



В.І. ЦИМБАЛЮК<sup>1,2</sup>, Є.С. ЯРМОЛЮК<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут нейрохірургії  
ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», Київ

<sup>2</sup>Національний медичний університет  
ім. О.О. Богомольця, Київ

## Модифікована модель експериментального ішемічного інсульту в щурів з використанням монофіламентів із силіконовим покриттям

**Мета** — розробити надійну та відтворювану експериментальну модель фокальної церебральної ішемії шляхом перманентної монофіламентної оклюзії середньої мозкової артерії і блокування колатерального кровоплину для доклінічного дослідження методів та засобів медикаментозного і хірургічного лікування ішемічного інсульту та його наслідків.

**Матеріали і методи.** Дослідження проведено на 50 щурах, розподілених на 5 експериментальних груп (по 10 тварин у кожній): «операційний контроль» — без введення монофіламентів, контрольна — з використанням методики E. Longa та співавт., дослідна № 1 — з використанням монофіламентів Dossol, дослідна № 2 — з використанням методики E. Longa та співавт. і перев'язкою контралатеральної внутрішньої сонної артерії, дослідна № 3 — модифікована модель. Поведінкові реакції досліджували у 1-шу, а морфологічні зміни — на 3-тю добу після моделювання церебральної ішемії.

**Результати.** У групі тварин з модифікованим моделюванням фокальної церебральної ішемії відзначено виражений неврологічний дефіцит і найбільший об'єм ділянки інфаркту порівняно з тваринами інших груп.

**Висновки.** Стійкість функціональних порушень та їх кореляція з морфологічними змінами свідчать про перевагу запропонованої моделі над іншими моделями фокальної церебральної ішемії і зумовлюють можливість її використання для доклінічної апробації засобів та методів лікування пацієнтів з ішемічним інсультом.

**Ключові слова:** ішемічний інсульт, експериментальна модель, фокальна церебральна ішемія, монофіламентна оклюзія, середня мозкова артерія.

Цереброваскулярна патологія посідає одне з перших місць у структурі смертності і є найчастішою причиною інвалідизації дорослого населення у розвинених країнах [1]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), щорічно від інсульту помирає близько 5 млн людей (1 випадок на 1000 населення) [14]. Серед осіб, які вижили після інсульту, 50—70 % повертаються до активного життя і лише 20 % — до повноцінної трудової діяльності. Третина хворих, які перенесли інсульт, — це люди працездатного віку.

Ішемічний інсульт (ІІ) — одна з найпоширеніших клінічних форм гострого порушення мозкового кровообігу, на частку якої припадає близько 80—85 % у структурі судинних уражень головного моз-

ку [8, 14]. Близько третини хворих, які перенесли ІІ, мають стійкі рухові, чутливі та когнітивні порушення [8]. З позицій доказової медицини лише використання тканинного активатора плазміногену протягом перших 3 год від початку захворювання дає змогу відновити ефективну церебральну перфузію [15]. Проте, враховуючи високий ризик геморагічних ускладнень, обмеженість «терапевтичного» вікна та малодоступність тромболітизму для широкого кола пацієнтів, пошук нових ефективних і безпечних методів лікування ІІ та його наслідків залишається актуальною медико-соціальною проблемою.

Упровадження в клінічну практику новітніх медикаментозних та інтервенційних технологій є три-

валим процесом, на кожній стадії якого визначено жорсткі вимоги до статистичної вірогідності одержаних даних. Позитивні результати експериментальних досліджень нового лікарського засобу або лікувальної методики — підстава для їх подальшої клінічної апробації. Для розробки нових терапевтичних методів і засобів при ІІ необхідне розкриття патофізіологічних механізмів, які лежать в основі загибелі клітин у ділянці інфаркту мозку, та нейросудинної репарації [8, 15]. Клінічна варіабельність ІІ з точки зору причин, тривалості, локалізації та вираженості ішемії потребує залучення великих груп пацієнтів.

Моделювання ішемічного ушкодження головного мозку — необхідна умова для апробації методів лікування хворих з ІІ. Використання експериментальних моделей *in vivo* дає змогу уникнути статистичних похибок завдяки контролю варіабельних чинників і можливості вивчення окремих аспектів патогенезу та засобів терапевтичного впливу при ІІ [9]. Моделі ІІ — це основа для визначення механізмів клітинної загибелі та нейрональної репарації *in vivo*, а також для первинного вивчення нейропротекторних агентів. У зв'язку з цим розроблено експериментальні моделі фокальної церебральної ішемії (ФЦІ), які відображують основні зміни, що виникають при ІІ у людини, та є об'єктом дослідження еволюції ділянки ішемічного ушкодження й випробування нових лікувальних методик.

Першою спробою моделювання ІІ можна вважати введення емболів у судинне русло головного мозку близько 160 років тому [10]. На сьогодні запропоновано велику кількість моделей ішемії головного мозку, які умовно можна розподілити на дві групи: моделі глобальної і фокальної церебральної ішемії (ФЦІ). Оскільки ІІ — це локальне ураження тканин головного мозку, саме моделі ФЦІ використовують для вивчення методів його лікування [9].

Рутинно використовують близько 10 моделей ІІ, які варіюють за подібністю до ІІ у людини. Їх застосовують для дослідження механізмів нейрональної альтерації та репарації [19].

ІІ у людини є гетерогенним за своєю природою, може спричинятися оклюзією артеріол, дрібних судин або артерій великого діаметра, а також артеріо-артеріальною або кардіальною емболією [6]. Кожне джерело інсульту асоціюється з різними механізмами та розмірами інфаркту — від лакунарного інсульту й захворювання дрібних судин до великих клиноподібних кортикальних і субкортикальних вогнищ при емболічному інсульті [6, 10]. Незважаючи на це, масштабні клінічні випробування та застосування рутинних ангиографічних і нейровізуалізаційних методів обстеження допомогли визначити загальні характеристики інсульту в людини. Більшість з них можуть бути відтворені за допомогою тваринних моделей інсульту. Так, було розроблено концепцію еволюції ішемічного ушкодження, при

якій клітинна загибель або стресова відповідь прогресують після первинної альтерації, а також концепцію ішемічної пенумбри [5].

Запропоновано велику кількість експериментальних моделей, які мають на меті відтворити різноманітні патологічні стани або механізми ІІ в людини. Таке розмаїття свідчить про відсутність ідеальної моделі, яка б повною мірою відповідала вимогам дослідників.

Фізіологічна, міжвидова і популяційна варіабельність, використання різних засобів та способів для моделювання судинної оклюзії, велика кількість методів оцінки ступеня оклюзії та морфологічних змін і функціональних наслідків у тварин — це чинники, які обмежують безпосередню клінічну екстраполяцію даних [4]. У зв'язку з цим експериментальна модель повинна бути ретельно відібрана відповідно до клінічного завдання, а рекомендації, розроблені за результатами дослідження, слід застосовувати з урахуванням досліджуваного патофізіологічного механізму [5, 6]. Подібність до патофізіологічних механізмів, які спостерігають при ІІ в людини, відтворюваність, технічна простота та малі інвазивність, можливість застосування у кількох видів тварин і раціональне використання матеріальних коштів та зусиль — це основні умови для розробки моделі ФЦІ [3].

Стандартизація експериментальних процедур і уніфікація підходів до оцінки результатів лабораторних досліджень згідно з рекомендаціями SFES (Society for Experimental Stroke) дають змогу проводити раціональну клінічну інтерпретацію експериментальних даних [12].

Моделювання ІІ можна здійснювати на різних видах тварин. Використання приматів, котів та собак як піддослідних тварин дає змогу застосовувати мультимодальний моніторинг фізіологічних параметрів, зокрема аналіз ЕЕГ і викликаних потенціалів, а також методи нейровізуалізації [16]. Макроскопічна будова кори півкуль мозку у великих тварин більш подібна до такої у людини, що свідчить про подібність структури та функції їх головного мозку до мозку людини. Водночас інвазивність хірургічних втручань, висока вартість і морально-етичні застереження суттєво обмежують моделювання ФЦІ на тваринах великих розмірів.

Гризуні належать до найпридатніших експериментальних об'єктів. Це зумовлено такими чинниками: 1) подібність анатомічних структур, зокрема судинної системи головного мозку, та фізіологічних процесів у гризунів і людини; 2) зручність утримання тварин у лабораторних умовах; 3) простота виконання, анестезії та хірургічних маніпуляцій; 4) невелика вартість; 5) незначна вартість і простота забору, зберігання та дослідження тканин; 7) можливість здійснення генетичних маніпуляцій, особливо у мишей; 8) етична прийнятність дослідів [3, 5, 12].

Розмаїття механізмів II у людини ускладнює вибір ідеальної тваринної моделі, на якій можна вивчити більшість аспектів II. Різноманітність моделей інсульту дає змогу обрати найадекватнішу відповідно до завдань експерименту. Оскільки II часто спричиняє оклюзія середньої мозкової артерії (СМА) або однієї з її гілок, то найпридатнішими для експериментального моделювання є моделі ізольованої оклюзії СМА (ІОСМА) або оклюзії судин у басейні СМА [20].

Таким чином, дослідження, пов'язані з тестуванням нових нейропротекторних препаратів або методів відновного лікування, мають використовувати експериментальні моделі ІОСМА.

Залежно від мети та завдань дослідження, моделі ФЦІ можна умовно розподілити на моделі клітинного ушкодження та моделі структурно-функціонального відновлення після інсульту, а також моделі ішемічного прекодиціонування і толерантності [16, 20]. За тривалістю та вираженістю ішемії розрізняють постійну і тимчасову оклюзію [3, 16], за механізмом — моделі ендovasкулярної та прямої хірургічної оклюзії, тромбоемболічні моделі, моделі з використанням фізичного (фотохімічний тромбоз) і фармакологічного (ендотелін-індукованого) методу виключення судини з кровоплину [4, 20].

Тромбоемболічна модель з використанням автologічних тромбів найповніше відтворює тромбоемболічний інсульт у людини та найкраще підходить для доклінічного тестування тромболітиків. Водночас спонтанна реканалізація та висока варіабельність зони інфаркту роблять її менш привабливою з точки зору статистичної вірогідності одержаних результатів при дослідженні дії нейропротекторних агентів і клітинної терапії [16, 20]. Використання як емболів різних хімічних композицій, включаючи мікрочастинки, також широко застосовують в експерименті, незважаючи на мультифакторність і гетерогенність ішемічного ураження.

Найменш інвазивні фототромботична та ендотелінова моделі [17, 20]. Перша передбачає систему ін'єкцію фотоактивної речовини (найчастіше — бенгальського рожевого) з подальшою іррадіацією поверхні мозку крізь інтактний череп або хірургічно виділену СМА джерелом світла з певною довжиною хвилі [17]. Це спричиняє фокальну деструкцію ендотелію, активацію та агрегацію тромбоцитів як піальних, так і внутрішньомозкових судин у межах опроміненої ділянки.

Ендотелін-1 — потужний вазоактивний пептид, який має здатність зв'язуватися з рецепторами різних церебральних судин і спричиняти виражену вазоконстрикцію. Аплікацію ендотеліну-1 можна проводити безпосередньо на СМА або в прилеглі до СМА ділянки за допомогою стереотаксичної інтрацеребральної ін'єкції чи на поверхню кори мозку [7]. Можливість відтворення мозкового інфаркту у будь-якій зоні кори та контролю розмірів і локалі-

зації вогнища ураження — важливі переваги зазначених моделей. Водночас мала подібність до патофізіологічних процесів при II у людини, а також недостатній контроль тривалості й вираженості ішемії (ендотелінова модель) роблять їх менш популярними порівняно з моделями монофіламентної та прямої хірургічної оклюзії СМА [7, 17].

Екстракраніальна оклюзія сонної або хребтової артерії без подальшої хірургічної інтервенції або індукованої артеріальної гіпотензії не призводить до розвитку II у гризунів завдяки колатеральному кровоплину, який забезпечується вілізієвим колом. Винятком є монгольські гербіли, в яких роз'єднане вілізієве коло, і шури зі спонтанною гіпертензією та недостатньо розвиненими колатералами [3, 4]. У зв'язку з цим запропоновано методи селективної оклюзії СМА шляхом краніотомії або введення спеціальних оклюдерів у просвіт артерії.

У 1981 р. А. Tamura та співавт. запропонували модель перманентної ФЦІ у шурів шляхом субтемпоральної краніотомії та коагуляції СМА на поверхні кори мозку, що призводило до розвитку вогнищ інфаркту в корі мозку і смугастому тілі [18]. У подальшому розроблено методики тимчасової оклюзії СМА з використанням мікрокліпс і лігатур [4, 20]. Тандемна оклюзія дистального відділу СМА і обох загальних сонних артерій (трьюхсудинна модель) у різних варіантах (постійна або тимчасова оклюзія) спричиняє розвиток великих неокортикальних інфарктів з незначною варіабельністю розмірів вогнища ушкодження [16, 20]. Хірургічні моделі характеризуються можливістю контролю місця оклюзії СМА (проксимально або дистально) і розмірів зони ушкодження, тривалим виживанням тварин у разі невеликих розмірів вогнища ішемії. Недоліками цієї групи моделей є інвазивність і пов'язана з нею залежність від технічних навичок хірурга [12].

На сьогодні найпоширеніша модель ФЦІ — це ендovasкулярна оклюзія СМА, яка передбачає введення монофіламентної нитки у просвіт внутрішньої сонної артерії до ділянки відгалуження передньої мозкової артерії, що блокує кровоплин у СМА [11]. Ця модель характеризується розвитком відтворюваних вогнищ інфаркту в басейні СМА (включаючи фронто-парієтальну кору і латеральний каудопутамен), подібних до тих, які спостерігаються після проксимальної електрокоагуляції СМА [11, 20]. Важлива особливість моделі — відносна простота маніпуляцій і контрольоване відтворення як постійної, так і тимчасової ішемії, що дає змогу дослідникам вивчати ефекти реперфузії на еволюцію зони ішемічного ушкодження. Крім того, інтралюмінальна монофіламентна оклюзія СМА придатна для вивчення нейропротекторних речовин завдяки достатнім розмірам зони пенумбри у межах 60—90-хвилинної оклюзії [7].

Припинення кровоплину в басейні СМА підтверджується даними лазерної доплерівської

флоуметрії. З моменту першого опису інтралюмінальної ІОСМА J. Koizumi та співавт. запроповано багато модифікацій цього методу [11, 20]. Монофіламентну оклюзію СМА, вперше здійснену J. Koizumi (1986), у різних модифікаціях використовують у багатьох лабораторіях. Вона рекомендована SFES для проведення доклінічних випробувань лікарських речовин і генно-клітинних технологій при II [11, 12]. Ця модель відтворює умови, близькі до патофізіологічних при II у людей. Монофіламентну нитку можна вводити крізь загальну або зовнішню сонну артерію. Відтворюваність зони ураження залежить від багатьох чинників: діаметр нитки, покриття (силіконове чи полі-Л-лізінове), довжина введення нитки, додаткова оклюзія екстракраніальних артерій, температура тіла тварини, рівень глюкози та парціальний тиск газів у крові, системний артеріальний тиск тощо [7, 12, 20]. Оклюдери можуть бути виготовлені в умовах виробництва або кустарним способом (нагрівання кінчика нитки, напilenня різних речовин) з розмірами відповідно до виду та маси тіла тварини, яку використовують в експерименті. Незважаючи на зазначені переваги, використання оклюдерів асоціюється з ризиком розриву судини, субарахноїдального крововиливу, гіпертермії, пов'язаної з блокуванням гіпоталамічної артерії [16, 17, 20]. Недостатня оклюзія є недоліком цієї моделі. Використання комерційно виготовлених ниток із силіконовим покриттям і контроль кровоплину в басейні СМА за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії дають змогу звести до мінімуму кількість ускладнень і досягти задовільної відтворюваності вогнищ церебральної ішемії [17]. Доведено, що застосування оклюдерів, покритих адгезивами, сприяє зменшенню частоти ускладнень (субарахноїдальний крововилив) і підвищенню надійності оклюзії [3]. Комерційно виготовлені монофіламенти із силіконовим покриттям рекомендовані SFES для використання у доклінічних випробуваннях [12, 17].

Фізико-механічні властивості оклюдерів, особливості хірургічної техніки та правильний вибір експериментальних тварин — це ключові чинники, які визначають кінцевий результат моделювання — розвиток II певних розмірів і локалізації, який виявляється стійким вираженням функціональним дефектом [20]. При цьому коливання розмірів ділянки ішемічного ушкодження та ступеня неврологічних порушень у лабораторних тварин повинні бути мінімальними.

Важливий нюанс хірургічної техніки при інтралюмінальній оклюзії СМА — виключення колатерального кровоплину, чого досягають коагуляцією та перев'язкою гілок зовнішньої сонної (ЗоСА) та крилопіднебінної (екстракраніальна гілка внутрішньої сонної артерії) артерії за методикою E. Longa та співавт. [13]. Проте ці методики не дають змоги виключити колатеральний кровоплин через передню та задню сполучні артерії.

**Мета роботи** — розробити надійну та відтворювану експериментальну модель фокальної церебральної ішемії шляхом перманентної монофіламентної оклюзії СМА і блокування колатерального кровоплину для доклінічного дослідження методів та засобів медикаментозного і хірургічного лікування ішемічного інсульту та його наслідків.

### Матеріали і методи

Дослідження провели на білих безпородних щурах-самцях з масою тіла 280—320 г. Середній вік тварин — 4—5 міс. Усі експерименти проводили відповідно до «Правил виконання робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених МОЗ України. Сформовано такі експериментальні групи тварин: група «операційний контроль», в якій здійснювали всі хірургічні маніпуляції, за винятком введення монофіламенту ( $n = 10$ ); контрольна група — тваринам цієї групи моделювали перманентну ІОСМА за методикою E. Longa та співавт. з використанням кустарно виготовлених монофіламентів ( $n = 10$ ); дослідна група № 1, тваринам якої проводили ІОСМА з використанням монофіламентів із силіконовим покриттям ( $n = 10$ ); дослідна група № 2 — тваринам цієї групи моделювали перманентну ІОСМА за методикою E. Longa та співавт. [13] з використанням кустарно виготовлених монофіламентів і перев'язкою контралатеральної внутрішньої сонної артерії (ВСА) ( $n = 10$ ); дослідна група № 3, в якій використовували модифіковану модель ІОСМА з перев'язкою контралатеральної ВСА ( $n = 10$ ). Усі маніпуляції проводили з урахуванням норм біоетики.

Запропонована нами модель ФЦІ за допомогою інтралюмінальної монофіламентної оклюзії СМА у щурів відрізняється від традиційних методик тим, що за допомогою комерційно виготовленого монофіламентного оклюдера із силіконовим покриттям здійснюється постійна ендоваскулярна оклюзія СМА в умовах блокування колатерального кровоплину таким чином, що дистальний кінець оклюдера із силіконовим покриттям герметично блокує просвіт судини завдяки щільній адгезії силіконового покриття до ендотелію, забезпечуючи надійне виключення СМА із кровоплину і створюючи умови для розвитку гострого порушення мозкового кровообігу з формуванням чітко окресленої зони ішемічного інфаркту, що виявляється виникненням стійкого неврологічного дефіциту в піддослідних тварин.

Моделювання II здійснювали таким чином. Самців білих безпородних щурів чистої лінії з масою тіла 280—320 г утримували в умовах віварію протягом 12 год вночі без їжі, проте з вільним доступом до води. Оперативні втручання здійснювали під загальним знеболюванням, якого досягали шляхом внутрішньочеревинного введення суміші розчинів ксилазину (Sedazin, Biowet, Польща) з розрахунку 10 мг/кг

маси тіла і кетаміну (Каліпсол, Гедеон Ріхтер А.О., Угорщина) з розрахунку 75 мг/кг маси тіла.

Щура фіксували на операційному столику у положенні на спині. Після гоління шерсті в ділянці передньої поверхні шиї операційне поле обробляли розчинами антисептиків (бетадин, 70 % етиловий спирт) та ізолювали асептично. Шкіру та м'які тканини інфільтрували 0,5 % розчином новокаїну. Лінійний розріз шкіри довжиною до 3 см проводили по середній лінії від під'язикової кістки до яремної вирізки груднини. Шкіру по обидва боки відсепарували та розводили за допомогою кровоспинних затискачів. Тупим шляхом єдиним блоком виділяли виличкову та щитоподібну залози, які відводили вгору. Мікрохірургічний ранорозширювач встановлювали між груднинно-ключично-соскоподібним і двочеревцевим м'язами, а лопатково-під'язиковий м'яз коагулювали і розділяли дистально. За допомогою хірургічного мікроскопа під збільшенням  $\times 10$  виділяли праву загальну сонну артерію (ЗСА), ЗоСА та ВСА. Шляхом гострої дисекції судини звільняли від сполучної тканини та нервів.

Блукаючий нерв відділяли від ЗСА та ВСА. ЗСА і ЗоСА відводили за допомогою лігатур. Потім виділяли потиличну гілку ЗоСА, коагулювали та пересікали. Наступним кроком ізолювали верхню щитоподібну і висхідну глоткову артерії, які також коагулювали та пересікали. ЗоСА виділяли дистально і разом із кінцевими гілками (язикова та верхньощелепна артерія) коагулювали та пересікали.

При подальшій дисекції ідентифікували петлю язикоглоткового нерва у ділянці відходження крилопіднебінної артерії — екстракраніальної гілки ВСА. Останню перев'язували за допомогою поліамідної нитки Ethilon 7/0 (Ethicon, США) біля її відходження. Лігатуру Ethilon 6/0 (Ethicon, США) нещільно фіксували навколо ЗоСА біля біфуркації ЗСА. Мікросудинні тимчасові кліпси (ПТО «Медтехника», Казань, Росія) накладали на ЗСА і ВСА. ЗоСА пересікали на відстані 1—2 мм від біфуркації ЗСА (рис. 1).



Рис. 1. Інтраопераційне фото: накладено тимчасові кліпси на ЗСА і ВСА, пересічення ЗоСА

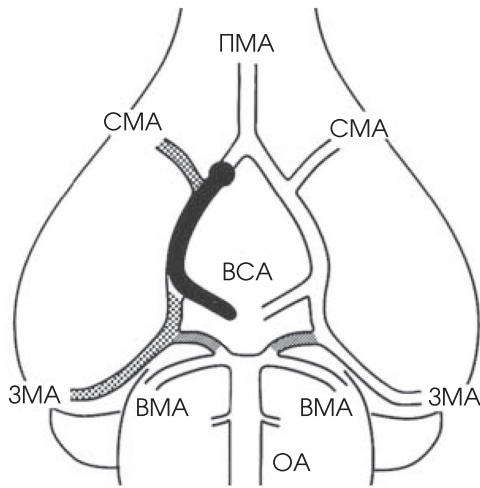
За допомогою накладеної лігатури мобілізований проксимальний кінець ЗоСА підтягували і в його просвіт вводили монофіламентний оклюдер 4/0 (Dossol corp., США) довжиною 3 см із силіконовим покриттям довжиною 5—6 мм з діаметром дистального кінця 0,38 мм та позначкою на відстані 18—20 мм від дистального кінця, нанесеною за допомогою перманентного срібного маркера. У контрольній і дослідній групі № 2 для оклюзії СМА використовували монофіламентні нитки Ethilon 4/0 (Ethicon, США), які розрізали на фрагменти довжиною 3 см, після чого кінчик нитки нагрівали на спиртовій горілці таким чином, щоб утворилося потовщення округлої форми з діаметром 0,37—0,39 мм. Після введення дистального кінця оклюдера у ВСА, лігатуру на куксі ЗоСА щільно затягували, фіксуючи монофіламент у просвіті судини (рис. 2). Кліпси знімали і оклюдер вводили інтракраніально до відчуття легкого опору, який зазвичай виникав при введенні 18—20 мм монофіламенту (срібна позначка) і свідчив про його потраплення у просвіт передньої мозкової артерії та блокування СМА (рис. 3).

Після цього у тварин дослідних груп № 2 і № 3 виділяли та перев'язували контралатеральну ЗСА. Кінець оклюдера відсікали, рану зашивали пошарово нитками Prolen 4/0 (Ethicon, США). Лінію швів обробляли антисептиками. Моделювання ЮСМА здійснювали протягом 25—30 хв.

Після закінчення маніпуляцій тварин протягом 2—4 год утримували в приміщенні з підвищеною температурою повітря (30—33 °С) до повного пробудження, що є необхідною вимогою з огляду на застосування ксилазину. У подальшому прооперованих тварин утримували у спеціальних клітках, по 3—6 особини у кожній, при середній температурі у приміщенні 21—24 °С, з періодичною вентиляцією. Тварини мали вільний доступ до води та їжі. Протягом першого тижня після операції щодня проводили заміну тирсової підкладки, далі — тричі на тиждень.



Рис. 2. Інтраопераційне фото: монофіламентну нитку введено у просвіт ВСА



**Рис. 3.** Схема розташування оклюдера у просвіті внутрішньої сонної артерії (7): ПМА — передня мозкова артерія; ЗМА — задня мозкова артерія; ВМА — верхня мозочкова артерія; ОА — основна артерія

Загальна летальність за період проведення експериментального дослідження не перевищувала 25 % і була зумовлена переважно загибеллю тварин протягом перших 3 діб після проведення оперативного втручання внаслідок формування масивного вогнища інфаркту мозку зі значним перифокальним набряком і дислокацією серединних структур. Загиблих тварин до експериментальних груп не включали.

Вираженість неврологічного дефіциту у тварин оцінювали на 1-шу добу за допомогою шкали J. Bederson та співавт. [2]. Ця шкала дає змогу оцінити головну ознаку фокальної ішемії — флексію контралатеральної кінцівки, яка є особливо чутливою до ушкодження смугастого тіла.

Оцінку проводили таким чином. Щура обережно піднімали за хвіст на висоту до 1 м над підлогою та спостерігали флексію кінцівок. Інтактний щур симетрично витягує обидві кінцівки у напрямку до горизонтальної поверхні (0 балів). Легкий дефіцит визначають у разі тоничної флексії кінцівки на протилежному боці ураження (1 бал). При цьому положення ураженої кінцівки варіює від помірної флексії зап'ястка та приведення плеча з екстензією в ліктьовому суглобі до повної флексії зап'ястка, ліктьового суглоба, приведення та внутрішньої ротації плеча.

Далі щура поміщали на великий аркуш м'якого, вкритого пластиком лабораторного паперу, який щур міг міцно вхопити за допомогою кігтів. Піднімаючи щура за хвіст, робили легкий латеральний поштовх позаду плеча тварини так, щоб передні лапи щура сковзнули по паперу на кілька сантиметрів. Цю маніпуляцію повторювали кілька разів у різних напрямках. Інтактні щури або щури з лег-

ким дефіцитом демонстрували однакову резистентність до поштовху в обох напрямках. При помірній дисфункції спостерігали знижену резистентність до латерального поштовху (2 бали). У подальшому щура відпускали, дозволяли йому вільно рухатися і визначали наявність циркумдукції. У щурів, які оберталися у паретичний бік, відзначали виражений дефіцит (3 бали).

Кількісне морфологічне дослідження проводили у 20 тварин (по 5 з контрольної та дослідних груп) на 3-тю добу після ЮСМА. Тварин знеболювали сумішшю Каліпсола (75 мг/кг маси тіла) та ксилазину (10 мг/кг маси тіла) внутрішньоочеревинно і проводили прижиттєву фіксацію тканин за допомогою транскардіальної перфузії. Передню черевну стінку розсікали лінійним розрізом від пупка до мечоподібного відростка, а також розсікали діафрагму. Утримуючи мечоподібний відросток за допомогою затискачів, V-подібно у напрямку до пахвових ямок розсікали грудну клітку. Мечоподібний відросток відводили роstralно та візуалізували грудну порожнину. Видаляли сполучну тканину навколо серця таким чином, щоб серце можна було утримувати між пальцями верхівкою донизу. Перфузійну голку 22 G вводили крізь верхівку серця в лівий шлуночок та просували до аорти так, щоб кінчик голки можна було бачити в дузі аорти (рис. 4). Надсікали стінку правого передсердя, даючи вихід венозній крові. В аорту вводили близько 200 мл холодного 0,9 % розчину натрію під тиском близько 100 мм рт. ст. Перфузію продовжували доти, доки рідина, яка витікала з серця, не ставала прозорою. Далі проводили декапітацію тварини за допомогою гострих ножиць і видаляли мозок. Останній відмивали у чашці Петрі з фізіологічним розчином. За допомогою вібратора робили корональні зрізи товщиною 2 мм, які поміщали у 2 % розчин 2,3,5-трифенілтетразолію хлориду (ТТС, Sigma, США) на 15 хв при температурі 37 °С. Після цього зрізи вий-



**Рис. 4.** Інтраопераційне фото: транскардіальна перфузія щура. Голку введено у порожнину лівого шлуночка



**Рис. 5.** Фотознімки гістологічних зрізів після їх фарбування ТТС через 72 год після оклюзії правої СМА. Незабарвлені ділянки зрізів — це зона інфаркту. Біла речовина (мозолисте тіло) не зафарбовується в інтактних ділянках мозку

мали, викладали на міліметровий папір і фотографували за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot A710 IS (Японія).

Цифрову обробку зображень та планіметричний аналіз розмірів вогнища інфаркту проводили за допомогою програми Adobe Photoshop CS 5 (Adobe Systems Inc., США, <http://www.adobe.com>).

ТТС — це жовтуватий порошок, за хімічною структурою — протонний акцептор для багатьох піридинових нуклеотид-зв'язаних ензимів-дегідрогеназ (наприклад сукцинат-дегідрогенази). Розчин ТТС у 0,9 % розчині натрію хлориду за температури 37 °С є безбарвним, проте у живій тканині мозку під впливом мітохондріальних дегідрогеназ ця речовина відновлюється до червоного ліпід-розчинного формазану, тоді як нежива тканина чи ділянка інфаркту залишаються незабарвленими [12]. Це дає змогу легко відмежувати зону ішемії від інтактної мозкової речовини (рис. 5).

Оскільки збільшення інфарктної тканини за рахунок набряку та її зменшення за рахунок зморщування можуть призвести до переоцінки або недооцінки об'єму зони інфаркту, проводили розрахунок коригованої площі зони інфаркту на зрізі за формулою:

$$S_1 = S_{1TC} - S_{1Ni},$$

де  $S_1$  — коригована площа зони інфаркту;  $S_{1TC}$  — загальна площа контралатеральної (інтактної півкулі);  $S_{1Ni}$  — ділянка інтактної тканини в ураженій півкулі мозку.

Скориговану величину об'єму інфаркту одержували за допомогою формули:

$$V = \sum S_1 n_1$$

де  $S_1$  — коригована площа зони інфаркту;  $n_1$  — товщина зрізу;  $\sum$  — сума добутків коригованої площі інфаркту на товщину зрізу (залежно від кількості зрізів).

Статистичну обробку первинних цифрових експериментальних даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0.

Дані морфометричних досліджень наведено у вигляді ( $M \pm m$ ), де  $M$  — середнє значення, а  $m$  — стандартна середня похибка. Для порівняльної оцінки результатів моніторингу неврологічних функцій, вираженої у балах за шкалою J. Bederson та співавт., та встановлення вірогідності різниці показників між порівнюваними групами і підгрупами використовували непараметричний аналіз рангів Крускала — Уолліса для багатьох груп. Відмінності вважали статистично значущими за умови  $p < 0,05$ .

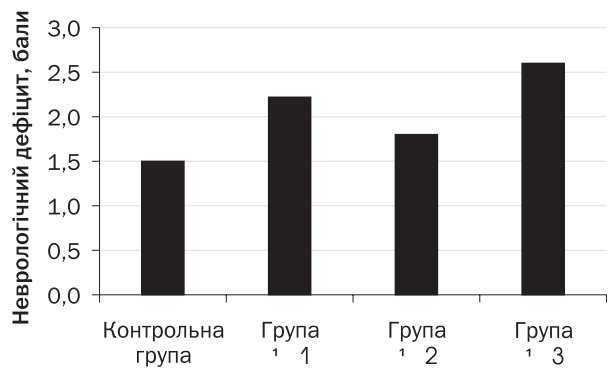
### Результати та обговорення

За даними літератури, максимально виражені функціональні порушення в експериментальних тварин спостерігають наприкінці 1-ї доби після індукції ІОСМА [3, 16, 17]. З огляду на це оцінку неврологічної симптоматики, відповідно до методики, запропонованої J. Bederson та співавт., проводили через 24 год після оклюзії СМА (рис. 6).

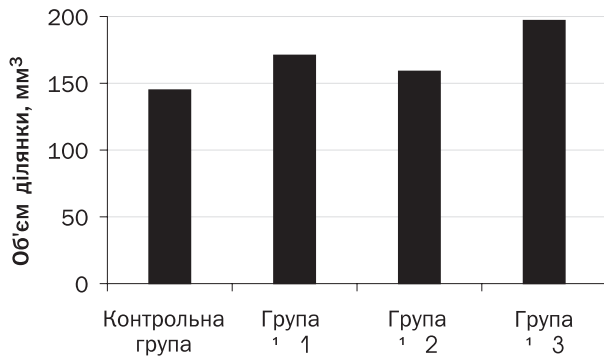
Найвираженіший неврологічний дефіцит у вигляді стійкої циркумдукції та зниженої резистентності до бічного поштовху відзначено в дослідній групі № 3 (середній показник — 2,6 бала), тоді як у контрольній групі та в дослідній групі № 2 цей показник був меншим (1,5 і 1,8 бала відповідно,  $p < 0,05$ ), дослідній групі № 1 — становив 2,2 бала.

Таким чином, результати функціонального тестування свідчать про перевагу використання комерційно виготовлених оклюдерів із силіконовим покриттям над оклюдерами, виготовленими кустарним методом. При цьому навіть виключення колатералей відіграє меншу роль порівняно з надійністю оклюзії СМА.

Як свідчать численні дослідження, на 3-тю добу після ІОСМА спостерігається чітко окреслена зона ішемічного ушкодження, при цьому зона перифокального набряку менш виражена, ніж на 1-шу—2-гу добу [16, 18, 20]. З огляду на дані літератури, морфометричну оцінку розмірів зони ураження проводили через 72 год з моменту оклюзії (рис. 7).



**Рис. 6.** Вираженість неврологічного дефіциту за шкалою J. Bederson та співавт. у щурів різних експериментальних груп наприкінці 1-ї доби після моделювання ІІ



**Рис. 7.** Об'єм ділянки ішемічного ушкодження у тварин різних експериментальних груп наприкінці 3-ї доби після ІОСМА

Фарбування ТТС виявило значне переважання об'єму ділянки інфаркту в дослідній групі № 3 (198 мм<sup>3</sup>) над відповідними величинами в інших групах тварин. Розміри зони ураження в контрольній групі і дослідній групі № 2 виявилися статистично незначущими (144 і 156 мм<sup>3</sup> відповідно,  $p > 0,05$ ), на відміну від дослідної групи № 1 (172 мм<sup>3</sup>,  $p < 0,05$ ).

Одержані дані корелюють із показниками неврологічного дефіциту, які підтверджують ефективність експериментального відтворення ІІ за допомогою модифікованої моделі.

Запропонована нами модель передбачає використання комерційно виготовлених силіконових монофіламентів (Dossol corp., США) для перманентної оклюзії СМА в умовах виключення колатерального кровоплину завдяки блокуванню гілок ЗоСА,

крилопіднебінної гілки ВСА та перев'язки контра-латеральної ЗСА.

Порівняно із моделями J. Koizumi та E. Longa, запропонована модель має низку переваг: 1) надійно блокується просвіт СМА; 2) виключається колатеральний кровоплин крізь передню сполучну артерію; 3) виникає чітко окреслена зона ішемічного інфаркту в корі головного мозку та смугастому тілі щурів; 4) у піддослідних тварин виникає виражений стійкий неврологічний дефіцит; 5) зменшується варіабельність розмірів зони ішемічного ушкодження та функціонального дефекту в піддослідних тварин; 6) підвищується статистична вірогідність одержаних даних.

### Висновки

Використана в нашому дослідженні модифікована модель ФЦІ шляхом монофіламентної оклюзії середньої мозкової артерії в щурів є однією з найпоширеніших моделей експериментального ІІ, рекомендованих для застосування в лабораторних умовах SFES. Модифікація моделі стосується використання комерційно виготовлених монофіламентів із силіконовим покриттям і виключення колатеральних шляхів кровоплину при перманентній оклюзії. Запропонована модифікація моделі ІОСМА дає змогу усунути ефекти реперфузійного ушкодження та досягти повноти оклюзії і формування вогнища ішемії відтворюваних розмірів та локалізації, що виявляється суттєвим неврологічним дефіцитом.

Проведені нами дослідження свідчать про перспективність використання цієї моделі для вивчення фундаментальних механізмів нейрорепарації та апробації нових методик лікування при ІІ.

### Література

1. Віничук С.М., Прокопів М.М. Гострий ішемічний інсульт.— К., 2006.— 286 с.
2. Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M. et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination // *Stroke*.— 1986.— Vol. 17.— P. 472—476.
3. Belayev L., Endres M., Prinz V. Focal cerebral ischemia in the mouse and rat using the intraluminal suture-filament model // *Neuromethods* / Ed. by Ulrich Dirnagl.— Berlin: Humana Press, 2010.— 286 p.
4. Braeuninger S., Kleinschnitz C. Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems // *Exp. Trans. Stroke Med.*— 2009.— Vol. 1, N 8.— P. 1—8.
5. Carmichael S.T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose // *NeuroRx: The Journal of the American Society for Exp. NeuroTher.*— 2005.— Vol. 2.— P. 396—409.
6. Durukan A., Strbian D., Tatlisumak T. Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for drug development // *Curr. Pharm. Design.*— 2008.— Vol. 14.— P. 359—370.
7. Durukan A., Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia // *Pharmacol., Biochem. Behavior.*— 2007.— Vol. 87.— P. 179—197.
8. Fisher M., Feuerstein G., Howells D.W. et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations // *Stroke*.— 2009.— Vol. 40.— P. 2244—2250.
9. Hossmann K.A. Experimental models for the investigation of brain ischemia // *Cardiovasc. Research.*— 1998.— Vol. 39.— P. 106—120.
10. Howell D.W., Porritt M.J., Rewell S.S.J. et al. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia // *J. Cerebr. Blood Flow Metabolism.*— 2010.— P. 1—20.
11. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T. et al. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area // *Jpn. Stroke J.*— 1986.— Vol. 8.— P. 1—8.
12. Liu S., Zhen G., Meloni B.P. et al. Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1st edition) // *Exp. Stroke Transl. Med.*— 2009.— Vol. 2, N 2.— P. 2—27.
13. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S. et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats // *Stroke*.— 1989.— Vol. 20.— P. 84—91.
14. Savitz S.I., Fisher M. Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials // *Ann. Neurol.*— 2007.— Vol. 5.— P. 396—402.
15. Sicard K.M., Fisher M. Animal models of focal brain ischemia // *Exp. Trans. Stroke Med.*— 2009.— Vol. 1, N 7.— P. 1—6.



16. Sicard K.M., Henninger N., Fisher M. et al. Long term changes of functional MRI-based brain function, behavioral status, and histopathology after transient focal cerebral ischemia in rats // *Stroke*.— 2006.— Vol. 10.— P. 2593—2600.
17. Smrcka M., Otevre F., Kuchtickova S. et al. Experimental model of reversible focal cerebral ischemia in the rat // *Scripta medica (Brno)*.— 2001.— Vol. 74, N 6.— P. 391—398.
18. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J. et al. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion // *J. Cereb. Blood Flow Metab.*— 1981.— Vol. 1.— P. 53—60.
19. Traystman R.J. Animal models of focal and global cerebral ischemia // 2003.— Vol. 44, N 2.— P. 85—95.
20. Woitzik J., Schneide U.C., Thome C. et al. Comparison of different intravascular thread occlusion models for experimental stroke in rats // *J. Neurosci. Methods*.— 2006.— Vol. 151, N 2.— P. 224—231.

В.И. ЦЫМБАЛЮК, Е.С. ЯРМОЛЮК

## Модифицированная модель экспериментального ишемического инсульта у крыс с использованием монофиламентов с силиконовым покрытием

**Цель** — разработать надежную и воспроизводимую экспериментальную модель фокальной церебральной ишемии путем перманентной монофиламентной окклюзии средней мозговой артерии и блокирования коллатерального кровотока для доклинического исследования методов и средств медикаментозного и хирургического лечения ишемического инсульта и его последствий.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 50 крысах, разделенных на 5 экспериментальных групп (по 10 животных в каждой): «операционный контроль» — без введения монофиламентов, контрольная — с использованием методики E. Longa и соавт., опытная № 1 — с использованием монофиламентов Doccol, опытная № 2 — с использованием методики E. Longa и соавт. и перевязкой контралатеральной внутренней сонной артерии, опытная № 3 — модифицированная модель. Поведенческие реакции исследовали на 1-е, а морфологические изменения — на 3-и сутки после моделирования церебральной ишемии.

**Результаты.** В группе животных с модифицированным моделированием фокальной церебральной ишемии отмечен выраженный неврологический дефицит и наибольший объем участка инфаркта по сравнению с животными других групп.

**Выводы.** Стойкость функциональных нарушений и их корреляция с морфологическими изменениями свидетельствуют о преимуществе данной модели перед другими моделями фокальной церебральной ишемии и обуславливают возможность ее использования для доклинической апробации средств и методов лечения больных с ишемическим инсультом.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, экспериментальная модель, фокальная церебральная ишемия, монофиламентная окклюзия, средняя мозговая артерия.

V.I. TSYMBALIUK, Ye.S. YARMOLIUK

## A modified model of experimental ischemic stroke in rats using silicone-coated monofilaments

**Objective** – to develop reliable and reproducible experimental model of focal cerebral ischemia via permanent monofilament MCA occlusion with blocking collateral flow for subsequent preclinical investigation of methods and sources for pharmacological and surgical treatment of stroke and its consequences.

**Methods and subjects.** Experiments were performed on 50 rats, divided into 5 groups (each consisted of 10 animals): «sham-operated», control, where Longa's procedure was employed, experimental № 1 – the same as previous, but using Doccol monofilaments, experimental № 2 – Longa's procedure with CCA occlusion, experimental № 3 – modified model. Neurological assessment was performed after 24 hours and histological sections were prepared after 72 hours of occlusion.

**Results.** Animals with modified model of focal cerebral ischemia demonstrated the highest score of neurological deficit and the largest volume of infarction comparing to control and other experimental groups.

**Conclusions.** Persistent functional impairment and its correlation with morphological changes indicate the advantage of this model over the other models of focal cerebral ischemia and imply its use for preclinical investigation of sources and methods of treatment for patients with ischemic stroke.

**Key words:** ischemic stroke, experimental model, focal cerebral ischemia, monofilament occlusion, middle cerebral artery.