

© Савосько С.І.

УДК: 615.45:615.033

Савосько С.І.

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця (б-р Шевченка, 13, м. Київ, 01004, Україна)

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ ПОВТОРНОГО ЛОКАЛЬНОГО ІНСУЛЬТУ

Резюме. З метою вивчення процесів, що розвиваються при ускладненому інсульті та розробки підходів до їх фармакотерапії, нами розроблений і пропонується стандартизований метод відтворення в експерименті повторного інсульту на дрібних лабораторних тварин, придатний для використання не тільки в гострих, але і в хронічних дослідженнях. Особливістю даного варіанту відтворення повторного інсульту полягає в моделюванні аутогеморрагічного одностороннього інсульту шляхом механічного пошкодження тканини мозку після 10-денного періоду оклюзії правої загальної сонної артерії. Модель зручна для відтворення повторного порушення церебральної гемодинаміки, є більш адекватною формою моделювання гострої і хронічної цереброваскулярної патології, ніж самостійне використання локального крововиливи аутокрові у структури мозку інтактних тварин. За морфологічними і патофізіологічними характеристиками модель наближається до клінічних варіантів розвитку і перебігу гострого геморагічного інсульту після попередньої транзиторної ішемічної атаки.

Ключові слова: повторний інсульт, метод моделювання, патоморфологічні зміни, головний мозок.

Вступ

Лікування порушень мозкового кровообігу являє собою одну з найактуальніших проблем сучасної медицини. Щорічно в світі гострі порушення мозкового кровообігу реєструються у більш, ніж у 6 млн. чоловік, у 700-750 тис. - в США, понад 450 тис. - в Росії і близько 175 тис. - в Україні [Бабин, 2004]. В даний час загальноприйнятим є твердження, що локальний гострий експериментальний інсульт, відтворений у інтактних тварин, є адекватною моделлю для дослідження процесів, що розвиваються при даній цереброваскулярній патології, особливостей їх корекції лікарськими засобами та розробки нових фармакологічних засобів.

В даний час розроблені різні методи моделювання гострого геморагічного інсульту [Легнер, 1963]. Переважна їх більшість зосереджена на дослідженні ішемічних типів інсульту різної локалізації, в той час як геморагічному інсульту присвячено лише декілька моделей. Раніше розроблений метод локального крововиливу (гострого аутогеморагічного інсульту) [Макаренко, 2002] широко використовується різними фахівцями в області фармакології і патофізіології [Воронина, 2003; Скворцова, 2005; Середенин, 2010]. Проте відтворення геморагічного інсульту у інтактних тварин є не доцільним, оскільки це суперечить даним фахової літератури, в якій неодноразово підкреслюється, що геморагічний інсульт розвивається на тлі гіпертонічної хвороби, патології церебральних судин, або геморагічної трансформації ішемічного інсульту (за типом змішаного інсульту) [Wagner, 1996].

У даній роботі нами пропонується нова і раніше не описана модель відтворення повторного церебрального інсульту. Основною вимогою при її розробці було максимальне наближення або відповідність умовам і особливостям патогенезу даної патології у хворих, яка розвивається на тлі багатьох хронічних попередніх цереброваскулярних захворювань.

Метою цієї роботи є розробка моделі двоетапного локального повторного інсульту, близького по патогенезу, обсягом і ступенем ураження ділянки мозку гострого порушення мозкового кровообігу у людини.

Матеріали та методи

Запропоновану модель локального повторного інсульту відтворено у 23 білих мишах-самках (середня маса 20,1±2,1г) та 40 щурах-самках (середня маса 205,3±6,6г). Перший етап включав виконання оклюзії правої загальної сонної артерії щура (a. carotis communis dextra). Тварин наркотизували інтраперітоніальним введенням тіопенталу натрію (60 мг / кг). Щурам у положенні "лежачи на спині" в нижній ділянці шиї робили надріз довжиною 1,5-2 см (рис. 1, А). Відокремивши підшкірну тканину і м'язи, отримували доступ до правої загальної сонної артерії. Лігування та оклюзію загальної сонної артерії проводили на рівні 18-20 мм до її біфуркації на зовнішню і внутрішню гілки за допомогою шовкової нитки 6/0 (Ethicon Ltd., Edinburgh, UK). Після цих процедур рану наглухо зашивали ниткою 10/0 ("Ethicon" Шотландія) і обробляли йодом, а дослідних тварин повертали в клітки і спостерігали протягом всього періоду оклюзії (тобто протягом 10 днів).

Через 10 днів тварин повторно наркотизували з метою моделювання інтрацеребральної посттравматичної гематоми. З цією метою досвідним тваринам інтраперітоніально вводили тіопентал натрію в дозі 60 мг/кг.

Другий етап даної моделі полягає у відтворенні локального геморагічного інсульту в структурах головного мозку (Рис. 2). Відтворення обмеженого крововиливу у тварин досягається механічним руйнуванням тканини внутрішньої капсули (C.l. dextra, L=3,5-4,0; H=6,0; AP=0,6-1,0 для щурів; L=1,5; H=3,0; AP= 1,0 для мишей) в межах раніше задіяної, т.е. правої півкулі мозку, і за механізмом патогенезу відповідає розвитку після транзиторної ішемічної атаки (ТІА) завершеного інсульту [Wagner, 1996]. В ділянці внутрішньої капсули за допомогою стереотаксії [Rachinos, 1982] вводиться мандрен-ніж з метою локальної деструкції тканини мозку і відповідних кровоносних судин (Рис. 1Б). Моделювання досягається 4-6 обертальними рухами зігнутого мандрена-ножа, з подальшим введенням в ділянку внутрішньої капсули (через 3-4 хв після руйнування) 0,15-0,2 мл аутокрові.

Мандрен-ніж занурюється в тканину мозку (в ткани-

Таблиця 1. Дегенерація нейронів кори великого мозку при повторному інсульті.

№	Група	Щільність клітин (кл/мм ²)	Кількість загиблих клітин (%)	Щільність клітин (кл/мм ²)	Кількість загиблих клітин (%)
		Іпсилатеральна півкуля		Контралатеральна півкуля	
Миші	Контроль	738,7±12,1	1,4±0,1	734,2±8,9	1,3±0,1
	Інсульт	539,1±29,4*	28,6±2,0*	730,3±14,6	17,6±1,74*
Щури	Контроль	703,1±9,0	1,5±0,1	707,7±4,4	1,5±0,1
	Інсульт	571,2±5,3*	25,5±0,8*	584,2±9,4*	16,2±0,9*

Примітки: * - різниця достовірна (p<0,05).

Таблиця 2. Зміни морфометричних параметрів нейронів кори великого мозку при інсульту.

№	Група	Площа нейрона	Площа ядра	Площа нейрона	Площа ядра
		Іпсилатеральна півкуля		Контралатеральна півкуля	
Миші	Контроль	172,4±7,1	128,9±3,6	170,7±4,8	127,1±3,2
	Інсульт	140,0±6,3*	97,8±4,3*	188,6±9,3*	122,6±4,5*
Щури	Контроль	244,8±3,5	156,5±5,4	243,1±4,1	157,2±5,1
	Інсульт	321,1±12,7*	226,0±12*	314,9±11,8*	239,3±15,4*

Примітки: * - різниця достовірна (p<0,05).

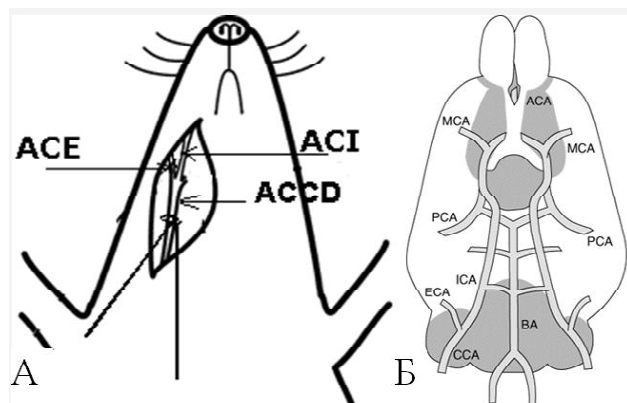


Рис. 1. Перший етап моделювання повторного локального інсульту. Умовні позначення: А-оклюзія правої загальної сонної артерії; ACCD - a. carotis communis dextra; ECA - a. carotis externa; ACI - a. carotis interna; Б - схема кровопостачання півкуль головного мозку щура: ACA - a. cerebri anterior; MCA - a. cerebri media; PCA - a. cerebri posterior.

ну внутрішньої капсули) в направляючій ін'єкційній голці-канюлі, зовнішній діаметр голки становить 0,4 мм. При моделюванні інсульту це істотно прискорює і оптимізує процес введення мандрену у відповідні утворення мозку. Після введення направляючої порожнистої голки-канюлі у задану структуру мозку (в даному випадку - у внутрішню капсулу) [Relton, 1997] з неї висувають на 1 мм відхилений і заточений мандрен-ніж. Після 4-6 обертів за і проти годинникової стрілки мандрен-ніж і спрямовуючу голку-канюлю витягують маніпулятором з мозку тварини. В результаті виконаних зазначених експериментальних операцій у внутрішній капсулі виявляється деструкція мозкової тканини, а також крововилив в цю зону з пошкоджених мандреном-ножем судин разом з введеною ззовні аутокрові. На фрон-

тальних зрізах мозку геморагічний інсульт локалізується в ділянці внутрішньої капсули раніше обраного нами правої півкулі (розмір ураження складає в середньому 8,71±0,42 мм²). При цьому відсутні істотні ураження вище розташованих утворень мозку і, перш за все, неокортексу. Після проведених оперативних втручань і послідовних маніпуляцій рана наглухо зашивали ниткою 10/0 ("Ethicon" Шотландія) і обробляли 5% спиртовим розчином йоду.

Забій тварин проводили через 10 днів після завершення другого етапу роботи (тобто через 20 днів після оклюзії правої загальної сонної артерії). Головний мозок тварин фіксували методом транскардіальної перфузії 4% розчином параформальдегіду в 0,1 н фосфатному буфері (рН 7,4), а в якості експериментального матеріалу використовували фронтальні зрізи головного мозку щурів, забарвлені гематоксилін-еозином [Федоренко, 2010].

Результати. Обговорення

Летальність після повторного інсульту у мишей складала 60,8%, а у щурів 60%, що свідчить про значну тяжкість модельованого патологічного процесу. Гематоми в області правої внутрішньої капсули у експериментальних тварин були однотипні, при цьому проникнення крові в шлуночки мозку або її витік в субарахноїдальний простір нами не виявлено. Морфометрична оцінка інтрацеребральної гематоми при моделюванні повторного інсульту показала, що площа гематоми в ділянці треку канюлі у мишей складає 1,0±0,09 мм², а у щурів - 7,7±0,13 мм² і є стандартизованими, тобто суттєво не відрізняються. Навколо гематоми відзначено процеси проліферації гліальних клітин (гліоз), набряк тканини мозку, а в неокортексі інсультної півкулі загибель не тільки пірамідних ней-

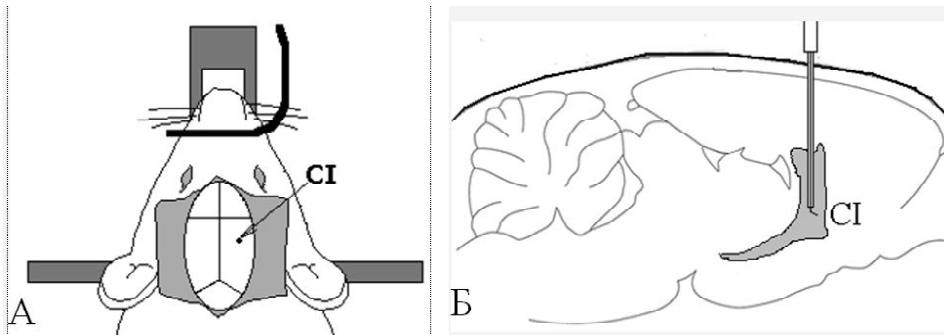


Рис. 2. Другий етап моделювання повторного локального інсульту. Умовні позначення: а - трепанаційний отвір у черепі для введення канюлі з мондреном-ножем в ділянку внутрішньої капсули (CI), б - введення канюлі з мондреном-ножем в тканину внутрішньої капсули і деструкції тканини, відповідних судин внутрішньої капсули, з метою формування внутрішньомозкової посттравматичної гематоми.

ронів, але і гліальних клітин (рис. 3).

Морфометричний аналіз кори мозку показав, що при повторному інсульті у в іпсилатеральній півкулі щільність нейронів зменшується у мишей на 25-30%, у щурів в середньому на 20%; в контралатеральній -

на 18% у дослідних щурів. При цьому серед їх кількість близько 15-28% нейронів мають ознаки некрозу (табл. 1). Тобто через 10 днів після моделювання повторного інсульту в корі мозку реєструється 70-75% функціональних нейронів. Головним чинником, що спричинює нейродегенеративні зміни кори мозку є набряк тканини мозку. При цьому суттєво змінюються морфометричні параметри пірамідних нейронів: збільшення середньої площі перикаріону і ядра обумовлено розвитком інтрацелюлярного набряку, а зменшення - загибелі клітин (некроз, каріопікноз) (табл. 2).

Таким чином, запропонована модель локального повторного інсульту є стандартизованою і має пере-

твірний характер.

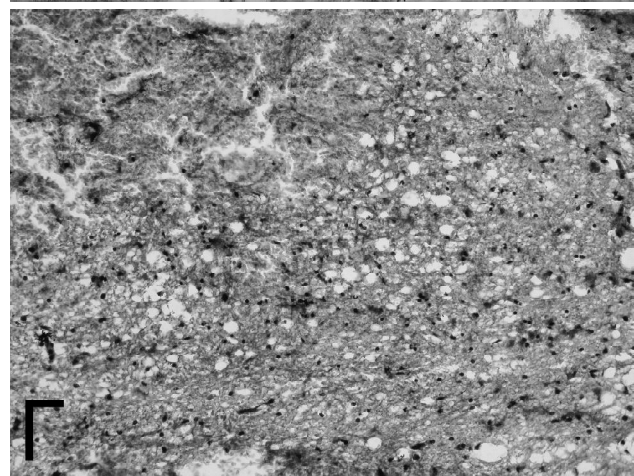
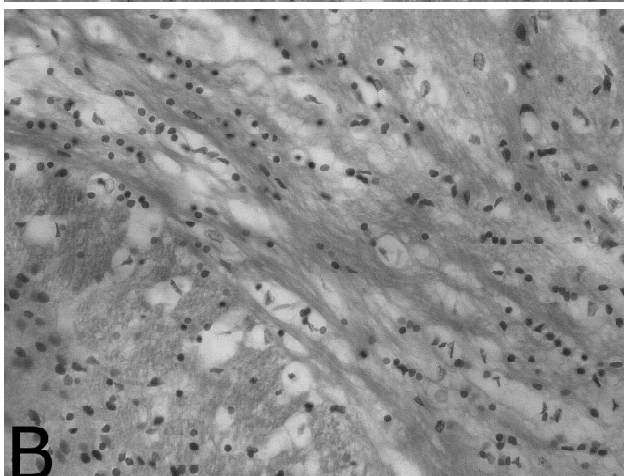
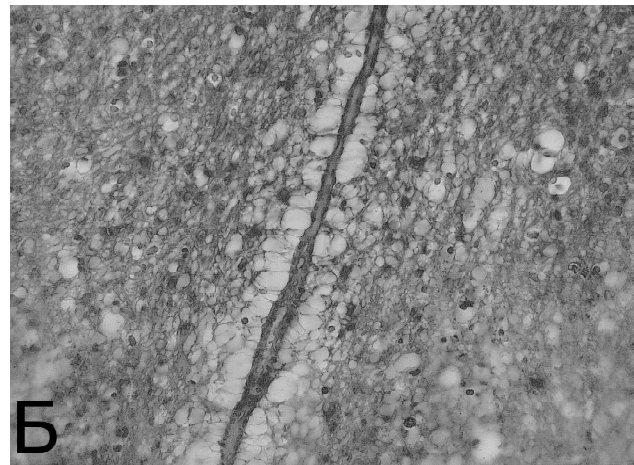
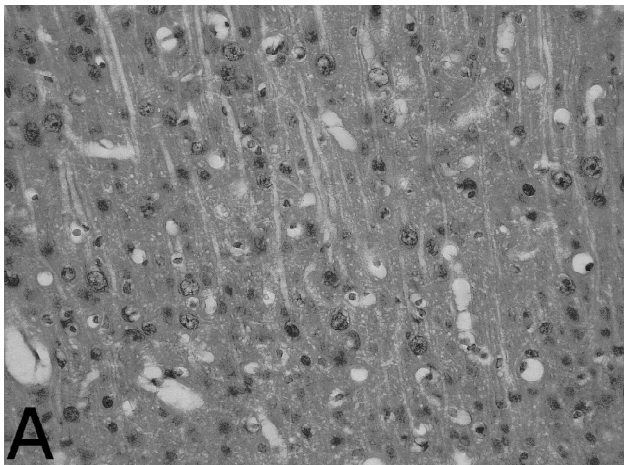


Рис. 3. Патоморфологічні зміни при повторному інсульті. Примітки: А - кора мозку іпсилатеральної півкулі, перичелюлярний і периваскулярний набряк, некроз нейронів та гліальних клітин; Б - субепендимальний набряк третього шлуночка, некроз тканини мозку, В - набряк тканини мозолистого тіла; Г - крововилив в ділянці внутрішньої капсули, набряк тканини мозку. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

ваги над іншими способами відтворення інсульту. Відомо, що крововилив, викликаний, зокрема, поступовим введенням (протягом 3-4 хв.) в внутрішню капсулу аутокрові (2 мл), супроводжується формуванням у свиней не стандартизованої гематоми різних розмірів. Процес моделювання супроводжується швидким пошкодженням великих структур мозку, руйнуванням підкіркових клітинних утворень і, рідше, провідних шляхів білої речовини кори великих півкуль. Причому ця і подібні їй експериментальні моделі характеризуються високим відсотком летальності тварин, що робить зазначені моделі малоприматними для використання в хронічних експериментах. Крім того методи моделювання гострого геморагічного інсульту розроблені для використання переважно на великих тваринах, у той час як сучасні скринінгові дослідження передбачають широке використання головним чином дрібних лабораторних тваринах (щурі, миші та ін) [Мирзоян, 2000].

Використовувані методи моделювання інсульту мають і інші істотні недоліки. Зокрема після забору аутокрові її змішують з гепарином (у співвідношенні 10:1) і вводять інтрацеребрально під тиском 120-150 мм рт.ст. в ділянку внутрішньої капсули одного з півкуль головного мозку, у зв'язку з тим, що дана локалізація гематоми найбільш часто зустрічається в клінічній неврологічній практиці [Данчин, 2001]. Наростаюча внутрішньомозкова компресія посилюється не тільки пошкодженням церебральних судин, але й проявами інтрацеребрального набряку, супроводжується проникненням і/або проривом крові в латеральні шлуночки мозку, викликаючи їх гемотампонаду. Одночасно відзначається її ретроградне проникнення по треку канюлі, в результаті чого кров часто виявляється в моз-

кових шлуночках і під мозковими оболонками. В результаті розвитку ускладнень, які особливо часто реєструються при відтворенні двостороннього інсульту, летальність експериментальних тварин зростає з 27% до 80%. І, нарешті, слід визнати, що головним недоліком використовуваних в даний час моделей геморагічного інсульту є раптовий розвиток у інтактних тварин внутрішньомозкового крововиливу.

Модель повторного локального одностороннього інсульту практична, максимально стандартизована і може бути використана для відтворення вогнищ крововиливів і в інших клітинних утвореннях головного мозку. Розроблена модель може бути корисна для оцінки неврологічних порушень, віддалених наслідків цереброваскулярної патології і ефективності лікарських засобів, які в даний час активно розробляються в багатьох лабораторіях і науково-медичних установ різних країн [Воронина, 2003; Шестаков, 2009; Федоренко, 2010].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Розроблено стандартизовану модель відтворення локального одностороннього повторного геморагічного інсульту у лабораторних щурів (мишей, щурів).

2. Метод ґрунтується на відтворенні інтрацеребральної гематоми на тлі оклюзії загальної сонної артерії. Модель максимально відповідає етіології і патогенезу церебрального інсульту.

Перспективи подальших розробок полягають у дослідженні функціонального та неврологічного дефіциту при інсульті, дослідженні ефективності нових лікарських засобів, що активно розробляються для лікування цереброваскулярної патології.

Список літератури

- Бабин В.Г. Множественные аномально расположенные хорды на верхушке левого желудочка - этиологический и патогенетический факторы ишемического инсульта у лиц молодого возраста /В.Г.Бабин, И.Н.Атаманчук, Г.М.Давиденко //Лікарська справа.- 2004.- №5-6.- С.62-64.
- Геморагический инсульт; под ред. В.И.-Скворцовой, В.В.Крыловой.- М.: Геотар-медиа, 2005.- 154 с.
- Данчин О.Г. Малоинвазивні хірургічні втручання при супратенторіальних внутрішньомозкових гематомах, обумовлених артеріальною гіпертензією : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук: 14.01.05. - К., 2001. - 35 с.
- Эффект нооглютила у крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой (геморагическим инсультом) /Т.А.Воронина, Е.А.Кузнецова, Т.Л.Гарибова [и др.] //Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2003. - №3. - С. 13-16.
- Легнер Э.Н. Электрическая активность головного мозга при экспериментальной модели геморрагического инсульта /Э.Н.Легнер, Ш.И.Бибелейшвили //Электрофизиология нервной системы. - Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1963. - 226 с.
- Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга для экспериментальных целей /А.Н.Макаренко, Н.С.Косицын, Н.В.Пасикова [и др.] //ЖВНД. - 2002. - Т.52, №6. - С. 765-768
- Методологические указания по экспериментальному изучению препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени /Р.С.Мирзоян, А.С.Саратиков, М.Б.Плотников [и др.] //Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М.: Наука, 2000. - 159 с.
- Середенин С.Б. Нейропротекторные свойства афобазола при повторном моделировании геморрагического инсульта у старых крыс /С.Б.Середенин, В.А.Крайнева //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2010. - №2. - С. 165-168.
- Федоренко А.В. Влияние афобазола и мексидола на ориентационно-исследовательское поведение при моделировании интрацеребральной посттравматической гематомы /А.В.-Федоренко, В.А.Крайнева, Е.А.Вальдман //Эксперим. и клин. фармакол.- 2010.- Прил.- С.89.
- Шестаков В.А. Противоинсультное действие Актоинвита (субстанции S-1) при экспериментальном геморрагическом инсульте /В.А.Шестаков, Е.В.Шестакова //Пат. физиол. и эксперим. терапия.- 2009.- №4.- С.2-5.
- CP-0597, a Selective Bradykinin B2 Receptor Antagonist, Inhibits Brain Injury in a Rat Model of Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion /J.K. elton, V.E.Beckey, W.L.Hanson [et al.] /Stroke.- 1997.- Vol.28.- P.1430-1436.
- Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematomal white matter /K.R.Wagner,

G.Xi, Y.Hua [et al.] //Stroke.- 1996.- Paxinos G. The rat brain in stereotaxic
Vol.27, №3.- P.490-497. coordinats /G.Paxinos, C.Watson.-

Sydney: Academic Press, 1982.-
1480p.

Савосько С.И.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ПОВТОРНОГО ЛОКАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА

Резюме. С целью изучения процессов, развивающихся при осложненном инсульте и разработки подходов к их фармако-терапии, нами разработан и предлагается стандартизированный метод воспроизведения в эксперименте повторного инсульта на мелких лабораторных животных, пригодный для использования не только в острых, но и в хронических исследованиях. Особенность данного варианта воспроизведения повторного инсульта состоит в моделировании аутогеморрагического одностороннего инсульта путем механического повреждения ткани после 10-дневного периода окклюзии правой общей сонной артерии. Модель удобна для воспроизведения повторного нарушения церебральной гемодинамики, является более адекватной формой моделирования острой и хронической цереброваскулярной патологии, чем самостоятельное использование локального кровоизлияния аутокровью в структуры мозга интактных животных. По морфологическим и патофизиологическим характеристикам модель приближается к клиническим вариантам развития и течения острого геморрагического инсульта после предыдущей транзиторной ишемической атаки.

Ключевые слова: повторный инсульт, метод моделирования, патоморфологические изменения, головной мозг.

Savosko S.I.

EXPERIMENTAL MODEL OF SECONDARY LOCAL STROKE

Summary. To study the processes which developed at the complicated stroke and developments of fittings for their pharmaceutical therapy we developed and offering the standardized method of the experimental secondary stroke on shallow laboratory animals, suitable for the use in sharp and chronic researches. Variant of reproducing secondary stroke consist of autohemorrhagic hemisphere stroke by the mechanical damage of brain tissue after 10-daily occlusion of right common carotid artery. A model is comfortable for reproducing of the secondary violations of cerebral hemodynamics, is more adequate form of design of sharp and chronic cerebrovascular pathology, than the independent use of local hemorrhage of autogenic blood in the brain of intact animals. On morphological and physiopathology descriptions a model approaches the clinical variants of development and flow of sharp hemorrhagic stroke after a previous transient ischemic attack.

Key words: secondary stroke, design method, pathomorphological changes, cerebrum.

Стаття надійшла до редакції 22.05.2013 р.

Савосько Сергій Іванович - кафедра гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця;
(044) 4604131; savosko_s@ukr.net.