематоэнцефалический барьер разрушается в этой фазе. [Yao Y., 2021]

Тест-система

- ▶ ЧМТ, крысы Wistar , питомник «Столбовая», 6 мес, диапазон массы тела 280-330, n=20 в каждой группе, по 10 животных на каждую временную точку.
- ▶ ОСМА , крысы Wistar , питомник «Столбовая», 6 мес, диапазон массы тела 250-330 , n=20 в каждой группе, по 10 животных на каждую временную точку.
- ▶ Интактные животные, n=20, по 10 животных для каждой модели патологии.

Моделирование патологии

- ЧМТ: у наркотизированного животного обривали кожу головы, скальпировали череп по стереотаксическим координатам устанавливали стандартную точку трепанационного отверстия (\varnothing 4 мм), после чего модифицированным мандрен-ножом повреждали ткани головного мозга (**левое полушарие**). Далее операционное поле обрабатывали антисептическим раствором, после чего проводили ушивание раны.
- Инсульт: интравазальная 90-минутная окклюзия средней мозговой артерии с реперфузией (**левое полушарие**). Выделяли сосудисто-нервный пучок. Лигатуры подвели под общую сонную (N1), под внутреннюю (N2) и 2 под наружную (№3 и №4)), их обратимо затягивают в порядке: 1, 2 и 4. Затем на наружной сонной артерии делали пункционное отверстие, в которое вставляли нейлоновый окклюдер таким образом, чтобы его покрытый силиконом конец, пройдя через бифуркацию, оказался во внутренней сонной артерии. Затем узел лигатуры №2 ослабили и, ориентируясь на метку (20 мм от конца, покрытого силиконом), окклюдер проводили далее по сосуду на расстояние 20-23 мм, после чего лигатуру №4 необратимо перевязали, а №3 затягивали обратимо, прочно фиксируя окклюдер. На раневую поверхность накладывали стерильный увлажняющий гель, препятствующий высыханию операционной поверхности. На завершающем этапе операции (через 90 минут) извлекали окклюдер с последовательным утягиванием всех оставшихся лигатур. Операционную рану ушивали хирургическим швом. В качестве окклюдера использовали монофиламент 4-0 (Prolene, Ethicon GmbH, Norderstedt, Germany).

Экспериментальная терапия

- ▶ Введение через 26 ч после формирования патологии
- ▶ Физиологический раствор, 11,56 мл/кг
- ▶ Маннитол, раствор для внутривенного введения, 150 г/л (1800 мг/кг* (11,56 мл/кг))
- доза 1,5-2 г/кг (эффективная доза согласно ИМП).

Препараты вводили в хвостовую вену со скоростью не превышающей 0,5–1,0 мл/мин, с использованием инфузионных насосов.

Оценка неврологического дефицита

- Неврологический дефицит у животных оценивали с использованием следующих шкал stroke-index McGraw в модификации И. В. Ганнушкиной (1996), 9-балльной шкале Combs и D'Alecy [Combs D. J., 1987] и шкале Garcia [Дайнеко А.С., 2014; Garcia J. H., 1995].
- По шкале McGraw регистрируют у животных наличие следующих симптомов: вялость, тремор, одно- и двусторонние полуптозы и птозы, манежные движения, парезы, параличи конечностей, коматозные состояния и летальные исходы. За каждый симптом присваивают балл (от 0,5 до 10), при наличии нескольких – баллы суммируют.
- Шкала Combs и D'Alecy позволяет выявить экстрапирамидные нарушения, включает в себя проведение тестов для оценки мышечной силы, цепкости-тяги и равновесия животных. Меньший суммарный балл соответствует более выраженным неврологическим нарушениям.
- По шкале Garcia определяли выраженность следующих показателей: мышечный тонус, двигательная активность, основные физиологические рефлексы, координация движений, чувствительность. По каждому тесту присваивали следующие баллы: 3 балла – норма, 2 балла – незначительное нарушение симметричности, 1–0 балла – выраженные нарушения или отсутствие движения.

Оценка неврологического дефицита

- Адгезивный тест выполняли по методике, подробно описанной в ряде работ [Bouet V., 2009], в качестве инородного предмета на волярную поверхность передних лап животного размещали квадратные отрезки лейкопластыря на тканевой основе (5 мм²).
- Нарушения координации движений оценивали в тесте «Rota-Rod» (установке производства ООО «Нейроботикс», Россия): фиксировали латентный период (ЛП) первого падения (время первого падения животного с вращающегося стержня) и суммарное время удержания крысы на вращающемся стержне за 3 попытки (максимальное время – 3 мин) [Bohlen M., 2009].
- Тест «открытое поле» (ОП), оценивали: выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов; уровень эмоционально-поведенческой реактивности животного; стратегию исследовательского/оборонительного поведения; симптомы неврологического дефицита. Тестируемое животное помещали в центр круглой белой арены хвостом к экспериментатору. Визуальный контроль за поведением проводили в течение 3-х минут, в ходе которого фиксировали следующие показатели: число пересеченных секторов, количество стоек (учитывали и закрытые и открытые стойки), количество обследованных отверстий-норок. Об ориентировочно-исследовательской активности судили по сумме стоек и заглядываний в отверстия, а по количеству пересеченных секторов – о спонтанной двигательной активности [Миронов А.Н., 2012].

Оценка эффективности лечения

- Проводили через 1 и 22 ч после прекращения введения плацебо/маннитола*.
- Оценка неврологического дефицита (шкалы, открытое поле, адгезивный тест, ротарод);
- Оценка резистентности мембран эритроцитов (кислотный и осмотический гемолиз);
- Оценка АД и ЧСС (системное АД оценивали в бедренной артерии с помощью программного комплекса Biopac Systems Inc., США. ЭКГ регистрировали во II стандартном отведении (компьютерный электрокардиограф «Поли-Спектр-8/В», Россия);
- Оценка мозгового кровотока (регистрировали по стереотаксическим координатам, в обоих полушариях в проекции средней мозговой артерии методом ультразвуковой доплерографии, прибор МИНИМАКС-Допплер СПб РФ/Biopac Systems Inc., США);
- Оценка содержания воды в ткани головного мозга (большие полушария рассекали на ипси- и контралатеральную (левую и правую) части, взвешивали и высушивали в термостате при 100°C в течение 24 часов для определения процентного содержания воды по формуле: $((\text{влажный вес} - \text{сухой вес}) / \text{влажный вес}) * 100\%$ [Wu G., 2011]).
- * неврологический дефицит также оценивали на этапе формирования патологии

Уровень неврологического дефицита по шкалам McGraw, "Combs & D'Alecy" и Garcia, показатели поведения в тестах Открытое поле, Ротарод и Адгезивном тесте через 24 часа после моделирования патологии ($M \pm m$)

	Модель патологии	Интактные	Патология	% от Интактных Животных
Шкала McGraw	ЧМТ	0±0	3,9±0,1 #	
	Ишемия	0±0	3,6±0,1 #	
Шкала "Combs & D'Alecy"	ЧМТ	18,0±0,0	12,4±0,2 #	-31%
	Ишемия	18±0,0	12,5±0,2 #	-31%
Шкала Garcia	ЧМТ	9,0±0,0	4,8±0,1 #	-47%
	Ишемия	9±0,0	5±0,1 #	-44%
Двигательная активность (открытое поле)	ЧМТ	33,5±1,5*	13,3±0,9 #	-60%
	Ишемия	38,2±1,3*	20,4±1,1 #	-47%
Исследовательская активность (открытое поле)	ЧМТ	10,7±0,8	1,5±0,1 #	-86%
	Ишемия	10,7±1,1	2,3±0,2 #	-79%
Время удержания, с (Ротарод)	ЧМТ	180,0±0,0	19,5±1,6 #	-89%
	Ишемия	180±0,0	30,1±2,9 #	-83%
Время обнаружения стикера, с (Адгезивный тест, левая лапа, ипсилатеральная поражению)	ЧМТ	27,8±2,3	65,3±5,8 #	135%
	Ишемия	16,9±3,2*	82,7±5,6 #	389%
Время обнаружения стикера, с (Адгезивный тест, правая лапа, контралатеральная поражению)	ЧМТ	26,1±1,6	160,0±3,3 #	513%
	Ишемия	16±2,9*	147,9±3,4 #	824%

Уровень неврологического дефицита по шкалам McGraw, "Combs & D'Alecy" и Garcia, показатели поведения в тестах Открытое поле, Ротарод и Адгезивном тесте, через 22 часа после лечения ($M \pm m$), $n=10$

	Модель патологии	Интакт	Патология	Отек + Плацебо	Отек + Маннитол
Шкала McGraw	ЧМТ	0±0	3,9±0,1	2,5±0,5#	1,8±0,7#
	Ишемия	0±0	3,6±0,1	2,2±0,4#	1,6±0,5#
Шкала "Combs & D'Alecy"	ЧМТ	18,0±0,0	12,4±0,2	7,0±0,3#	8,1±0,5#
	Ишемия	18±0,0	12,5±0,2	13,6±0,73#	14,6±0,65#
Шкала Garcia	ЧМТ	9,0±0,0	4,8±0,1	13,2±0,7#	13,9±0,6#
	Ишемия	9±0,0	5±0,1	5,5±0,32#	6,1±0,34#
Двигательная активность (открытое поле)	ЧМТ	33,5±1,5	13,3±0,9	14,6±1,8#	22,1±4,2#
	Ишемия	38,2±1,3	20,4±1,1	18,0±2,9#	26,2±2,9#
Исследовательская активность (открытое поле)	ЧМТ	10,7±0,8	1,5±0,1	2,3±0,8#	4,6±0,8#
	Ишемия	10,7±1,1	2,3±0,2	2,1±0,5#	3,3±0,7#
Время удержания, с (Ротарод)	ЧМТ	180,0±0,0	19,5±1,6	41,2±4,1#	67,2±4,8#*
	Ишемия	180±0,0	30,1±2,9	45,1±6,0#	88,4±11,7#*
Время обнаружения стикера, с (Адгезивный тест, левая лапа, ипсилатеральная поражению)	ЧМТ	27,8±2,3	65,3±5,8	43,9±8,8#	30,9±10,9#
	Ишемия	16,9±3,2	82,7±5,6	44±10,7#	39,1±10,7#
Время обнаружения стикера, с (Адгезивный тест, правая лапа, контралатеральная поражению)	ЧМТ	26,1±1,6	160,0±3,3	111±17,8#	92,0±21,4#
	Ишемия	16±2,9	147,9±3,4	137,3±11,7#	98,3±14,0#

– различия статистически значимы в сравнении с группой «Интакт»; * – различия статистически значимы в сравнении с группой «Отек + Плацебо»

Уровень мозгового кровотока в бассейне средней мозговой артерии левого и правого полушария ($M \pm m$), $n=10$

Патология	Гемисфера	Время оценки	Интакт	Отек Плацебо +	Отек Маннитол +
ЧМТ	Левая гемисфера	Через 1 ч после лечения	5,0±0,2	3,2±0,2#	3,4±0,2#
		Через 22 ч после лечения		3,0±0,4#	3,8±0,2#
	Правая гемисфера	Через 1 ч после лечения	5,1±0,3	4,4±0,2	4,5±0,2
		Через 22 ч после лечения		4,1±0,2	4,6±0,2
Ишемия	Левая гемисфера	Через 1 ч после лечения	4,5±0,19	2,7±0,25#	2,8±0,29#
		Через 22 ч после лечения		3,1±0,27#	3,2±0,32#
	Правая гемисфера	Через 1 ч после лечения	4,6±0,16	3,8±0,23#	3,9±0,32#
		Через 22 ч после лечения		4,1±0,29	4,3±0,29

– различия статистически значимы в сравнении с группой «Интакт»;

* - различия статистически значимы в сравнении с группой «Отек+Плацебо»;

Параметры артериального давления, ЧСС, осмотической резистентности эритроцитов

	Модель	Интактыные	Через 1 ч после лечения		Через 22 ч после лечения	
			Отек+Плацебо	Отек+Маннитол	Отек+Плацебо	Отек+Маннитол
САД	ЧМТ	96,0±3,7	91,7±3,8	94,3±3,7	94,9±3,9	92,8±4,5
	Ишемия	93,5±3,0	99,6±2,9	102,7±3,9	94,7±3,5	98,5±2,9
ДАД	ЧМТ	64,1±3,2	63,6±2,5	65,7±2,5	64,3±3,4	64,3±2,8
	Ишемия	64,8±2,6	69,3±2,7	75,8±3,5	68,3±2,7	74,9±3,1
ЧСС	ЧМТ	379,3±12,9	390,9±15,3	392,5±20,3	366,9±22,6	361,3±22,5
	Ишемия	350,5±15,6	348,5±15,5	364,2±16,3	352,9±10,2	362,0±14,9
Концентрация NaCl, приводящая к 90% осмотическому гемолизу, %	ЧМТ	0,33±0,02	0,42±0,02	0,38±0,04	0,40±0,02	0,36±0,03
	Ишемия	0,33±0,03	0,39±0,03#	0,38±0,02	0,40±0,02#	0,38±0,01

Содержание воды в левой (пораженной) и правой гемисфере головного мозга ($M \pm m$), $n=10$

	Модель	Интактные	Через 1 ч после лечения		Через 22 ч после лечения	
			Отек+Плацебо	Отек+Маннитол	Отек+Плацебо	Отек+Маннитол
Левая гемисфера (пораженная)	ЧМТ	77,2±0,0	79,6±0,2#	78,9±0,2#*	80,6±0,2#	79,3±0,2#*
	Ишемия	77,2±0,3	82,4±0,4#	80,7±0,3#*	81,9±0,4#	80,5±0,2#*
Правая гемисфера	ЧМТ	77,2±0,0	78,2±0,1#	77,9±0,1#	78,6±0,2#	77,9±0,2#*
	Ишемия	77,3±0,2	79,6±0,3#	79,2±0,2#	79,5±0,2#	79,1±0,2#
Разница в содержании воды в левой и правой гемисфере, Δ%	ЧМТ	0,0±0,0	1,3±0,1#	1,0±0,1#	2,0±0,1#	1,4±0,1#*
	Ишемия	-0,1±0,1	2,8±0,2#	1,5±0,2#*	2,4±0,3#	1,4±0,1#*

– различия статистически значимы в сравнении с группой «Интакт»;

* – различия статистически значимы в сравнении с соответствующей группой «Отек+Плацебо» (через 1 час и через 22 часа после лечения).

ВЫВОДЫ

- ▶ Для оценки неврологического дефицита у экспериментальных животных при моделировании отека мозга являются релевантными: шкалы McGraw, "Combs & D'Alecy" и Garcia, Открытое поле, **ротарод и адгезивный тест** (показано наибольшее отклонение параметров);
- ▶ Оценка неврологического дефицита по указанным параметрам **не целесообразна через 1 ч после проведенного лечения;**
- ▶ Через 24 ч после проведенного лечения осмотическим препаратом значимые изменения регистрировались только в тесте **ротарод;**
- ▶ Уровень мозгового кровотока **не изменялся** при введении осмотического препарата;
- ▶ Параметры АД, ЧСС, осмотической резистентности эритроцитов **не являются релевантными** для оценки состояния животных и действия осмотического препарата при экспериментальном отеке головного мозга на моделях ЧМТ и ОСМА;
- ▶ Содержание воды в пораженной гемисфере **значимо изменяется** через 1 ч после введения осмотического препарата.



Спасибо за внимание!

natalia.lycheva@yandex.ru