

А.Н. Макаренко¹, С.Г. Морозов², С.И. Савосько³, И.Г. Васильева⁴

Метод моделирования повторного локального геморрагического инсульта у крыс

¹ Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, биологический факультет, Украина, 03022, Киев-022, просп. Академика Глушкова, 2

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

³ Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Украина, 01024, Киев, ул. Богомольца, 4

⁴ Государственное учреждение Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова Украинской академии медицинских наук, Киев, 04050, ул. Платона Майбороды (Мануильского), 32

Разработан стандартизированный метод воспроизведения в эксперименте повторного инсульта у крыс. Особенность данного варианта воспроизведения повторного инсульта состоит в моделировании аутогеморрагического правополушарного инсульта путем механического повреждения ткани после 10-суточной окклюзии правой общей сонной артерии. Модель удобна для воспроизведения повторного стандартизированного локального поражения головного мозга, является более адекватной формой моделирования острой и хронической цереброваскулярной патологии, чем использование только локального кровоизлияния введение аутокрови в структуры мозга интактных животных. По морфологическим характеристикам модель приближается к клиническим вариантам развития и течения острого геморрагического инсульта после предыдущей хронической мозговой недостаточности по ишемическому типу.

Ключевые слова: повторный локальный геморрагический инсульт, метод/моделирование, морфологические особенности, головной мозг крыс

A.N. Makarenko¹, S.G. Morozov², S.I. Savosko¹, I.G. Vasil'eva³

Simulation of repeated local hemorrhagic stroke in rats

¹ Taras Shevchenko Kyiv national university, 2, prosp. Akademika Glushkova, Kyiv-022, 03022, Ukraine

² Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

³ Bogomoletz Institute of Physiology, 4, Bogomoletz str., Kyiv, 01024, Ukraine

⁴ Institute of Neurosurgery named after A.P. Romodanov, Ukrainian Academy of Medical Science, 326 Platon Mayboroda str., Kiev, 04050, Ukraine

The processes of developed in CNS the complicated stroke and developments of fittings for their pharmaceutical therapy were developed and offering by standardized method of the experimental secondary stroke in rats, suitable for the use in sharp and chronic researches. Variant of repeated hemorrhagic stroke consist of autohemorrhagic right hemisphere stroke by the mechanical damage of brain tissue after 10-daily occlusion of right common carotid artery was studied. A model is comfortable for reproducing of the repeated standardized local damage of brain, is more adequate form of design of transient and chronic cerebrovascular pathology, than the independent use of local hemorrhage of autoblood in the brain of animals. The morphological description of model approaches the clinical variants of development and flow of sharp hemorrhagic stroke after a previous chronic cerebral insufficiency on an ischemic type.

Key words: repeated local hemorrhagic stroke, method/modeling, morphological features, rat brain

Для переписки: Морозов Сергей Георгиевич, д-р биол. наук, чл.-корр. РАМН, зам. дир. по научной работе ФГБУ НИИОПП РАМН. E-mail: biorharm@list.ru

Лечение нарушений мозгового кровообращения представляет собой одну из самых актуальных проблем современной медицины. Ежегодно в мире острые нарушения мозгового кровообращения регистрируют-

ся более чем у 6 млн чел., у 700—750 тыс. — в США, свыше 450 тыс. — в России и около 175 тыс. — в Украине [1]. В настоящее время является общепринятым, что локальный острый экспериментальный инсульт, воспроизведенный в ЦНС животных, является адекватной моделью для исследования процессов цереброваскулярной патологии, особенностей их коррекции и разработки новых лекарственных препаратов для лечения инсульта.

Ранее нами был разработан метод локального кровоизлияния (острого аутогеморрагического инсульта)

Для корреспонденции: Гусев Евгений Юрьевич, д-р мед. наук, доцент, зав. лаб. иммунологии воспаления, ФГБУН «ИИФ» УрО РАН. E-mail: e.gusev@iir.uran.ru

[6], который в настоящее время широко используется различными специалистами — фармакологами, патофизиологами, специалистами по ВНД и др. [2, 8, 11]. В данной работе предлагается новая модель воспроизведения повторного церебрального инсульта. Основным требованием при ее разработке являлось соответствие или максимальное приближение к условиям и особенностям течения данной патологии у больных, которая развивается на фоне хронических предшествующих цереброваскулярных заболеваний [4]. После транзиторных ишемических атак (ТИА) у 27—73% пациентов в течение 7 сут. развивается ишемический инсульт [16]. Главными факторами ТИА и ишемического инсульта являются стеноз экстракраниальных сосудов (80%). При этом несвоевременное (отсроченное) проведение тромболитической терапии в 29% случаев сопровождается геморрагической трансформацией ишемизированных участков мозга [13].

В настоящее время разработаны различные методы моделирования острого геморрагического инсульта [17]. Кровоизлияние, вызванное, в частности, постепенным введением (в течение 3—4 мин) в область внутренней капсулы аутокрови (2 мл), сопровождается формированием у животных не стандартизированной и очерченной гематомы различных размеров. Процесс моделирования сопровождается быстрым повреждением обширных участков мозга, разрушением подкорковых клеточных структур и, реже, проводящих путей белого вещества коры больших полушарий. Причем эта и подобные ей экспериментальные модели характеризуются высоким процентом летальности животных, что делает указанные модели мало пригодными для использования в хронических экспериментах. Кроме того методы моделирования острого геморрагического инсульта разработаны для использования преимущественно на крупных животных (свиньи), в то время как современные скрининговые исследования предполагают широкое использование главным образом мелких лабораторных животных (крысы, мыши и др.) [5, 7].

Используемые методы моделирования инсульта имеют и другие существенные недостатки. В частности после забора аутокрови ее смешивают с гепарином (в соотношении 10:1) и вводят интрацеребрально под давлением 120—150 мм рт.ст. в область внутренней капсулы одного из полушарий головного мозга, в связи с тем, что данная локализация гематомы наиболее часто встречается в клинической неврологической практике [12]. Нарастающая внутримозговая компрессия усугубляется не только повреждением церебральных сосудов, но и проявлениями интрацеребрального отека, сопровождается проникновением и/или прорывом крови в цереброспинальную систему мозга животных. Одновременно отмечается ее ретроградное проникно-

вание по треку канюли, в результате чего кровь часто обнаруживается в мозговых желудочках и под мозговыми оболочками. В результате развития осложнений, которые особенно часто регистрируются при воспроизведении биполушарного инсульта, летальность экспериментальных животных возрастает с 27% до 80%. И, наконец, следует признать, что главным недостатком используемых в настоящее время моделей геморрагического инсульта является внезапное развитие у интактных животных внутримозгового кровоизлияния. Это противоречит данным специальной литературы, в которой неоднократно подчеркивается, что геморрагический инсульт наступает вследствие постепенного развития патологии церебральных сосудов, либо геморрагической трансформации ишемического инсульта (по типу смешанного инсульта) [4].

Цель работы — создание модели двухэтапного локального повторного инсульта, близкого по патогенезу, объему и степени поражения участка мозга острому нарушению мозгового кровообращения у человека.

Методика

Работа выполнена на 120 крысах-самках (средняя масса $203,1 \pm 7,5$ г) которые были разделены на 5 групп: контрольные животные (интактные, $n=10$), ложнооперированные животные ($n=10$), животные у которых осуществляли хроническую окклюзию правой общей сонной артерии (a. carotis communis dextra) ($n=20$), животные с геморрагическим инсультом ($n=40$) и группа животных с повторным инсультом ($n=40$). Ложнооперированным животным делали отверстие в черепе крыс соизмеримое диаметру канюли ($L=3,5—4,0$; $H=6,0$; $AP=0,6—1,0$) без введения канюли в ткань мозга. Животным с фокальным ишемическим инсультом выполняли хроническую окклюзию правой общей сонной артерии. Для этого животных наркотизировали интраперитонеальным введением тиопентала натрия (60 мг/кг). Крысе в положении «лежа на спине» в нижней области шеи делали надрез длиной 1,5—2 см (рис. 1). Отделив подкожную ткань и мышцы, получали доступ к правой общей сонной артерии. Лигирование и окклюзию общей сонной артерии проводили на уровне 18—20 мм до ее бифуркации на наружную и внутреннюю ветви с помощью шелковой нити 6/0 (Ethicon Ltd., Edinburgh, UK). После этих процедур рану наглухо зашивали нитью 10/0 («Ethicon» Шотландия) и обрабатывали йодом, а опытных животных возвращали в клетки и наблюдали в течение всего периода окклюзии, т.е. в течение 10 сут. Через 10 сут. животным под тиопенталовым наркозом делали транскардиальную перфузию 4%-ным раствором параформальдегида в 0,1 н фосфатном буфере (рН 7,4) и извлекали мозг для гистологического исследования.

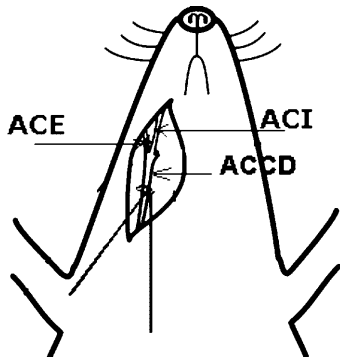


Рис. 1. Первый этап моделирования повторного локального инсульта (окклюзия правой общей сонной артерии): ACCD — a. carotis communis dextra; ACE — a. carotis externa; ACI — a. carotis interna.

Для моделирования геморрагического инсульта (церебральной геморрагии) опытным животным интраперитонеально вводили тиопентал натрия в дозе 60 мг/кг. Воспроизведение ограниченного кровоизлияния (рис. 2 А, Б) у наркотизированных крыс достигали механическим разрушением ткани внутренней капсулы (capsula interna, $L=3,5-4,0$; $H=6,0$; $AP=0,6-1,0$) [13]. В область внутренней капсулы с помощью стереотакса вводится мандрен-нож с целью локального разрушения ткани мозга и соответствующих кровеносных сосудов (рис. 2А). Моделирование достигается 4—6 вращательными движениями изогнутого мандрена-ножа с последующим введением в область внутренней капсулы (через 3—4 мин после разрушения) 0,15—0,2 мл аутокрови животного (рис. 2Б). Кровь вводили постепенно в течение 20—30 с, учитывая маленький объём [6]. Мандрен-нож погружается в ткань мозга (область внутренней капсулы) в направляющей инъекционной игле-канюле в результате использования стереотаксического способа ее введения. Наружный диаметр иглы составляет 0,4 мм, при этом скос иглы-канюли предварительно стачивается, а кромка полученного цилиндра остро затачивается. При моделировании инсульта это существенно ускоряет и оптимизирует процесс введения направляющей мандрен-иглы в соответствующие образования мозга. Верхняя часть мандрена-ножа вместе с иглой-канюлей прочно закрепляется в отверстии держателя стереотаксического прибора (СТМ-3, Россия). После введения направляющей полой иглы-канюли в заданную структуру мозга (в данном случае — во внутреннюю капсулу) согласно стереотаксическому атласу мозга крысы [14] из нее выдвигается на 1 мм отклоненный и заточенный мандрен-нож. После 4—6 поворотов по часовой стрелке и против неё мандрен-нож и направляющую иглу-канюлю извлекают манипулятором из мозга животного. После 10 дней с момента моделирования геморрагии животным под тиопенталовым наркозом (60 мг/кг) выполняли транскардиальную перфу-

зию 4%-ным раствором параформальдегида в 0,1 н фосфатном буфере (рН 7,4).

Для воспроизведения у крыс повторного хронического нарушения мозгового кровообращения была разработана модель повторного двухэтапного инсульта. Для достижения желаемого результата животным под наркозом моделировали хроническую окклюзию правой общей сонной артерии, а через 10 сут. повторно наркотизировали для моделирования интрацеребральной гематомы согласно вышеописанной методики. После проведенного оперативного вмешательства и последовательных манипуляций рану наглухо зашивали нитью 10/0 («Ethicon» Шотландия) и обрабатывали 5%-ным спиртовым раствором йода. Через 10 сут. после воспроизведения геморрагии, т.е. через 20 сут. с момента хронической окклюзии, животных вновь наркотизировали для выполнения транскардиальной перфузии 4%-ным раствором параформальдегида в 0,1 н фосфатном буфере (рН 7,4). Головной мозг крыс всех опытных групп использовали для изготовления фронтальных срезов для гистологического исследования. После стандартной проводки материал заливали в парафин, а срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилин-эозином [15].

Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании головного мозга крыс через 10 сут. после хронической окклюзии в правом полушарии головного мозга были выявлены фокальные участки с признаками некроза и отека нервной ткани. Выраженный отек с размозжением ткани (площадь зоны инфаркта в плоскости среза мозга в среднем $0,46 \pm 0,1$ мм²) определялся в области мозолистого тела и сенсомоторного неокортекса на уровне $L=1,0-2,5$, $H=2,0-3,0$, $AP=0,0-1,0$. В правой гемисфере в участках вышеуказанной локализации отмечены признаки ангионекроза цереброкортикальных артериол средней мозговой артерии с явлениями фокального диапедеза эритроцитов (рис. 3). Таким образом, в условиях хро-

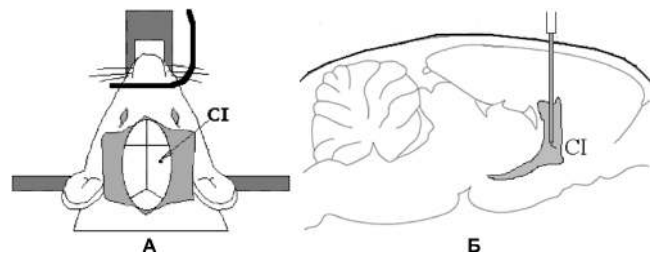


Рис. 2. Второй этап моделирования повторного локального инсульта: А — высверлено трепанационное отверстие в черепе для введения канюли с мандреном-ножом в область внутренней капсулы (CI); Б — введение канюли с мандреном-ножом в область внутренней капсулы и разрушение ткани и соответствующих сосудов внутренней капсулы, с целью формирования внутримозговой посттравматической гематомы.

нической окклюзии общей сонной артерии в ткани большого мозга [3], обнаруживаются церебральные гемодинамические нарушения, которые завершаются развитием фокального некроза ткани мозга.

При изучении головного мозга опытных крыс с геморрагическим инсультом (интрацеребральной геморрагией) во внутренней капсуле обнаруживается деструкция мозговой ткани, а также кровоизлияние в эту область. На фронтальных срезах мозга гематома локализуется в области внутренней капсулы ипсилатерального полушария (площадь гематомы в плоскости среза мозга в среднем $8,63 \pm 0,13 \text{ мм}^2$). При этом кора головного мозга повреждается несущественно (рис. 4А).

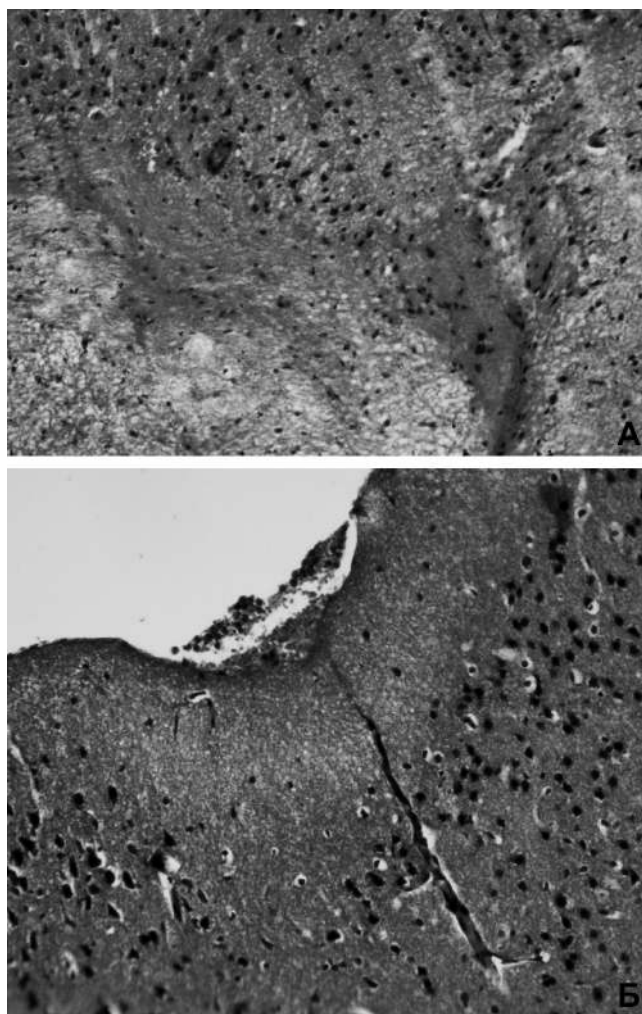


Рис. 3. Патологические изменения цереброкортикальных кровеносных сосудов и ткани мозга вследствие хронической окклюзии правой общей сонной артерии:

А — диапедез эритроцитов на границе неокортекса и мозолистого тела, отек ткани мозолистого тела; Б — фокальные некробиотические изменения в «—» слоях цереброкортекса.

Окраска: гематоксилин-эозин. Об.20, ок.10.

Метод моделирования апробирован на 40 половозрелых нелинейных крысах самцах. Забой животных проводили через 10 сут. после завершения моделирования геморрагического инсульта, или через 20 сут. после окклюзии правой общей сонной артерии. Гематомы в области правой внутренней капсулы у экспериментальных животных были однотипны (площадь гематомы в плоскости среза мозга в среднем $7,93 \pm 0,37 \text{ мм}^2$), при этом проникновения крови в желудочки мозга или в субарахноидальное пространство нами не обнаружено. Вокруг гематомы отмечены процессы активной пролиферации глиальных клеток, а в лобной доле обоих полушарий (сенсомоторного неокортекса) — гибель пирамидных нейронов (рис. 4).

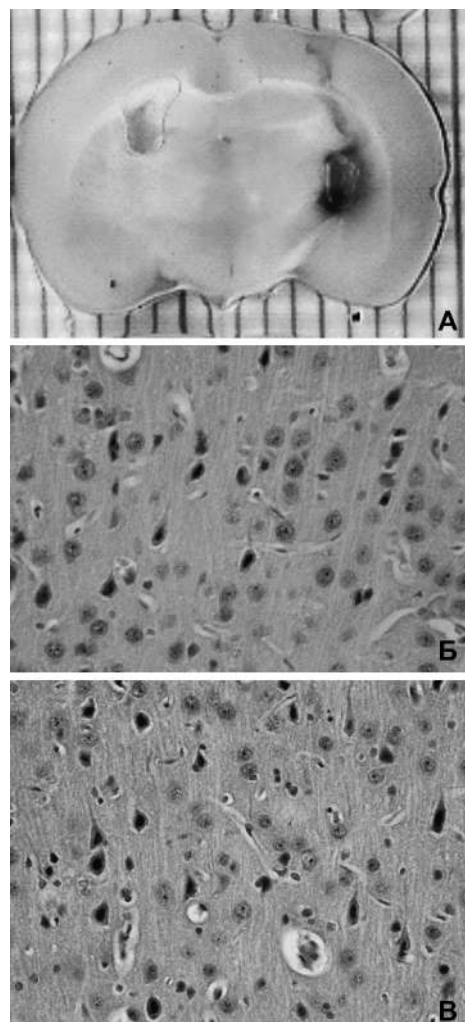


Рис. 4. Изменение в коре головного мозга животных при инсульте: А — интрацеребральная гематома (неокрашенный фронтальный срез головного мозга крысы); Б — геморрагический инсульт (интрацеребральная гематома); В — повторный инсульт (интрацеребральная гематома на фоне 10-дневной хронической окклюзии *a. carotis communis dextra*).

Окраска: гематоксилин-эозин. Об.40, ок.10.

Таким образом, модель повторного локального правополушарного геморрагического инсульта практична, максимально стандартизирована, может быть использована для воспроизведения очагов кровоизлияний и в других клеточных образованиях головного мозга. Предложенная модель максимально приближена к патогенезу острого геморрагического инсульта (геморрагии) на фоне хронической недостаточности мозгового кровообращения (ХНМК) по ишемическому типу. Новизной и отличительной особенностью модели является воспроизведение геморрагии в пределах ранее задействованного ишемическим повреждением полушария мозга.

В работах других исследователей [12] было показано, что гемодинамические нарушения в области бифуркации общей сонной артерии вызывают неврологические нарушения, в основе которых лежит развитие фокального инфаркта в цереброкортексе. В нашем исследовании было установлено развитие структурных нарушений в сенсомоторном цереброкортексе и мозолистом теле ипсилатерального полушария головного мозга крыс. Модели геморрагического инсульта уже используются в фармакологической практике для изучения особенностей действия лекарственных средств [10], но их главным недостатком является то, что гематома формируется в интактном мозге, в то время как в клинической практике на фоне артериальной гипертензии, пропитывания ранее сформированного ишемического очага или вследствие несвоевременной тромболитической терапии [13]. В данном случае наша модель позволяет избежать такого несоответствия, так как повторная ХНМК развивается на фоне уже сформированного фокального ишемического очага.

Разработанная модель может быть применена для изучения фармакологических препаратов с нейропротекторным действием.

Список литературы

1. *Бабин В.Г., Атаманчук И.Н., Давиденко Г.М.* Множественные аномально расположенные хорды на верхушке левого желудочка — этиологический и патогенетический факторы ишемического инсульта у лиц молодого возраста // Лікарська справа. — 2004. — №5-6. — С. 62-64.
2. *Воронина Т.А., Кузнецова Е.А., Гарибова Т.Л., Крайнева В.А., Макаренко А.Н., Мирзоян Г.Р., Галаева И.П., Капица И.Г., Кириченко С.В.* Эффект нооглютина у крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой (геморрагическим инсультом) // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2003. — Т. 66, №3. — С. 13-16.
3. *Ганнушкина И.В., Шафранова В.П., Рясина Т.В.* Функциональная ангиоархитектоника головного мозга. — М.: Медицина, 1977. — 240 с.
4. Геморрагический инсульт / Под ред. В.И. Скворцовой, В.В. Крыловой. — М.: Геотар-медиа, 2005. — 154 с.
5. *Легнер Э.Н., Бибелейшвили Ш.И.* Электрическая активность головного мозга при экспериментальной модели геморрагического инсульта // Электрофизиология нервной системы. — Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1963. — 226 с.
6. *Макаренко А.Н., Косицын Н.С., Пасикова Н.В., Свинов М.М.* Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга для экспериментальных целей // Журнал высшей нервной деятельности. — 2002. — Т. 52, №6. — С. 765-768.
7. *Мирзоян Р.С., Саратиков А.С., Плотников М.Б., Топчан А.В., Ганьшина Т.С.* Методологические указания по экспериментальному изучению препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Наука, 2000. — С. 159-161.
8. *Середенин С.Б., Крайнева В.А.* Нейропротекторные свойства афобазола при повторном моделировании геморрагического инсульта у старых крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2010. — №2. — С. 165-168.
9. *Суслина З.А., Пирадов М.А.* Инсульт: диагностика, лечение, профилактика. — МЕДпресс, 2009. — 288 с.
10. *Федоренко А.В., Крайнева В.А., Вальдман Е.А.* Влияние афобазола и мексидола на ориентационно-исследовательское поведение при моделировании интрацеребральной посттравматической гематомы / Материалы 5-й Междунар. Конф. «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психическим средствам» (1-4.06.2010, Москва, РФ) // Эксп. и клин. фармакол. — 2010. — Приложение. — С. 89.
11. *Шестаков В.А., Шестакова Е.В.* Противоишемическое действие Актоинвита (субстанции S-1) при экспериментальном геморрагическом инсульте // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2009. — №4. — С. 2-5.
12. *Alexis N.E., Dietrich W.D., Green E.J., Prado R., Watson B.D.* Nonocclusive common carotid artery thrombosis in the rat results in reversible sensorimotor and cognitive behavioral deficits // Stroke. — 1995. — Vol. 26(12). — P. 2338-2346.
13. *Lansberg M.G., Thijs V.N., Bammer R., Kemp S., Wijman C.A.C., Marks M.P., Albers G.W.* Risk factors of symptomatic intracerebral hemorrhage after tPA therapy for acute stroke // Stroke. — 2007. — Vol. 38, №8. — P. 2275-2278.
14. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. — Sydney: Academic Press, 1982. — 1480 p.
15. *Relton J.K., Beckey V.E., Hanson W.L., Whalley E.T.* CP-0597, a Selective Bradykinin B₂ Receptor Antagonist, Inhibits Brain Injury in a Rat Model of Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion // Stroke. — 1997. — Vol. 28. — P. 1430-1436.
16. *Rothwell P.M., Giles M.F., Flossmann E., Lovelock C.E., Redgrave J.N., Warlow C.P., Mehta Z.* A simple score (ABCD) to identify individuals at high early risk of stroke after transient ischaemic attack // Lancet. — 2005. — Vol. 366(9479). — P. 29-36.
17. *Wagner K.R., Xi G., Hua Y., Kleinholz M., de Courten-Myers G.M., Myers R.E., Broderick J.P., Brott T.G.* Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematomal white matter // Stroke. — 1996. — Vol. 27, №3. — P. 490-497.

Поступила 12.05.12