

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

**Моделирование контузионных травм центральной нервной системы как
метод изучения терапевтического эффекта фотостимуляции**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки магистратуры 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Колабуховой Анастасии Дмитриевны

Научный руководитель

доцент, канд. биол. наук

Т.Д. Искра

(подпись, дата)

Зав. кафедры

доцент, док. биол. наук

О. В. Семячкина–Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2025

ВВЕДЕНИЕ

Разработка подходящей животной модели является важнейшим аспектом решения биомедицинских задач.

Одной из проблемных областей биомедицинских исследований является изучение контузионных повреждений центральной нервной системы, которое представляет собой состояние, возникающее в результате силового воздействия и проникающих травм. Травмы центральной нервной системы характеризуются высоким уровнем летальности, часто приводят к когнитивным нарушениям и значительно ухудшают качество жизни пациентов.

В лечении и регуляции патологий головного мозга в последние годы широко применяется фотостимуляция также известная как низкоуровневая светотерапия. В настоящий момент подробно изучаются механизмы влияния фотостимуляции на функционирование центральной нервной системы. Для более глубокого изучения механизмов фото-лечения необходим новый подход к созданию моделей заболеваний, в том числе контузионных повреждений.

Поиск эффективных и доступных способов восстановления при данной патологии остаётся одной из главных задач современной медицины, для решения которой необходима животная модель, позволяющая изучить новые методы терапии эффективные для человека.

Целью данной работы являлось создание метода моделирования контузионных травм центральной нервной системы (головного и спинного мозга) для изучения терапевтического эффекта фотостимуляции.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Смоделировать контузионную травму спинного мозга мышей с помощью установки для контролируемого кортикального удара.

2. Изучить эффективность применения установки для контролируемого кортикального удара при создании модели контузионной травмы головного мозга мышей.

3. Изучить терапевтическое влияние фотостимуляции на восстановление нервной ткани при контузионных травмах центральной нервной системы с помощью конфокального, иммуногистохимического, гистологического исследований и *in vivo* мониторинга распределения FITC-декстрана 70 кДа по ликворной системе спинного мозга мышей.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Использование животных моделей сыграло важнейшую роль в развитии научных исследований. Спустя века роль животных моделей вышла за рамки анатомических исследований и стала охватывать широкий спектр экспериментов, включая доклинические испытания для тестирования лекарственных препаратов, хирургических устройств и даже продуктов косметологии. Это привело к тому, что индустрия исследований животных стала рынком с оборотом в миллиард долларов, и теперь компании здравоохранения полагаются на модели животных для оценки безопасности, токсичности и эффективности препаратов и методик до их использования на людях [1].

Доклинические исследования на животных внесли большой вклад в наше понимание многочисленных заболеваний человека и продолжают помогать находить методы и разработки для изучения различных биохимических и физиологических процессов, поведенческих последствий различных заболеваний, а также для тестирования новых фармакотерапевтических вмешательств [2].

Одной из самых широких и проблемных областей биомедицинских исследований является изучение контузионных повреждений центральной нервной системы.

Контузионное повреждение спинного мозга – это нарушение целостности структур спинного мозга (от большого затылочного отверстия до конского хвоста). От травм спинного мозга страдают около 40 миллионов человек во всём мире ежегодно. Большинство из них — молодые мужчины в возрасте от 20 до 35 лет, 1% этой группы населения составляют дети [3].

Контузионные травмы спинного мозга приводят к инвалидности и часто к летальному исходу [4, 5]. Выживаемость и вероятность реабилитации после полученной травмы зависит от степени повреждения структур [5].

Черепно-мозговая травма (контузионная травма головного мозга) – это разрушение структур внутричерепных образований (головного мозга,

мозговых оболочек, сосудов, черепно-мозговых нервов), вызванное механическим повреждением черепа [6].

Черепно-мозговая травма составляет 30-40% в структуре травм и занимает первое место среди причин инвалидности населения и временной нетрудоспособности, а среди причин смерти людей активного возраста опережает даже сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, при чем травм черепа с каждым годом становятся все больше [7].

Ведущими причинами ЧМТ являются автодорожный травматизм и бытовая травма. Среди пострадавших мужчин в 2,5 раза больше, чем женщин [8].

В лечении и регуляции заболеваний головного мозга в последние годы широко применяется фотостимуляция также известная как низкоуровневая светотерапия [9].

Одним из наиболее изученных молекулярных механизмов фотостимуляции является то, что цитохром-с-оксидаза может диссоциировать ингибирующий оксид азота после поглощения фотонов, тем самым усиливая митохондриальную активность и способствуя биосинтезу аденозинтрифосфата (АТФ). Поскольку заболевания головного мозга тесно связаны с активностью митохондрий, фотобиомодуляция может оказывать благотворное влияние на различные заболевания головного мозга. За последние два десятилетия огромное количество доклинических экспериментов на животных и клинических испытаний на людях продемонстрировали полезные эффекты. Клинические испытания на людях включают, в частности, лечение ишемического инсульта, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, черепно-мозговая травма, депрессия, старение и так далее [9].

Материалы исследования

В качестве объекта исследования при моделировании контузионной травмы спинного и головного мозга использовались половозрелые, молодые самцы мышей BALB/c (20-25 гр.) и C57bl/6 (20-25 гр.) соответственно,

которые были предоставлены питомником лабораторных животных г. Пушино. Животные содержались в стандартных условиях вивария научного медицинского центра ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» при температуре 25 ± 2 °С, 55% влажности и 12/12 часовом цикле свет / темнота. Экспериментальные протоколы утверждены локальной этической комиссией (Приказ 35-В от 11.03.2022 г.) ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского».

При моделировании контузионной травмы спинного и головного мозга животные были разделены на следующие группы:

1. мыши с контузионной травмой головного и спинного мозга без фототерапии $n=10$ в каждой группе;
2. мыши с контузионной травмой головного и спинного мозга с фототерапией $n=10$ в каждой группе;
3. мыши контрольной группы с интактным головным и спинным мозгом $n=10$ в каждой группе.

Для проведения моделирования контузионных травм центральной нервной системы применялось устройство для контролируемого кортикального удара.

Методы исследования

После моделирования контузионных повреждений были проведены следующие исследования: проведение фотостимуляции с использованием светодиода с длиной волны 1050 нм, введение красителя в большую мозговую цистерну, конфокальный и иммуногистохимический анализ срезов спинного мозга, конфокальный анализ лимфодренажных процессов головного мозга, гистологический анализ, макроскопическое исследование и статистический анализ.

Результаты исследования

Моделирование контузионной травмы спинного мозга у мышей

Для создания модели контузионной травмы у мышей ($n = 10$)

применяли модифицированный на базе лаборатории «Умный сон» метод на основе имеющегося в продаже механизма для контролируемого кортикального удара

Ламинэктомия была выполнена на позвонках Т9-11, и спинной мозг в области Т10 повреждали с помощью 5-граммового металлического стержня, сброшенного с высоты 10 мм, с помощью разработанной установки.

После травматизации спинного мозга, на мышцу и кожу накладывали хирургические швы, шов обрабатывали раствором 1% бриллиантового зеленого (ООО «Женел Трейд», Россия).

С целью определения наличия травмы были проведены иммуногистохимический и конфокальный анализ спинного мозга.

Данное исследование выявило наличие чётких LYVE-1-позитивных структур в тканях неповрежденного спинного мозга мышей. В модели контузионной травмы спинного мозга наблюдалось нарушение целостности LYVE-1-позитивных структур, что указывает на наличие травматического повреждения.

Для подтверждения наличия травмы также был проведен конфокальный анализ образцов интактного спинного мозга мыши и с контузионной травмой с окраской астроцитов и ядер клеток и гистологический анализ.

Данное исследование выявило отсутствие чётких структур в тканях спинного мозга после травматизации по сравнению с контролем, что свидетельствует о разрушении клеток, вследствие чего наблюдалась интенсивная окраска их ядер.

После повреждения наблюдалось разрушение тканей спинного мозга в области нанесения контузии с выраженным периваскулярным и перицеллюлярным отеками по сравнению с контролем.

Гистологическое исследование показало, что контузионная травма спинного мозга приводила к разрушению нейронных связей и геморрагиям в месте повреждения. Стрелками на гистологических срезах обозначены очаги

повреждения.

Дополнительно для подтверждения наличия травматического повреждения спинного мозга была проведена оценка состояния функции гематоэнцефалического барьера, для чего проводилось конфокальное исследование с применением красителя *Evans Blue* у мышей в следующих группах: контрольная группа с интактным спинным мозгом; группа с контузионной травмой спинного мозга (n=10 в каждой группе).

Результаты показали, что после травмы спинного мозга наблюдалась интенсивная экстравазация *Evans Blue* из церебральных сосудов в его ткани по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует о нарушении функции гематоэнцефалического барьера в связи с разрушением его структур после контузионного повреждения спинного мозга.

Таким образом, проведенные иммуногистохимические, конфокальные и гистологические исследования подтверждают наличие травматического повреждения спинного мозга у исследуемой группы (n=10), что свидетельствует об успешности используемого метода моделирования контузионной травмы спинного мозга у мышей.

Моделирование контузионной травмы головного мозга у мышей

Для создания модели контузионной травмы головного мозга у мышей (n = 10) применяли модифицированный на базе лаборатории «Умный сон» метод на основе имеющегося в продаже механизма для контролируемого кортикального удара. Производили травматизацию головного мозга в области височной кости, на расстоянии 3 мм от глаза мыши с помощью разработанной установки.

Для подтверждения наличия черепно-мозговой травмы было проведено макроскопическое исследование сагиттальных срезов тканей головного мозга мышей до и после контузионной травмы.

Данное исследование выявило наличие геморрагий и отека в области травмы, что подтверждает наличие травматического повреждения головного мозга у мышей. Результаты исследования свидетельствуют об

эффективности используемой установки при моделировании контузионных травм головного мозга.

Для подтверждения наличия черепно-мозговой травмы было проведено исследование гистологических срезов тканей головного мозга мышей до и после контузионной травмы.

Изучение терапевтического воздействия фотостимуляции на ткани центральной нервной системы в контузионных моделях

При исследовании терапевтического влияния фотостимуляции при контузионных травмах спинного мозга было использовано 3 группы животных (n=10 в каждой группе).

Для оценки терапевтического эффекта фотостимуляции в режиме реального времени изучалось распределение FITC-декстрана 70 кДа по ликворной системе спинного мозга через 3 часа после его введения в большую мозговую цистерну.

В ходе исследования было выявлено, что после фотолечения мышей с контузионной травмой степень распределения красителя спинном мозге значительно повысилась, по сравнению с распределением красителя у мышей с контузионной травмы без фотостимуляции.

Интенсивность сигнала FITC-декстрана в группах с травматическим повреждением спинного мозга статистически ниже, чем в контрольной группе и группе, получающей фото-лечение. Это обусловлено тем, что травма спинного мозга сопровождалась существенным ухудшением лимфодренажных процессов, что приводило к незначительному распределению красителя в периваскулярных пространствах спинного мозга по сравнению с контролем.

Курс фототерапии в течение 10 дней существенно улучшал лимфодренажную функцию спинного мозга мышей после контузионной травмы. В группе животных, получающих фототерапию распределение FITC-декстрана 70 кДа по тканям спинного мозга, было статистически значительно выше, чем у мышей без лечения.

Среднее значение интенсивности сигнала FITC-декстрана в группе контроля составил 3,9 условных единиц, в группе с травмой без лечения и в группе с травмой и курсом фототерапии 0,4 и 2,1 условных единиц соответственно.

Для определения влияния фотостимуляции на восстановление функции гематоэнцефалического барьера спинного мозга было проведено конфокальное исследование спинного мозга с использованием красителя *Evans Blue*, который вводился в кровоток всем исследуемым группам (n=10 в каждой группе).

Результаты показали, что после травмы спинного мозга наблюдалась интенсивная экстравазация *Evans Blue* из церебральных сосудов в его ткани без восстановления функции гематоэнцефалического барьера при отсутствии фотостимуляции. Фототерапия в течение 10 дней приводила к восстановлению проницаемости ГЭБ, в силу чего содержание красителя *Evans Blue* в группе мышей, получающих фото-лечение, не имело статистически значимых отличий от контроля.

Средние значения содержания красителя в тканях спинного мозга мышей в группе с фотостимуляцией после травматического повреждения и в контрольной группе не имели существенных различий. В группе с травмой без лечения среднее значение содержания красителя составило 4 мкг/г.

Таким образом, данное исследование показывает возможность восстановления функций гематоэнцефалического после 10-дневного курса фотостимуляции в используемой модели.

Для изучения влияния фотостимуляции на ткани спинного мозга при контузионной травме был проведён гистологический анализ тканей. Оценку состояния тканей осуществляли с применением медицинского микровизора (Vizo-103, LOMO, Россия).

Результаты гистологических исследований показали, что контузионная травма спинного мозга приводила к разрушению нейронных связей и геморрагиям в месте повреждения. На гистологических срезах обозначены

очаги повреждения. На срезах заметны изменения после фототерапии в виде уменьшенной площади поражения.

У мышей после фотолечения не наблюдалось периваскулярной эдемы, что свидетельствует как об активации лимфодренажных процессов в спинном мозге, так и о стабилизации его барьерной функции.

Таким образом, проведенные конфокальные, иммуногистохимические и гистологические исследования подтверждают вероятность восстановления тканей спинного мозга и функций гематоэнцефалического барьера после 10-дневного курса фотостимуляции в модели.

Гистологическое исследование выявило нарушение целостности тканей головного мозга, разрушение нейронных связей, наличие геморрагий и образование в области контузии отёка, обусловленного экстравазацией крови в ближайшие к области травмы ткани по сравнению с контрольной группой.

Результаты анализа сагиттальных срезов головного мозга и гистологических исследований подтверждают наличие травматического повреждения головного мозга у испытуемой группы (n=10), что свидетельствует об успешном моделировании контузионной черепно-мозговой травмы с помощью установки, разработанной на базе лаборатории «Умный сон».

Результаты гистологических исследований показали, что при контузионной травме наблюдается разрушение тканей мозга, образование геморрагий и развитие отёка в следствие экстравазации крови в прилежащие ткани к области травматического повреждения. После фотостимуляции наблюдаются уменьшение площади травмы и отёка.

Таким образом, конфокальные и гистологические исследования подтверждают вероятность восстановления тканей и лимфодренажной функции оболочек головного мозга после 10-дневного курса фотостимуляции в используемой модели.

ВЫВОДЫ

1. Было проведено успешное моделирование контузионной травмы спинного мозга с помощью установки для контролируемого кортикального удара.

2. Была доказана эффективность использования установки для контролируемого кортикального удара при моделировании контузионной травмы головного мозга.

Представленные модели являются доступными, эффективными и могут быть использованы в биомедицинских исследованиях, связанных с травматическими повреждениями центральной нервной системы, в доклинических испытаниях фармакологических препаратов и методов лечения контузионных травм центральной нервной системы.

3. Выявлено терапевтическое влияние фотостимуляции на восстановление нервной ткани в разработанных моделях контузионных травм, подтвержденное конфокальными, иммуногистохимическими, гистологическими исследованиями и *in vivo* мониторингом распределения FITC-декстрана 70 кДа.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Seifalian, A. The use of animal models in preclinical investigations for the development of a surgical mesh for pelvic organ prolapse / A. Seifalian, A. Digesu, V. Khullar // *IntUrogynecol J.* – 2024. – V. 35, № 4. – P. 741-758.
- 2 Khan, A. In vitro and in vivo models for the study of urolithiasis / A. Khan // *Urologia.* – 2018. – V. 85, № 4. – P. 145-149.
- 3 Yip, P.K. Spinal cord trauma and the molecular point of no return. / P.K. Yip, A. Malaspina // *Mol Neurodegener.* – 2012/ - V. 7, № 6.
- 4 Rehabilitation of spinal cord injuries / K. Nas [et al.] // *World J Orthop.* – 2015. – V. 6, № 1. – P. 8-16.
- 5 Life expectancy after spinal cord injury: a 50-year study / J.W. Middleton [et al.] // *Spinal Cord.* – 2012. – V. 50, № 11. – P. 803-811.
- 6 Бурова, В.С. Эпидемиология черепно-мозговых травм среди взрослого населения города Ижевска / В.С. Бурова, Н.А. Денисов, Н.М. Попова // *Международный журнал гуманитарных и естественных наук.* – 2024. – Т. 10-2, № 97 – С. 15-17.
- 7 Содержание цитокинов у детей с поражением центральной нервной системы / А.И. Аутеншлюс [и др.] // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* – 2003. – Т. 103, № 3. – С. 52- 54.
- 8 Хетагурова, А.К. Медико-социальные аспекты травматизма в Тюменской области / А.К. Хетагурова, О.В. Галиулина // *современные подходы к совершенствованию травматологической помощи // Сестринское дело.* – 2008. – №8. – С. 14-18.
- 9 Dose–effect relationships for PBM in the treatment of Alzheimer’s disease / R. Zhang [et al.] // *J. Phys. D: Appl. Phys.* – 2021. – V. 54, № 35.