

В.В. Колесник

## Експериментальний тромбоемболічний інсульт у щурів лінії Вістар як варіант патофізіологічної моделі гострих порушень мікроциркуляції за ішемічним типом

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова АМН України», м. Київ,

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України», м. Харків

**Ключові слова:** експериментальний тромбоемболічний інсульт, щури лінії Вістар, патофізіологічна модель, гострі розлади мікроциркуляції, ішемія.

Представлено результати створення експериментального тромбоемболічного інсульту як варіанту патофізіологічної моделі гострого порушення мікроциркуляції за ішемічним типом. Матеріалом дослідження стали 60 самців щурів лінії Вістар віком 3–6 місяців, вагою 160–175 г. Метою дослідження досягали шляхом емболізації коллатеральних судин частками сульфату барія (125 мг/кг), що надавало гарантоване вимкнення магістрального та коллатерального кровообігу правої гемісфери головного мозку та стандартні ураження головного мозку, схожі з тими, що виникали у людини у разі розвитку традиційної клінічної патології. Результати оцінювали за характером виявлених морфологічних змін (гострі розлади мікроциркуляції, тромбози, ішемія, білі, червоні, змішані інфаркти – вогнищеві некрози мозку за природою). Відзначено ефективність проведеного експерименту та оптимістичні перспективи застосування екстраполятивних даних у якості фундаменту для подальшої апробації новаторських методів оперативної інтервенції ішемічного тромбоемболічного інсульту.

## Экспериментальный тромбоземболический инсульт у крыс линии Вистар как вариант патофизиологической модели острых нарушений микроциркуляции по ишемическому типу

В.В. Колесник

Представлены результаты создания экспериментального тромбоземболического инсульта как варианта патофизиологической модели острого нарушения микроциркуляции по ишемическому типу. Материалом исследования стали 60 самцов крыс линии Вистар в возрасте 3–6 месяцев, весом 160–175 г. Целью опыта достигали путем эмболизации коллатеральных сосудов частицами взвеси сульфата бария (125 мг/кг), что давало гарантированное выключение магистрального и коллатерального кровоснабжения соответствующего полушария головного мозга и стандартные повреждения головного мозга, сходные с таковыми у человека в случае развития традиционной клинической патологии. Результаты оценивали по характеру выявленных морфологических изменений (острые расстройства микроциркуляции, тромбозы, ишемия, белые, красные, смешанные инфаркты – очаговые некрозы мозга по природе). Отмечена эффективность проведенного эксперимента и оптимистические перспективы использования экстраполятивных данных в качестве фундамента для дальнейшего апробирования новаторских методов оперативной интервенции ишемического тромбоземболического инсульта.

**Ключевые слова:** экспериментальный тромбоземболический инсульт, крысы линии Вистар, патофизиологическая модель, острые расстройства микроциркуляции, ишемия.

**Патология.** – 2011. – Т.8., №1. – С. 56–59

## Experimental thromboembolic stroke in Wistar rats as an alternative pathophysiological model of acute disorders of microcirculation in ischemic type

V.V. Kolesnik

The results of the experimental thromboembolic stroke formation as the pathophysiological model variant for the ischemic type of the acute blood microcirculation disorders are presented in this work. The examinational material is Wistar rat males of the 3-6 month age (n= 60), 160-175 g by weight. The purpose of the experiment was achieved by embolization of collateral blood vessels by sulfate barium suspension (125 mg/kg), which resulted in guaranteed cutout of the basic and collateral blood circulation of the right cerebral hemisphere and standard cerebral damages, that are similar with the such ones in a human in a case of the development of a traditional clinic pathology. The results were evaluated by character of the morphofunctional changes (acute blood microcirculation disorders, thrombosis, ischemia, white, red, mixed infarcts - focal cerebral necrosis by their nature). Efficiency of experiment was noted and optimistic perspective of the extrapolative data use as a foundation for the further testing of the newest methods of the ischemic thromboembolic stroke surgical intervention.

**Key words:** experimental thromboembolic stroke, Wistar rats, pathophysiological model, acute blood microcirculation disorders, ischemia.

**Pathologia.** 2011; 8(1): 56–59

Загальноновизнаними факторами, що спричиняють розвиток гострого ішемічного інсульту, є тромбоз, емболія та гіперперфузія. Їх пов'язують з локальними uszkodженнями цілісності судинної стінки, насамперед ендотеліального шару, та подальшим порушенням проникності. Тотальна оклюзія судин призводить до ішемі-

зації відповідних ділянок головного мозку, втрат ними звичної трофіки та, врешті, розвитку деструктивно-дегенеративних змін чи навіть загибелі певних структур кори. Запобігання останньому сприяють протиішемічні засоби, ефективність яких залежить від максимально точного урахування викривлень похідної морфологічної

та клінічної картин ішемічного інсульту. Розв'язання порушеної проблеми можливе лише за умов експериментального моделювання тромбоемболічного інсульту у тварин та ефективної екстраполяції результатів з максимально наближеної до природного феномену якісної патофізіологічної моделі.

Науково-теоретичні здобутки започаткованої роботи пов'язані з вирішенням задач щодо удосконалення клініко-діагностичних критеріїв вибору, лікувальної тактики, створення підґрунтя для ефективних засобів привентації гострих розладів мікроциркуляції ішемічного типу, якісної реабілітації хворих на ішемічний інсульт. Дослідження є фрагментом науково-дослідної теми: «Вивчити вплив прогеніторних клітин на перебіг запально-дегенеративних ушкоджень ЦНС та розробити диференційовані методи їх лікування»; 2010–2012 рр. № 0110U002191.

На думку фахівців, інсульти являють собою загрозову форму цереброваскулярних захворювань, що останнім часом здобули широке розповсюдження серед неврологічних патологій людини [5]. У розвинутих країнах Заходу та США переважну більшість (90%) гострих порушень мікроциркуляції складають саме гострі ішемічні інсульти, що посідають друге місце серед провідних причин смертності у світі [6,11,13]. Популяційні дослідження передбачають зростання летальності від інсультів разом з ішемічною хворобою серця у найближчі 25 років. Для України відповідна невтішна статистика демонструє щорічний рівень реєстрації 100–120 тис. випадків захворювання на інсульт з 30–40% летальних вироков протягом 1 місяця [5].

До невирішених завдань відносять такі клініко-експериментальні аспекти: тривалість експерименту, наближеність патофізіологічної моделі до природного феномену, її ефективність, доступність, екстраполятивність, вибір емболізуючої речовини.

#### Мета роботи

Створити модель експериментального тромбоемболічного інсульту як патофізіологічний варіант гострих порушень мікроциркуляції ішемічного типу. Вивчити морфофункціональні особливості експериментального тромбоемболічного інсульту як патофізіологічної моделі гострого порушення мікроциркуляції ішемічного типу.

#### Матеріали і методи дослідження

Матеріалом дослідження були імбредні самці щурів лінії Вістар (n=60) віком 3–6 місяців, вагою 160–175 г, яких утримували у стандартних умовах віварію (температура повітря становила 17–25°C, відносна вологість не перевищувала 50–60%, норму штучного освітлення витримували на рівні 60 лк) [1]. Тварин диференціювали на 3 основні групи: I – представлена інтактним контролем (група спостереження). У II ввійшли особини псевдооперованого контролю, яким не завдавали емболізацій. До III групи відносили тварин, що були прооперовані та зазнали емболізацій за розробленою схемою досліду (група щурів із модельованим ішемічним інсультом). Для створення моделі ішемічного інсульту у експеримен-

тальних тварин застосовували емболію колатеральних гілок загальної сонної артерії правої півкулі головного мозку. Щурів наркотизували кетаміном інтраперитоніально, з розрахунку 125 мг на кг ваги тварини. Емболізацію колатеральних судин проводили за рахунок завісу сульфату барію (II). Спостереження проводили впродовж перших 1–3 діб та наступних 6 тижнів досліду. З експерименту тварин виводили шляхом надання надмірної дози наркозу та наступної декапітації. Гістологічні препарати виготовляли за традиційної схемою. Шматочки головного мозку тварин фіксували у 12% розчині формаліну на фосфатному буфері (pH=7,0–7,2), надалі зневоднювали за допомогою батареї спиртів зростаючої концентрації. Парафінові блоки виготовляли за допомогою мікротому в 3 взаємно перпендикулярних площинах. Зрізи забарвлювали залежно від завдань роботи (гематоксиліном-еозином, за ван Гізоном, імпрегнація сріблом). Аналіз морфологічних змін здійснювали із залученням світлооптичного мікроскопу ЛОМО (×300; ×600; ×1350). Ідентичні показники піддавали узагальненню, статистичну обробку здійснювали з використанням пакету програм «Statistica».

#### Результати та їх обговорення

У результаті дослідження встановлено, що морфологічні зміни у півкулях, оболонках головного мозку щурів лінії Вістар групи інтактного контролю виявлялись відповідними нормофізіологічним статеві-віковим змінам таких тварин. Філогенетично найбільш пізня частина кори – ізокортекс, гомогенетична кора, мала чітку за диференціацією 6-шарову будову (рис. 1).



Рис. 1. Структура кори головного мозку щура лінії Вістар, 3-місячного віку (група інтактного контролю). Забарвлення: імпрегнація сріблом. × 300.

Зовнішній цитоархітектонічний (молекулярний) шар утримував добре розгалужені аферентні волокна, подекуди тіла нейронів. Зовнішній гранулярний відрізнявся наявністю малих зірчастих і пірамідальних клітин. На панорамних гістологічних зрізах характерно виділялись широкі, виразні зовнішній і внутрішній пірамідальні шари, що формувались середніми, великими пірамідальними нейронами (зовнішній шар) та велетенськими нейронами (внутрішній). Крайній

мультиформний шар візуально підтверджував свою поліморфну будову (дрібні, середні пірамідальні нейрони). Судини головного мозку характеризувались цілісністю структури, відсутністю ушкоджень стінок, тромбозу, стазів. Паравазальних крововиливів не виявлено, діapedез еритроцитів не визначено.

Гістологічний аналіз препаратів головного мозку та його оболонок групи псевдопрооперованих тварин не виявив порушень структурної диференціації кори. Протягом 1–6-го тижнів спостережень реєстрували незначні за характером і розмірами спайки оболонок головного мозку у дорзо-латеральних та базальних ділянках. Поряд з цим, відзначено ушкодження поверхні неокортекса тварин, що пов'язано з функціональним стисненням тканин під час оперативного втручання. Змін у структурі зовнішньої капсули, соматосенсорної, інсулярної кори, ушкоджених, загиблих нейронів не спостережено. Структура судин цілісна, явищ тромбозу, стазів не відзначено.

Найбільш цікавими в аспекті структурно-функціональної характеристики виявились результати дослідження, отримані в III групі тварин (клінічна група з модельованим ішемічним інсультом). У частини дослідних тварин (n=5) відсутня чверть/одна третина соматосенсорної/інсулярної кори. Загиблі нейрони спостерігали у дорзо-латеральних, медіальних ділянках мозку, вщерть до зон проєкції бокових шлуночків. Саме в цих зонах реєстрували вогнища гліозу (цей факт співвідносить отримані результати з даними дослідників, які вивчали вікові зміни та гострі мозкові розлади [9,10]). Морфологічно незмінні нейрони спостерігали лише на певній відстані від зон ушкоджень. Мікросудини мозку на зрізах утримували численні тромби, сформовані як еритроцитарними клітинами (рис. 2), так і часточками, гранулами завісу сульфату барію (II). На мікрофотографіях світло-сіра за кольором тромбуюча речовина (рис. 3), розташовуючись вздовж ушкодженого внутрішнього шару, цілком заповнювала отвір судини, розширювала його, тиснула на оточуючі структури, стимулюючи запалення, набряк. «Штучні» тромби овальної, колоподібної, форми добре контрастувались на фоні ділянок нервової тканини з ознаками паравазальних крововиливів, що призводило до тканинної ізоляції судин і майбутнього розвитку тканинної гіпоксії. Можливо, в результаті саме цих фактів з'являлись додаткові причини для посилення структурних змін у судинній стінці, розвитку ішемії та подальшого інсульту.

Функціональні та морфологічні ушкодження судинної системи посідають значне місце у розвитку гострих ішемічних розладів, їх віддалених наслідків (інфарктів, інсультів). На мікрофотографіях спостерігали численні ознаки розладів гемоциркуляції, пов'язаних з розладами реологічних властивостей крові та проникності судин [3]. Зміни у проникності судинної стінки могли бути пов'язані з низкою факторів, спричинених не лише структурними особливостями судинної стінки, але й особливостями периферичної крові (фізико-хімічні

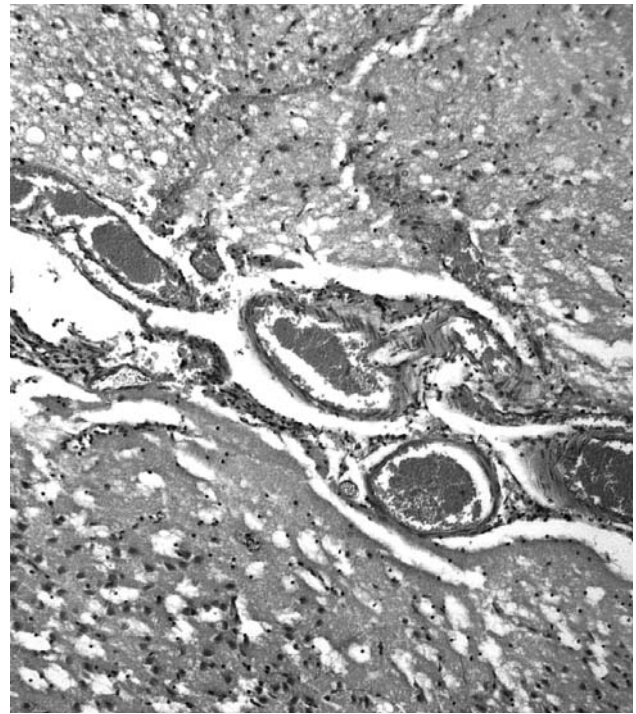


Рис. 2. Еритроцитарні тромби мікросудин головного мозку щура лінії Вістар 3-місячного віку (експериментальна група з модельованим ішемічним інсультом). Забарвлення: гематоксилін-еозин.  $\times 300$ .

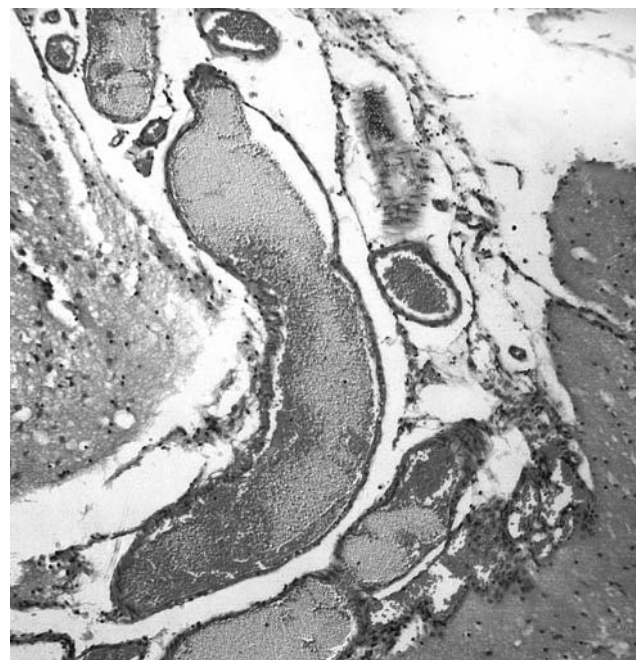


Рис. 3. «Штучні» тромби мікросудин головного мозку щура лінії Вістар із завісу сульфату барію (II), експериментальна група з модельованим ішемічним інсультом. Забарвлення: гематоксилін-еозин.  $\times 300$ .

властивості сироватки, поверхнева та внутрішня цитоархітектоніка еритроцитів, порушення процесів обміну в організмі загалом). Специфіка тромбуючої речовини, застосованої у експерименті, зміни у адгезуючих властивостях еритроцитів, вірогідні зміни у тромбоцитарній системі є безумовними факторами стимуляції тромбозу

судин головного мозку [7,8], що сприяють ушкодженню трофіки оточуючих тканин, розвитку деструктивно-дегенеративних, некробіотичних процесів, що супроводжують та ілюструють інсульт.

#### Висновки

Заявлений спосіб отримання експериментального тромбоемболічного інсульту у щурів лінії Вістар дає можливість гарантованого виключення не тільки магістрального, але й колатерального кровопостачання правої півкулі головного мозку.

Емболізація колатеральних судин правої півкулі відбувається за рахунок накопичення у їхніх отворах часточок зависі сульфату барію (II). Наступний стаз і, як наслідок, ішемія у відповідних ділянках головного мозку призводять до інфарктів – вогнищевих некрозів мозку.

Відпрацьований в експерименті тромбоемболічний механізм формування інсультів шляхом інтракаротидного введення зависі сульфату барію (II) на не перекритому кровообігу сприяє отриманню патофізіологічної моделі останнього, максимально наближеної до природного феномену.

Перспективи подальших наукових пошуків полягають в удосконаленні існуючих підходів до створення надійних екстраполятивних моделей ішемічного інсульту на тваринах в експерименті; їх застосуванні з метою дослідження впливу прогеніторних клітин на судини, коркові та гліальні структури головного мозку в умовах розвитку гострих розладів мікроциркуляції та наступних деструктивно-дегенеративних змін.

#### Література

1. Анатомия крысы (лабораторные животные) / Под ред. акад. А.Д. Ноздрачева – СПб: «Лань», 2001. – 464 с.
2. Стенка сосудов в атеро- и тромбогенезе: [исследования в СССР/ ред. Чазов Е.И., Смирнов В.Н. АМН СССР.] – М.: Медицина, 1983. – 208 с.
3. Торяник И.И. Структурно-функциональные особенности сосудов головного мозга линейных крыс при моделированном ишемическом инсульте / И.И. Торяник, В.В. Колесник // Світ медицини та біології. – 2010. – №3. – С. 83–86.
4. Торяник И.И. Унифицированный подход к созданию модели ишемического инсульта головного мозга в эксперименте на крысах линии Вистар / И.И. Торяник, В.В. Колесник // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2010. – Т. 10, вип. 4 (32). – С. 155–159.
5. Яворская В.А. Сопоставление клинического и патоморфологического диагноза кардиоэмболического инсульта / В.А. Яворская, О.Б. Бондарь, Н.В. Долог [и др.] // Практическая ангиология. – 2008. – №3. – С. 63–68.
6. American Heart Association. [American Heart Association / Heart Disease and Stroke Statistics.] – Update, Dallas TX, 2007. – P. 36–41. – Режим доступа: www.americanheart.org/statistics.
7. Bland S. Forsed overus of the contralateral forelimb increases infarct volume and impairs functional outcome following mild transient cerebral ischemia in rats // Bland S., Strong R., Aronovski J., Grotta J., Shallert T. // Neurology. – 1999. – №52, (suppl. 2). – P. A564.
8. Davis S.M. Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the Echoplaner Imaging Thrombotic Evaluation Trail (EPITHET): a placebocontrolled randomized trial / Davis S. M., Donnan G. A., Parsons M. W. // The Lancet Neurology. – 2008. – №7. – P. 299–309.
9. Durukan A. Ischemic Stroke in Mice and Rats / A. Durukan, T. Tatlisumak // Springer protocols. – 2009. – Vol. 573. – P. 95–114.
10. Kang S. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue – derived stromal cells after cerebral ischemia in rats / S. Kang, D. Lee, Y. Bae [et.al.] // Experimental Neurology. – 2003. – Vol. 183. – P. 355–366.
11. Mohr J.M. Stroke: pathophysiological diagnosis and management / Mohr J.M., Choi D.W., Grotta J.C. – Philadelphia: Livingstone, 2004. – 1616 p.
12. Taguchi Y. Morphological changes in capillaries in the ischemic brain in Wistar rats / Y. Taguchi, S. Takashima, E. Sasahara [et.al.] // Archives of Histology and Cytology. – 2004. – Vol. 67, №3. – P. 253–261.
13. Wahtgren N. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in the Safe implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study // Wahtgren N., Ahmed N., Davalos A. // The Lancet Neurology. – 2007. – №369. – P. 275.

#### Відомості про автора:

Колесник В.В., заочний аспірант відділення відновної нейрохірургії, науковий співробітник ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова АМН України», ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України».

#### Адреса для листування:

Колесник Володимир Володимирович. 61038, м. Харків, вул. Івана Камишева, буд. 39, кв. 9.

Тел.: (057) 738 11 68, (095) 678 88 05, (067) 995 21 31, (057) 343 12 16.

E-mail: kamysh\_in@ukr.net; kolesnik.neuros@mail.ru.