

Изготовление электрокортикографического датчика и методика его имплантации крысам для долговременного мониторинга мозговой активности

А.А. Ховпачев^{1*}, М.С. Вахвияйнен², В.А. Башарин¹, С.В. Чепур²,
М.А. Луцык¹, Е.В. Никульшина¹, Р.Д. Голосов²

¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России, Санкт-Петербург, Россия,

² ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны России, Санкт-Петербург, Россия

* E-mail: vtmz@vmeda.org

Резюме. Электрокортикография у крыс обладает широкими показаниями к применению в биомедицинских исследованиях. Это связано с высоким трансляционным потенциалом от грызунов к человеку, установленным при сравнительной экспериментальной электрокортикографии в условиях действия широкого спектра нейротропных веществ. В работе представлены особенности и техника изготовления электрокортикографического датчика, а также методика его имплантации крысам. Выполнена экспериментальная апробация датчика по показателям валидности получаемого сигнала в условиях введения нейротропных фармакологических зондов: стрихнина, коразола, цианида натрия, тилетамина с золазепамом, ксилазина, дексметомедина и диизопропилфенола. По этиологическим и патоморфологическим критериям оценена переносимость крысами размещения конструкции в черепной коробке. Установлено, что конструкция датчика и методика его имплантации безопасны и эффективны для долговременного мониторинга в условиях свободного передвижения. Соответствие получаемых данных ожидаемым и высокое качество по соотношению сигнал/шум позволяют рассматривать сигнал с датчика как валидный и диагностически ценный. Конструкция хорошо переносится крысами и не вызывает выраженных гистоморфологических изменений в области прилегания электродов к коре мозга в течение 90 сут после имплантации.

Ключевые слова: электрокортикография, трепания, крысы, датчик, фармакологический скрининг

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Ховпачев А.А., Вахвияйнен М.С., Башарин В.А., Чепур С.В., Луцык М.А., Никульшина Е.В., Голосов Р.Д. Изготовление электрокортикографического датчика и методика его имплантации крысам для долговременного мониторинга мозговой активности. Лабораторные животные для научных исследований. 2024; 2. 00–00. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2024-02-04>.

Original article

Manufacturing of an electrocardiographic sensor and its implantation technique in rats for long-term monitoring of brain activity

А.А. Khovpachev^{1*}, M.S. Vakhviyainen², V.A. Basharin¹, S.V. Chepur²,
M.A. Lutsyk¹, E.V. Nikulshina¹, R.D. Golosov²

¹ Federal state budgetary military educational institution of higher education “Military Medical Academy named after S.M. Kirov” of the Ministry of defence of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia,

² Federal State Budgetary Institution “State Research Testing Institute of Military Medicine” Ministry of Defense of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

* E-mail: vtmz@vmeda.org

© Ховпачев А.А., Вахвияйнен М.С., Башарин В.А., Чепур С.В., Луцык М.А., Никульшина Е.В., Голосов Р.Д., 2024

Abstract. Electroencephalography in rats has broad indications for use in biomedical research. This is due to the high translational potential from rodents to humans, established by comparative experimental electroencephalography under the action of a wide range of neurotropic substances. The paper presents the features and technique of manufacturing an electroencephalographic sensor, as well as the technique of its implantation in rats. The sensor was experimentally tested according to the validity of the received signal under the conditions of administration of neurotropic pharmacological probes: strychnine, corazole, sodium cyanide, tiletamine with zolazepam, xylazine, dexmedetomidin and diisopropylphenol. According to ethological and pathomorphological criteria, the tolerability of the structure in the skull by rats was assessed. It has been established that the design of the sensor and the technique of its implantation in rats are safe and effective for long-term monitoring in conditions of free movement. The correspondence of the received data to the expected ones and the high quality of the signal-to-noise ratio make it possible to consider the signal from the sensor as valid and diagnostically valuable. The design is well tolerated by rats and does not cause pronounced changes in the histomorphological picture of the brain in the area of electrode attachment to the cortex for 90 days after implantation.

Keywords: electroencephalography, trepanation, rats, sensor, pharmacological screening

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

For citation: Khovpachev A.A., Vakhviyainen M.S., Basharin V.A., Chepur S.V., Lutsyk M.A., Nikulshina E.V., Golosov R.D. Manufacturing of an electroencephalographic sensor and its implantation technique in rats for long-term monitoring of brain activity. *Laboratory Animals for Science*. 2024; 2. 00–00. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2024-02-04>.

Введение

Ключевым этапом скрининга эффективности и безопасности новых нейротропных соединений признаны доклинические испытания с применением регламентированного количества видов лабораторных животных. С каждым годом возрастает количество научных работ, сообщающих о высоком трансляционном потенциале нейробиологического инструмента, опирающегося на получение электрического сигнала с коры головного мозга посредством эпидуральной электроэнцефалографии (ЭЭГ). С этой позиции приемлемой тест-системой для экстраполяции данных на человека считают крыс и предполагают, что использование ЭЭГ позволит повысить информативность результатов экспериментов, нацеленных на изучение эффективности и токсичности новых нейротропных соединений [1, 2]. Цели регистрации ЭЭГ у крыс весьма различны. Это и изучение нормальной физиологии мозга, сенсорных систем, проводящих путей, и фармако-ЭЭГ, и моделирование физических и химических воздействий, а также поиск средств коррекции возникающей вследствие этого патологии, и изучение концепций психиатрических заболеваний, пограничных состояний, неврозов и др. [3, 4]. Поэтому использование накопленных научных знаний о нормальной физиологии мозга и электрофизиологических коррелятах патологических состояний позволит провести адекватную стандартизацию подхода и в будущем, согласно принципу 3R, сократить количество испытаний на лабораторных животных без потери надежности результатов.

Однако есть ряд сложностей в создании экспериментальных ЭЭГ-моделей. Последние возникают по причине ограниченной доступности изготавливаемых промышленностью ЭЭГ-

датчиков, особенно для отечественных исследователей, а также вследствие значительной трудоемкости их имплантации в череп животных [4]. Вместе с тем хроническое использование имплантированных в череп электродов сопряжено с дополнительной травматизацией и, как следствие, с формированием искажающего сигнала глиального рубца, со скрытой ликвореей и гнойно-септическими осложнениями [5, 6].

Цель исследования — обоснование возможности эпидуральной имплантации в череп крыс ЭЭГ-датчика, позволяющего продолжительное время регистрировать биоэлектрическую активность коры головного мозга при свободном передвижении.

Задачи исследования

1. Провести разработку и апробацию последовательности ручного изготовления и эпидуральной имплантации в череп крыс ЭЭГ-датчика, оценить качество биоэлектрического сигнала мозга в норме и при системном введении фармакологических зондов, обладающих известными маркерами воздействия на центральную нервную систему.
2. Оценить риски инвазивного воздействия и безопасность для лабораторных крыс эпидуральной имплантации ЭЭГ-датчика, провести оценку благополучия лабораторных животных в хроническом эксперименте.

Материал и методы

Экспериментальное исследование выполняли на 40 нелинейных самцах крыс массой 200–250 г, полученных из «Питомника лабораторных животных Рапполово» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (пос. Рапполово Ленинградской обл.). Животных выдерживали в карантине в те-

чение 14 сут в группах по 6 особей. В послеоперационный период животных размещали индивидуально в прозрачные клетки из органического стекла с отверстиями в боковых стенках для нивелирования развития стресса

на фоне изоляции. Больных и ослабленных особей в исследовании не включали. Общие условия содержания включали: 8-часовой режим освещенности, температурный диапазон 20–22 °С, влажность воздуха не более 75%

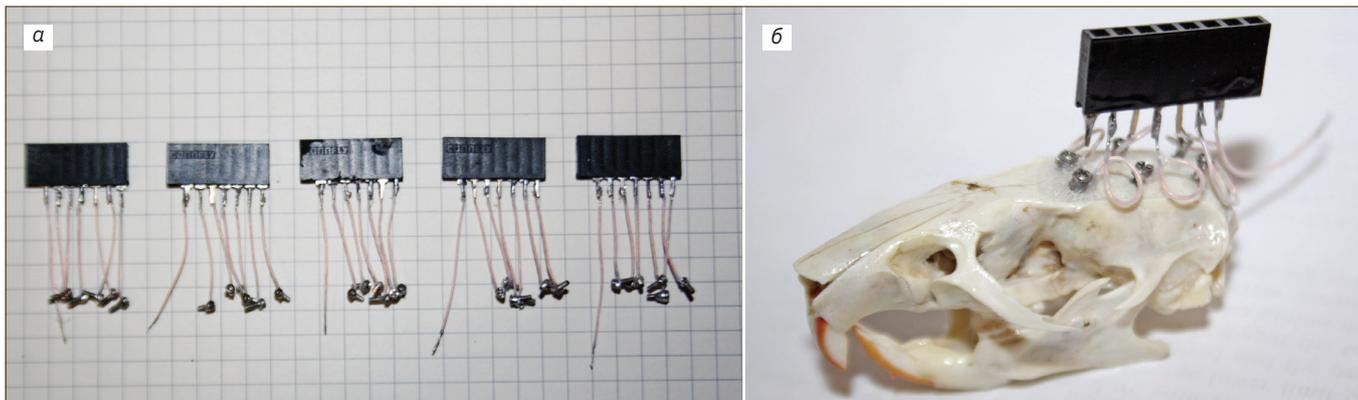


Рис. 1. ЭКоГ-датчик на 6 регистрирующих электродах: в собранном виде (а), на препарате черепа крысы (б)

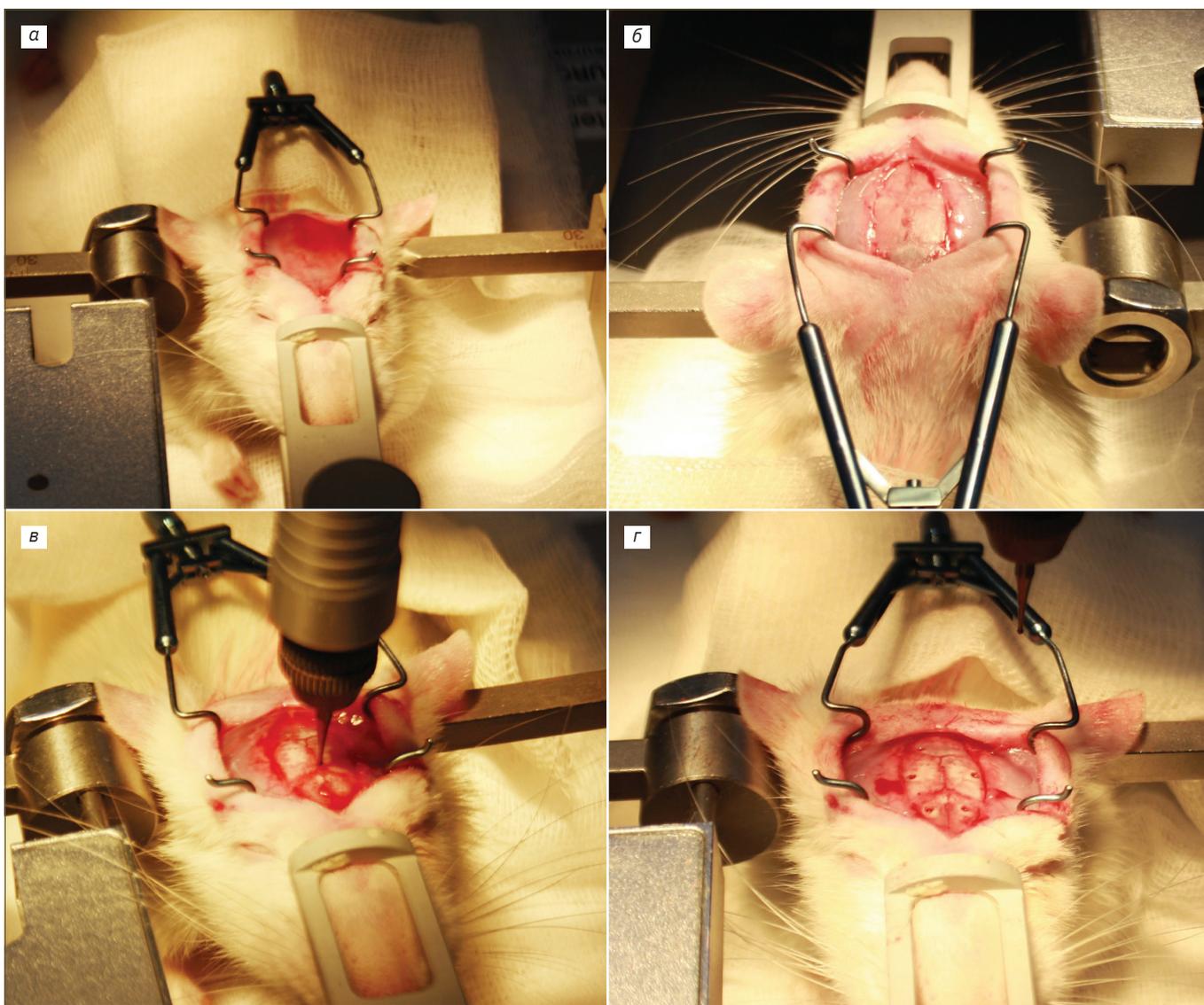


Рис. 2. Этапы оперативного доступа и трепанации: а – разрез кожи; б – на крыше черепа удалены мышечно-фасциальный слой и надкостница; в – калибровка сверла по брегме – точке пересечения лобно-теменного и сагиттального швов; г – трепанация отверстий для лобных и теменных электродов

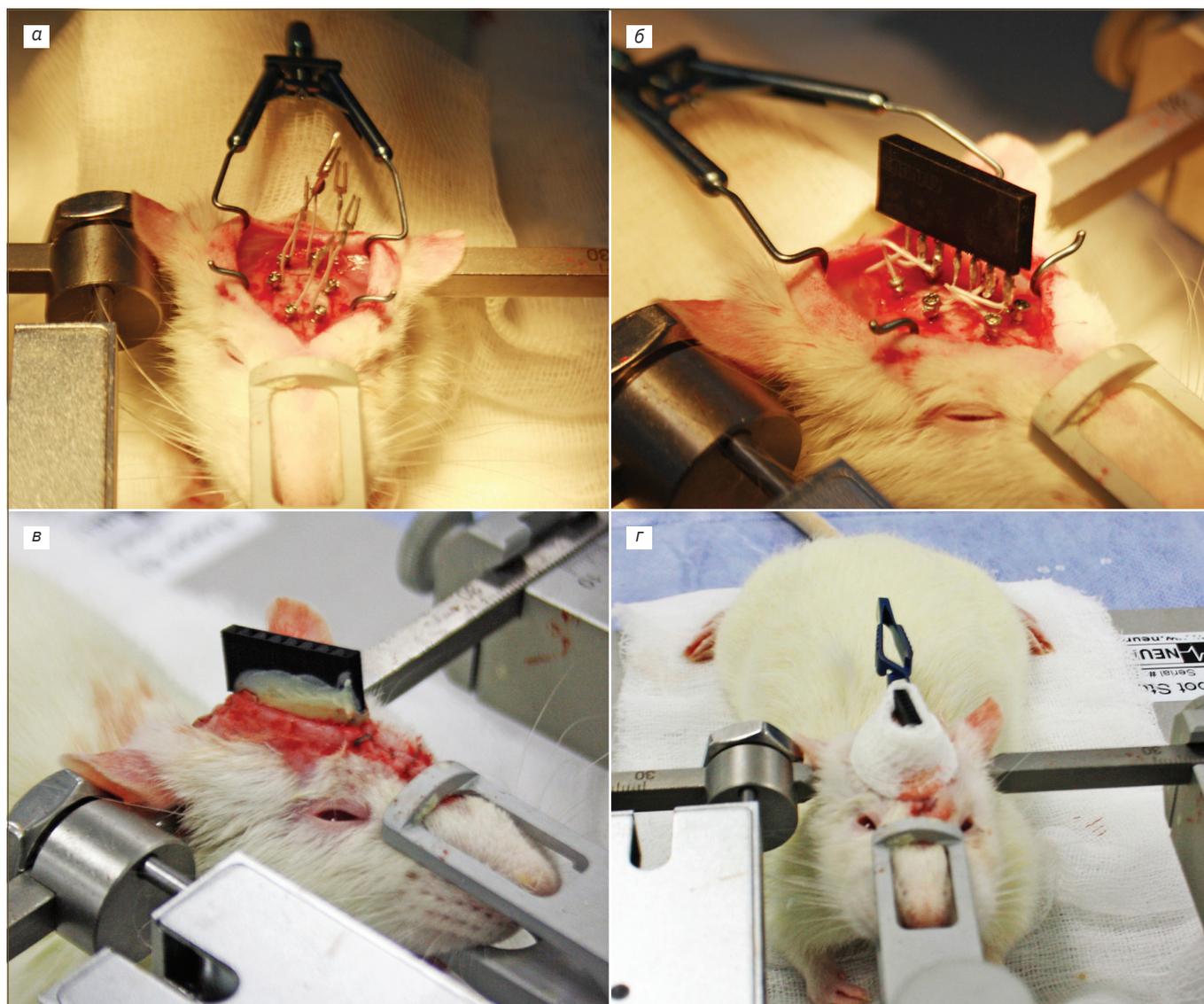


Рис. 3. Этапы имплантации датчика и закрытия операционной раны: а — регистрирующие электроды установлены в крышу черепа; б — электроды собраны в корпус датчика, заземляющий электрод заведен под кожу шейной области каудально на 1 см; в — датчик залит зубоорачебным материалом, рана ушита; г — затвердевание бинтовой повязки после заливки цианакрилатным клеем

в соответствии с кратностью воздухообмена, доступ к воде и пище — *ad libitum*, однако за 1 сут до вживления соблюдали пищевую депривацию. Проведение исследования одобрено независимым этическим комитетом при ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России (протокол от 17 октября 2023 г. № 283).

ЭКоГ-датчик формировали из 6 регистрирующих и 1 заземляющего электродов. Изготовление регистрирующих электродов осуществляли путем последовательного соединения тупоконечных винтов из нержавеющей стали диаметром 1 мм и высотой 4 мм с медным проводом марки МГТФ диаметром 0,03 мм и длиной 20 мм (Чувашкабель, Россия) с вилками разъема-гнезда на 8 каналов и шагом контактов 2,54 мм PBS-8 (Коннфли, Китай). Заземляющий электрод состоял

из вилки и провода. Соединение осуществляли посредством пайки оловянно-свинцовым припоем (3:2) после обработки активным флюсом в виде фосфорной кислоты. Далее электроды вилками коммутировали с разъемом-гнездом PBS-8 (рис. 1).

Кабель для коммутации датчика и электроэнцефалографа делали из штыревого разъема PLL1.27-7, проводов диаметром 1 мм и длиной 350 мм и разъема «touchproof» диаметром 1,5 мм DIN 42 802-ST (Коннфли, Китай).

Вживление датчика в череп крыс производили посредством хирургической трепанации. Операцию выполняли в четыре этапа: доступ, трепанация отверстий, имплантация электродов и закрытие раны (рис. 2, 3).

Для проведения хирургических манипуляций животных внутрибрюшинно наркотизировали комбинированным препаратом, содержащим тилетамин и золазепам (Золетил 100,

Вальдефарм, Франция) в дозе 0,8 мл/кг. Осуществляли бритье операционного поля. Фиксировали голову на стереотаксической установке с бормашинной и прикладным программным обеспечением (ПО) для персонального компьютера (Нейростар, США), поместив аурикулярные планки в ушной канал и закрепив верхнюю челюсть с помощью переднего зажима. Закрепленную голову помещали в одну плоскость с линейкой переднезадних координат и в перпендикулярную к верхненижней линейке. Для обогрева животных во время операции использовали коврик—термостат оригинальной конструкции, установленный на $37 \pm 0,5$ °С. Для исключения подсыхания глаз их покрывали гелем с декспантенолом 5% (Корнерегель, д-р Герхард Манн ХФП, Германия).

После подготовки операционного поля в условиях асептики и антисептики (раствор йода спиртовой 5%—сухо—изопропиловый спирт 70%—сухо) и местной инфильтрационной анальгезии 0,5–1% раствором лидокаина (Биосинтез, Россия) выполняли сагиттальный каудокраниальный доступ. Длина разреза кожи составляла 2,5 см от места перехода затылочной кости в шейный отдел позвоночника до линии, проведенной между глазами. Накладывали ранорасширитель. Удаляли мышечно-фасциальный слой, надкостницу в области лобных, теменных и затылочных костей. Гемостаз кровоточащих участков тканей и поверхности черепа на этапе доступа и далее осуществляли посредством применения одного из приемов: прижатие, прошивание лигатурой или наложение коллагеновой гемостатической губки (Белкозин, Россия). Остатки надкостницы удаляли марлевой салфеткой, смоченной 3% пероксидом водорода (Белмедпрепараты, Россия) (см. рис. 2).

Трефинацию черепа осуществляли шаровидной фрезой диаметром 0,9 мм. Для предупреждения чрезмерного нагревания сверление осуществляли интервально. Координаты расположения регистрирующих электродов определяли посредством стереотаксического атласа мозга крысы [7]. Положение сверла стереотаксиса калибровали по брегме—точке пересечения венечного и сагиттального швов. Имплантацию лобных электродов FP_1 и FP_2 выполняли над проекцией зоны M1 первичной двигательной коры по координатам: AP=+1,7 мм (вперед/назад от брегмы), ML=±2,0 мм (влево/вправо от сагиттального шва), DV=1,0 мм (глубина погружения), теменных C_3 и C_4 — над первичной соматосенсорной корой: AP=-4,1 мм; ML=±2,8 мм; DV=1,0 мм; затылочных O_1 и O_2 — над мозжечком: AP=-11,5 мм, ML=±2,0 мм, DV=1,0 мм. Регистрирующие и заземляющий электроды коммутировали к разъему. Далее заземляющий электрод заводили подкожно в область шеи на 1,5–2 см каудально (см. рис. 3).

Конструкцию фиксировали к черепу посредством двухкомпонентного пломбировочного зубоветрачебного материала (Белкор, ВладМиВа, Россия). Для получения пластификата порошок и жидкость смешивали в соотношении 2:1 в течение 30 с, наносили стоматологическим шпателем, давали застыть 5 мин. Кожу ушивали нерассасывающимся шовным материалом ретроально и каудально так, чтобы она аккуратно и без зазора примыкала к цементу. Накладывали асептическую марлевую повязку, которую заливали цианакрилатным клеем (Эфель 157, Эффективный Элемент, Россия).

После окончания операции животным с целью восполнения дефицита жидкости, обезболивания и профилактики инфекций внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (0,9% натрия хлорид, Мосфарм, Россия) в объеме 20 мл/кг, 5% кетопрофен (Ветпром АД, Болгария) в дозе 10 мг/особь, 4% гентамицин (Мосагроген, Россия) в дозе 10 мг/особь соответственно.

Запись и регистрацию биоэлектрического сигнала с отведений осуществляли с полосой пропускания 0,5–35 Гц и частотой квантования 500 Гц с помощью 8-канального компьютерного энцефалографа с модулем Нейрон-Спектр-1 с ПО Нейрон-Спектр.NET (Нейрософт, Россия). Из полученного сигнала формировали биполярные продольные отведения FP_1-C_3 , FP_2-C_4 , C_3-O_1 , C_4-O_2 , FP_1-O_1 , FP_2-O_1 (монтаж Double Banana) и межполушарные поперечные отведения FP_1-FP_2 , C_3-C_4 и O_1-O_2 . Полученный спонтанный сигнал оценивали визуально-логически. Также определяли спектральную амплитуду и мощность ритмов дельта (0,5–4,0 Гц), тета (4–8 Гц), альфа (8–14 Гц) и бета (низкочастотные 14–20 Гц и высокочастотные 20–35 Гц), коэффициент модуляции, индекс ритма или феномена, то есть относительную длительность за эпоху анализа.

В ходе исследования использовали эталонные фармакологические зонды (ФЗ), провоцирующие эпилептиформную активность [стрихнин, коразол, цианид натрия (Сигма Олдридж, Германия)], седативно-гипнотические средства [тилетамин + золазепам, ксилазин (Ксила, Интерхеми, Нидерланды), дексметомедин (Дексдор, Орион, Финляндия), диизопропилфенол (Пропофол, Фрезениус, Германия)] в эффективных дозах, по данным литературы [5, 8]. В качестве носителя и для разведения препаратов использовали физиологический раствор. Рабочие растворы вводили внутривенно в хвостовую вену.

Запись осуществляли при свободном перемещении животных, предварительный перевод в экспериментальную комнату осуществляли за 1 ч для привыкания к новым условиям. Длительность записи составляла 1,5 ч: 15 мин фоновой активности и 75 мин после инъекции ФЗ. Для дальнейшего анализа стабильности записи

си и отбирали эпохи по 60 с без артефактов. В ходе исследований при оценке выраженности судорог использовали шкалу Рацин [9], о степени депримации судили по критериям шкалы индекса тяжести неврологических нарушений [10].

Для выявления послеоперационных осложнений за крысами наблюдали в течение 90 сут после имплантации. Ежедневно оценивали общее состояние, водно-пищевое поведение и неврологическую функцию. На 30, 60 и 90-е сутки у крыс, не получавших ФЗ, выполняли этологическое и патоморфологическое исследование головного мозга.

Этнологическую оценку сохранности ориентировочно-исследовательского рефлекса тестировали однократно в установке «открытое поле» (НПК «Открытая наука», Россия) с прикладным ПО (EthoVision XT, Noldus, Нидерланды). У оперированных и интактных крыс оценивали среднюю скорость перемещения, пройденную дистанцию, длительность замираний, количество стоек на задних лапках и заглядываний в норки. Число наблюдений (n) в каждой экспериментальной точке составляло 4.

Забор головного мозга ($n=3$ в каждой точке) производили после внутрисердечного введения 5–7 мл забуференного формалина в условиях внутрибрюшинной наркотизации тилетаминном и золазепамом в дозе 2 мл/кг. Выделяли участки прилегания электродов к коре полушарий и мозжечка. Далее участки мозга фиксировали в забуференном формалине, обезвоживали, заливали в парафин и изготавливали срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопию проводили с помощью светооптического микроскопа Микмед-6 (Аналит-Нева, Россия) при малом и большом увеличении [11].

Статистический анализ результатов осуществляли, используя ПО Statistica 10.0. Сравнение мер центральной тенденции в виде Me — медианы, $[Q_{25}; Q_{75}]$ — нижнего и верхнего квартиля выполняли посредством непараметрического критерия Ньюмена—Кейлса для множественных попарных сравнений. Вывод о статистической значимости различий принимали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Апробацию работоспособности датчика и оценку валидности получаемых данных проводили на бодрствующих крысах в различные сроки после имплантации путем съема сигнала в состоянии покоя и после введения веществ судорожного и депримирующего действия с эталонной активностью.

При визуально-логическом анализе кортикограмм крыс в состоянии бодрствующего покоя наблюдали непрерывный паттерн без пароксизмальных эпизодов депрессии сигнала.

В частотной структуре паттерна преобладал низкочастотный бета-ритм, индекс которого достигал 40% и более. Около 20–30% занимали тета-волны, оставшееся время делили между собой альфа- и дельта-ритмы.

При поисково-исследовательской активности, проявлявшейся эпизодами обнюхивания и вставания на задние лапы, в области электродов C_3 и C_4 начинали доминировать тета-ритмы. Преобладание в теменной зоне тета-ритма при поисковом рефлексе связывают с наиболее близким предлежанием гиппокампа — его основного источника в мозге крыс [4].

Таким образом было показано, что изучаемый ЭКоГ-датчик с выбранным расположением электродов позволяет снимать дифференцированный сигнал с различных областей мозга.

При введении крысам судорожных токсикантов коразола и стрихнина фоновый непрерывный паттерн отражал эпилептиформную и эпилептическую активность с типичным «острым» вариантом изменений. В условиях тонических судорог высокой интенсивности (4–5 баллов по Рацин) наблюдали пики (спайки), одиночные «острые» волны, их сочетания по типу пик—медленная волна, полипик—медленная волна, острая волна—медленная волна, формирующие продолженные разряды. При развитии комы генерализованная активность включала эпизоды пароксизмальной депрессии сигнала амплитудой менее 10 мкВ, индекс которой достигал 50%.

Далее отмечали паттерны по типу вспышка—ослабление и вспышка—подавление—чередование эпох активности и эпизодов депрессии сигнала амплитудой менее 10 и 2 мкВ соответственно. Последние переходили в паттерн разряд — постразрядная депрессия от частых до периодических двух- и трехфазных осцилляций на фоне глубокой депрессии сигнала до уровня 2–5 мкВ. В случае выживания животного спустя 4–5 ч наблюдали возвращение фонового ритма. Гибель животных определяли по наступлению изоэлектрического молчания (рис. 4).

После введения цианида натрия отмечали иную ЭКоГ-картину. Наблюдали депрессию сигнала практически до изолинии. Спустя 1–2 мин возникала эпилептическая активность на фоне судорог высокой интенсивности. По всей видимости, порядок развития наблюдаемых феноменов был связан с механизмом действия токсиканта, основанном на последовательном развитии сначала энергодифицитной гибернации нейронов, а уже потом генерации судорог на ее фоне.

Введение агонистов α_2 -адренорецепторов дексмететомидина и ксилазина инициировало у крыс подъем активности дельта-ритма в виде медленных высокоамплитудных волн преимущественно в области лобных и теменных электродов и снижение индексов бета- и альфа-ритмов. На этом фоне у животных

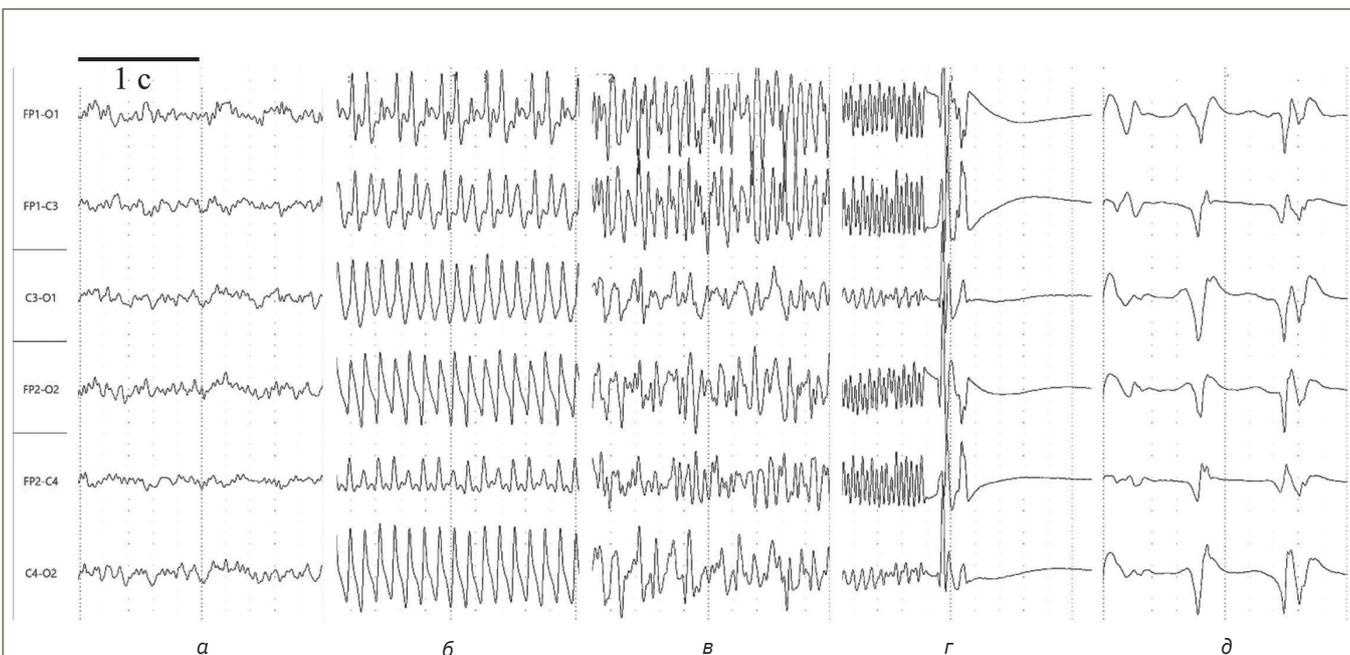


Рис. 4. Мозговая активность крыс в различные сроки после внутривенного введения коразола в дозе 50 мг/кг, вольтаж записи 50 мкВ/см, скорость 30 мм/с, эпоха 2 с, запись на фоне судорог интенсивностью Racin 3–5 баллов (б–г): а – фон: непрерывный паттерн с преобладанием волн бета-диапазона и единичными волнами альфа-диапазона без признаков межполушарной асимметрии и лобно-затылочного градиента; б – 10 мин: генерализованная ритмическая эпилептическая активность в виде острых волн веретенообразной формы частотой от 4 до 8 Гц с межполушарной асимметрией по амплитуде ($Fr_2-C_2 < Fr_1-C_1$); в – 20 мин: генерализованная ритмическая эпилептическая активность в виде полиморфных спайков, симметричных в обоих полушариях, выражен лобно-затылочный градиент по амплитуде; г – 40 мин: паттерн острая–медленная волна с сохранением генерализованной представленности патологической активности и преобладанием по амплитуде в передних отведениях и развитием последующего подавления фоновой активности после разряда острая–медленная волна; д – 60 мин: персистирование паттерна вспышка–подавление

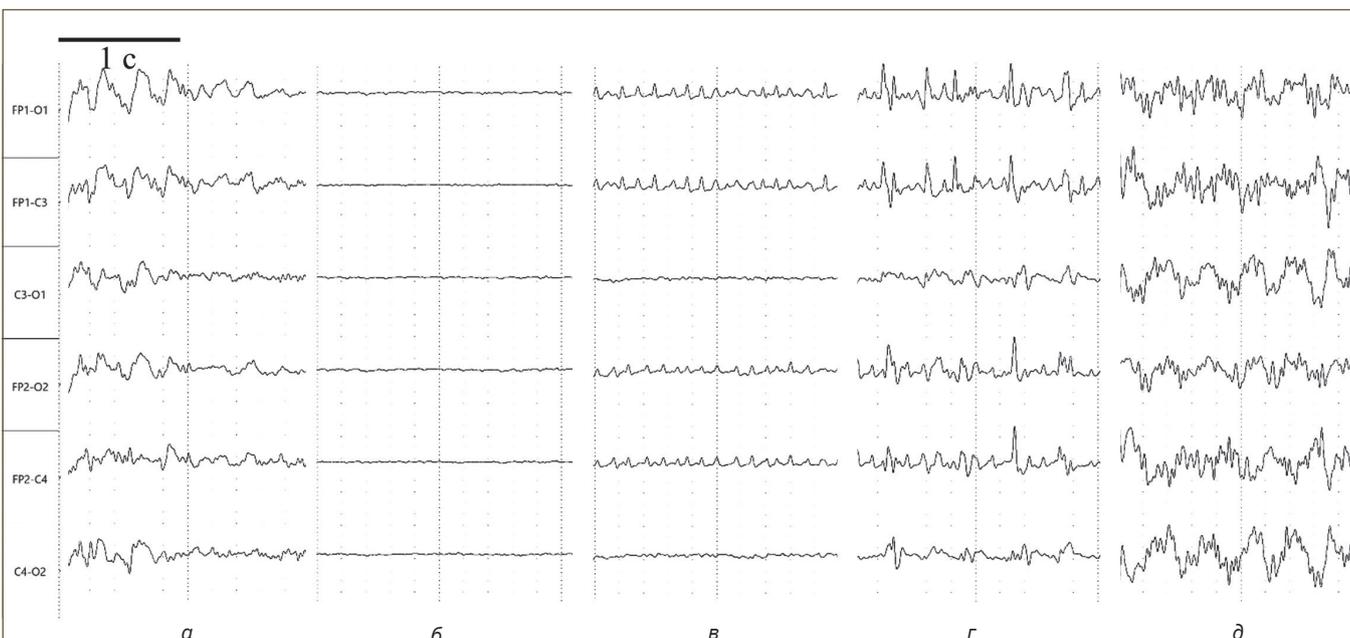


Рис. 5. Мозговая активность у крыс в различные сроки после внутривенного введения диизопропилфенола в дозе 30 мг/кг, вольтаж записи 20 мкВ/см, скорость 30 мм/с, эпоха 2 с: а – во время введения: «на игле» подавление сигнала на фоне угнетения неврологической функции от нормального состояния до комы глубокой; б – 5 мин: электрическое молчание на фоне комы глубокой; в – 15 мин: низкоамплитудная альфа-активность с выраженным лобно-затылочным градиентом на фоне комы глубокой; г – 20 мин: острые волны на фоне низкоамплитудного бета-ритма, выражен лобно-затылочный градиент на фоне комы поверхностной; д – 25 мин: тета-ритм на фоне сопора

Таблица 1.
Результаты тестирования крыс в установке «открытое поле» (Me [Q₂₅; Q₇₅], n=4)

Группа животных	Средняя скорость, см/с	Пройденная дистанция, см	Общая длительность замираний, с	Количество стоек	Количество норок
Интактная	7,4 [6,9; 7,6]	2002,8 [1866,1; 2043,9]	23,6 [21,3; 24,8]	20,5 [18,5; 22,5]	7,5 [4,5; 10,5]
Опытная, время эксперимента, сут:					
30-е	6,7 [6,0; 7,9]	1806,2 [1609,8; 2120,2]	52,7 [15,7; 91,8]	15,0 [12,3; 18,0]	6,0 [4,0; 11,8]
60-е	5,5 [5,1; 5,7]	1529,9 [1384,6; 1633,6]	127,6 [118,7; 134,9]	15,5 [12,3; 19,5]	4,5 [3,0; 7,0]
90-е	4,1 [3,4; 4,7]*	1118,9 [911,8; 1268,3]*	130,5 [123,8; 154,8]	10,0 [7,5; 12,5]	4,0 [3,0; 4,5]

Примечание. * Различия со значениями интактной группы значимы при $p \leq 0,05$ (тест Ньюмена–Кейлса).

наблюдали развитие сопора и поверхностной комы.

После инъекций тилетамина с золазепамом наблюдали смену фонового ритма на медленные и высокоамплитудные волны с всплесками низкой амплитуды — так называемый кетаминный комплекс [8]. При этом амплитуда низкочастотной активности возрастала больше, чем после инъекции α_2 -агонистов. По мере приближения пробуждения эти волны замещали более быстрые. Необходимо отметить, что даже при полном отсутствии болевой чувствительности зрачкового, глоточного, роговичного рефлексов у животных не наблюдали снижения амплитуды мозговой активности, что характерно для диссоциативных гипнотиков.

Диизопропилфенол приводил сначала к электрическому «молчанию», за которым следовала высокоамплитудно-медленноритмическая активность, переходящая в паттерн, близкий по своим характеристикам фоновому. Уровень мощности мозговой активности коррелировал с глубиной угнетения неврологической функции. При нарастании сигнала наблюдали выраженный лобно-затылочный градиент, свидетельствующий о валидности сигнала с мозжечковых электродов (рис. 5).

Таким образом, введение ФЗ с эталонной активностью позволило выявить ожидаемую и характерную биоэлектрическую активность. В свою очередь это свидетельствовало о приемлемом уровне чувствительности и специфичности сигнала, получаемого с исследуемого ЭКоГ-датчика.

Помимо ценности сигнала с диагностической точки зрения, существенным вопросом эксплуатации ЭКоГ-датчиков считают их безопасность для животных и длительность фиксации электродов [4]. Поэтому при разработке конструкции регистрирующих электродов применяли винты, а не электроды проволоочного типа. Винты обеспечивали высокую степень контроля глубины погружения электродов при эпидуральной имплантации. Вместе

с тем тупые концы винтов снижали вероятность повреждения твердой мозговой оболочки и пилальных сосудов. Как следствие, при наблюдении за крысами в течение 90 сут не было выявлено случаев послеоперационной летальности, которую связывают с ранними осложнениями: скрытой ликвореей, внутричерепной гематомой и дислокацией мозга, а также отсроченными гнойно-септическими заболеваниями: абсцессом мозга, сепсисом и др. [1, 5].

Также хроническое использование датчика не оказывало негативного влияния на состояние испытуемых крыс и не вызывало патологических двигательных знаков. Это особенно важно, поскольку лобные электроды были имплантированы в зону двигательной коры. Не наблюдали и признаков болевой реакции в виде снижения двигательной активности, агрессивности, тремора, отсутствия груминга, «сгорбленной» позы и нарушений дыхания.

Ориентировочно-исследовательский рефлекс крыс на 30-е и 60-е сутки соответствовал уровню интактной группы, тогда как по прошествии 90 сут животные демонстрировали гиполокомоторные расстройства, что соответствовало статистически значимому снижению показателей моторной и исследовательской функции поведения в тесте «открытое поле» (табл. 1).

При анализе гистологических препаратов прилегающих к винтам корковых областей через 30, 60 и 90 сут после имплантации обнаруживали невыраженные изменения, свидетельствующие о сохранности у большинства оперированных животных твердой и паутинной мозговой оболочки. Так, к 30-м суткам у крыс с отсутствием дефекта тканей (2 из 3 особей) обнаруживали отечность и невыраженную клеточную реакцию. В одном случае были выявлены гемосидероз и выраженная миграция клеточных элементов. Далее, на 60-е и 90-е сутки изменения также можно было назвать невыраженными у большинства животных. В эти сроки при наличии дефекта

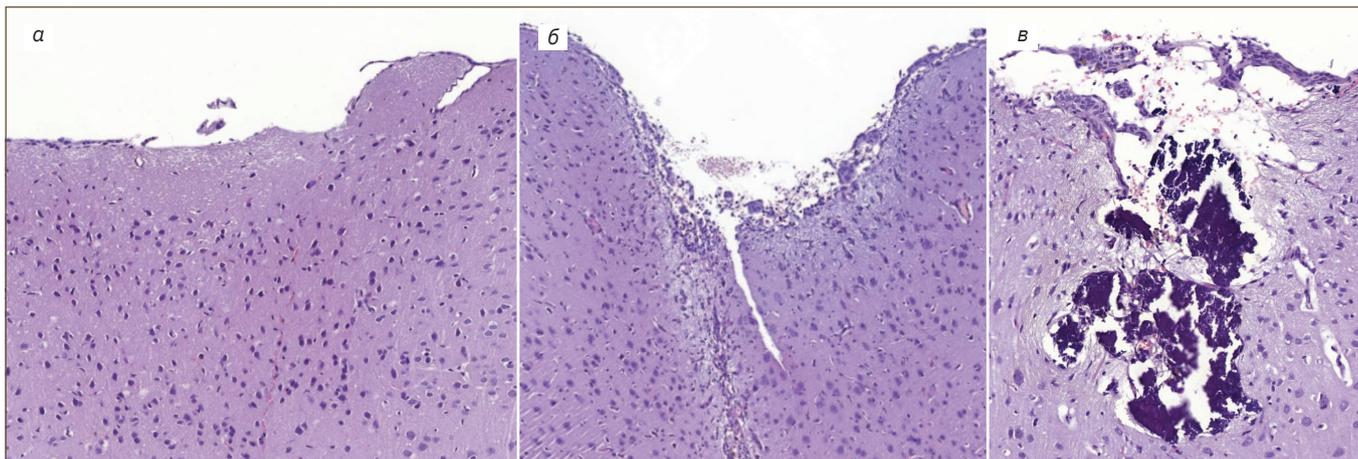


Рис. 6. Полиморфные изменения структуры коры больших полушарий, прилегавшей к теменным электродам C_3 и C_4 на 60-е сутки после имплантации; окраска гематоксилином и эозином, $\times 10$: а — фокальный отек; б — дефект размером $0,7 \times 0,4$ мм представлен очагом деструкции со слабо выраженной перифокальной лимфоплазмоцитарной инфильтрацией, гемосидерозом и слабо выраженной гигантоклеточной реакцией; в — дефект размером $0,3 \times 0,7$ мм представлен очагом деструкции с фокусами обызвествления, лимфогистиоцитарной инфильтрацией, гемосидерозом и выраженной гигантоклеточной реакцией

(2 из 6 особей) наблюдали только гигантоклеточную реакцию и петрификацию в отсутствие формирования глиального рубца (рис. 6).

Заключение

Результаты апробации предложенной последовательности изготовления и имплантации ЭКоГ-датчиков на моделях острых экспериментально индуцированных судорог и депрессии позволяют считать получаемый с них сигнал валидным. Вместе с тем использование ЭКоГ-датчика в течение 90 сут не вызывало значимого снижения сигнала и переносилось животными удовлетворительно, без неврологических нарушений и выраженной альтерации в области имплантации. Учитывая результаты хронического наблюдения за животными, выраженность ориентировочно-исследовательского рефлекса как маркера психомоторной функции организма, а также патологической морфологии, наиболее рекомендованный период для проведения экспериментальных работ не более 90 сут. При соблюдении техники вживления ЭКоГ-датчика и послеоперационного сопровождения, в том числе обезболивания, позволяет обеспечить выживаемость и улучшить благополучие животных, учитывая тяжесть проводимых процедур (Директива 2010/63/EU)¹.

Предлагаемая последовательность изготовления и имплантации ЭКоГ-датчика достаточно проста, надежна и в то же время хорошо воспроизводима. Поскольку датчик изготавливают вручную, его можно модифицировать и адаптировать к конкретной задаче. Несмотря на удобство проведения стереотаксических операций, необходимо отметить, что имплан-

тация электродов может быть осуществлена и без использования данной техники, например, с применением фиксации черепа на стандартном операционном столике для грызунов и ручной расстановки точек трепанации с помощью циркуль-измерителя. Это позволяет считать ее доступной как для нейрофизиологических лабораторий, так и для большинства токсикологических или многопрофильных доклинических лабораторий, не имеющих стереотаксических установок.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ferry B., Gervasoni D., Vogt C. Stereotaxic Neurosurgery in Laboratory Rodent, 2-nd ed. NY: Springer, 2021. 256 p.
2. Höller Y., Helmstaedter C., Lehnertz K. Quantitative pharmaco-electroencephalography in antiepileptic drug research // CNS drugs. 2018. Vol. 32. N. 9. P. 839–848. DOI: 10.1007/s40263-018-0557-x.
3. Александров М.В. Влияние психотропных средств на биоэлектрическую активность головного мозга // Сиб. мед. обозрение. 2017. Т. 103. № 1. С. 85–88. [Aleksandrov M.V. Issledovanie psikhotropnykh sredstv na bioelektricheskuyu aktivnost' golovnoho mozga // Sib. med. obozrenie. 2017. Vol. 103. N. 1. P. 85–88. (In Russ.)]. DOI: 10.20333/2500136-2017-1-85-88.
4. Сысоев Ю.И., Приходько В.А., Идиятуллин Р.Д. и др. Метод регистрации биоэлектрической активности коры головного мозга у крыс в условиях хронического эксперимента // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2021. Т. 108. № 2. С. 279–290. [Sysoev YU. I., Prikhod'ko V.A., Idiyatullin R.D. et al. Metod registratsii bioelektricheskoi aktivnosti kory golovnoho mozga u krys v usloviyakh khronicheskogo ehksperimenta // Ros. fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova. 2021. Vol. 108. N. 2. P. 279–290. (In Russ.)]. DOI: 10.31857/S0869813922020091.

¹ Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Санкт-Петербург, 2012.

5. Климовцев П.С., Вахвийнен М.С., Кряжевских А.А. и др. Методические подходы к применению транскраниальной электрокортикографии при оценке эффектов нейротропных препаратов // Сб. ст. Всерос. межведом. НПК «Сост. и персп. разр. МСЗ от факторов РХБ-природы». Санкт-Петербург, 2019. С. 76–82. [Klimovtsev P.S., Vakhviyainen M.S., Kryazhevskikh A.A. et al. Metodicheskie podkhody k primeneniyu transkranial'noi ehlektrokortikografii pri otsenke ehffektov neirotropnykh preparatov // Sb. st. Vseross. MNPК "Sost. i persp. razr. MSZ ot faktorov RKB-prirody". Sankt-Peterburg, 2019. P. 76–82. (In Russ.)].
6. Качалов Ю.П., Гнетов А.В., Ноздрачев А.Д. Металлический микроэлектрод. Л.: Наука, 1980. 256 с. [Kachalov YU. P., Gnetov A.V., Nozdrachev A.D. Metallicheskiy mikroehlektrod. L.: Nauka, 1980. 256 p. (In Russ.)].
7. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 8th ed. Cambridge MA.: USA. Acad Press, 2021. 286 p.
8. Hatch R.C., Booth N.H., Kitzman J.V. et al. Antagonism of ketamine anesthesia in cats by 4-aminopyridine and yohimbine // Am. J. Vet. Res. 1983. Vol. 44 P. 417–423.
9. Racine R. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II Motor seizure // Electroenc. Clin. Neurophysiol. 1972. Vol. 32. N. 3. P. 281–294. DOI: 10.1016/0013-4694(72)90177-0.
10. МР ФМБА России 21.10-13. Моделирование интоксикаций депримирующими агентами и оценка выраженности депримирующего эффекта. Москва: [б. и.], 2013. 31 с. [MR FMBA Rossii 21.10-13. Modelirovanie intoksikatsii deprimiruyushchimi agentami i otsenka vyrazhennosti deprimiruyushchego ehffekta. Moskva: [b. i.], 2013. 31 p. (In Russ.)].
11. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии: Руководство / Д.Э. Коржевский. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2013. 127 с. [Morfologicheskaya diagnostika. Podgotovka materiala dlya gistologicheskogo issledovaniya i ehlektronnoi mikroskopii: Rukovodstvo / D.E. Korzhevskii. Sankt-Peterburg: SpetsLit, 2013. 127 p. (In Russ.)].

Информация об авторах

А.А. Ховпачев¹, кандидат медицинских наук, преподаватель, vtmz@vmeda.org, <https://orcid.org/0009-0002-5780-1557>

М.С. Вахвийнен², кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, <https://orcid.org/0009-0006-6556-1273>

В.А. Башарин¹, доктор медицинских наук, профессор, начальник кафедры, <https://orcid.org/0000-0001-8548-6836>

С.В. Чепур², доктор медицинских наук, профессор, начальник института, <https://orcid.org/0000-0002-5324-512X>

М.А. Луцык¹, кандидат медицинских наук, доцент, старший преподаватель, <https://orcid.org/0009-0001-7674-2153>

Е.В. Никульшина¹, курсант, <https://orcid.org/0009-0004-6055-4985>

Р.Д. Голосов², научный сотрудник, <https://orcid.org/0009-0000-5418-1802>

¹ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева д. 6.

² ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины», Министерства обороны России, 195043, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая д. 4.

Information about the authors

A.A. Khovpachev¹, Ph. D. of Medical Sciences, Lecturer, vtmz@vmeda.org, <https://orcid.org/0009-0002-5780-1557>

M.S. Vakhviyainen², Ph. D. of Biological Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0009-0006-6556-1273>

V.A. Basharin¹, Holder of an Advanced Doctorate (Doctor of Science) in Medical Sciences, Professor, Head of the Department, <https://orcid.org/0000-0001-8548-6836>

S.V. Chepur², Holder of an Advanced Doctorate (Doctor of Science) in Medical Sciences, Professor, Head of the Institute, <https://orcid.org/0000-0002-5324-512X>

M.A. Lutsyk¹, Ph. D. of Medical Sciences, Associate Professor, Senior Lecturer, <https://orcid.org/0009-0001-7674-2153>

E.V. Nikulshina¹, Cadet, <https://orcid.org/0009-0004-6055-4985>

R.D. Golosov², Research Associate, <https://orcid.org/0009-0000-5418-1802>

¹ Federal state budgetary military educational institution of higher education "Military Medical Academy named after S.M. Kirov" of the Ministry of defence of the Russian Federation, 194044, Russia, St. Petersburg, st. Academician Lebedev, 6.

² Federal State Budgetary Institution "State Research Testing Institute of Military Medicine", Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, Russia, St. Petersburg, st. Lesoparkovaya 4.

Вклад авторов в написание статьи

А.А. Ховпачев — анализ научной литературы, разработка конструкции датчика и его изготовление, имплантация, написание текста статьи.

М.С. Вахвияйнен — идея, анализ научной литературы, разработка методики изготовления датчика, апробация датчика, написание текста статьи.

В.А. Башарин — концепция и дизайн исследования, редакция и утверждение окончательного варианта текста статьи.

С.В. Чепур — концепция и дизайн исследования, редакция и утверждение окончательного варианта текста статьи.

М.А. Луцык — имплантация, апробация датчика.

Е.В. Никульшина — имплантация, апробация датчика.

Р.Д. Голосов — изготовления датчика.

Сведения о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дата поступления рукописи
в редакцию: 19.01.2024

Дата рецензии статьи: 14.02.2024

Дата принятия статьи к публикации: 22.03.2024

Authors contribution

A.A. Khovpachev — analysis of scientific literature, development of the sensor design and its manufacture, surgical implantation, preparation of the article text.

M.S. Vakhviyainen — idea, analysis of scientific literature, development of sensor manufacturing techniques, testing of the sensor, preparation of the article text.

V.A. Basharin — concept and design of the study, revision and approval of the final version of the text of the article.

S.V. Chepur — concept and design of the study, revision and approval of the final version of the text of the article.

M.A. Lutsyk — surgical implantation, participation in testing

E.V. Nikulshina — surgical implantation, sensor testing.

R.D. Golosov — sensor manufacturing.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received: 19.01.2024

Reviewed: 14.02.2024

Accepted for publication: 22.03.2024