

УДК 616.831-005.4-089-092.9

**ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛИ
ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА
ПОСРЕДСТВОМ КОАГУЛЯЦИИ
СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ У
КРЫС**

Трофименко Артем Иванович
*Кубанский государственный медицинский
университет, Краснодар, Россия*

Каде Азамат Халидович – д.м.н.,
профессор
*Кубанский государственный медицинский
университет, Краснодар, Россия*

Дынько Юрий Вячеславович – к.м.н.
*МБУЗ «ГБ № 2 КМЛДО», Краснодар,
Россия*

Занин Сергей Александрович – к.м.н.
*МБУЗ «ГБ № 2 КМЛДО», Краснодар,
Россия*

Целью данной работы было создание удобной и легкоуправляемой модели церебральной ишемии у крыс для проведения хронического эксперимента с верификацией инфаркта мозга. В работе создана достаточно простая и практичная в исполнении и использовании модель локальной церебральной ишемии у крыс специально для хронического эксперимента. Для этого были внесены модификации в методику операции, использованы современные виды препаратов для наркоза животных, выбран оптимальный режим антибиотикотерапии. Получено гистологическое подтверждение инфаркта мозга.

Ключевые слова: ЦЕРЕБРАЛЬНАЯ ИШЕМИЯ У КРЫС, СРЕДНЯЯ МОЗГОВАЯ АРТЕРИЯ У КРЫСЫ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ.

UDC 616.831-005.4-089-092.9

**DESIGN OF THE ISCHEMIC STROKE
MODEL BY THE AVERAGE BRAIN
ARTERY COAGULATION IN RATS**

Trofimenko Artem Ivanovich
*Kuban state medical university, Krasnodar,
Russia*

Kade Azamat Khalidovich – MD, prof.
*Kuban state medical university, Krasnodar,
Russia*

Dynko Yury Vyacheslavovich – MD
*City Hospital Nr 2 «KMLDO», Krasnodar,
Russia*

Zanin Sergey Aleksandrovich – MD
*City hospital Nr. 2 «KMLDO», Krasnodar,
Russia*

The aim of the work was elaboration of convenient and easily operated cerebral ischemia model in rats for chronic experiment with the brain attack verification. The simple enough model of a local cerebral ischemia in rats was specially created for chronic experiment. The modification of surgical technique was suggested, update anesthetic drugs for animals were used and optimal antibiotic therapy regime was carried out. The histological proof of cerebral infarct was obtained.

Key words: CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS, AN AVERAGE BRAIN ARTERY, HISTOLOGIC PREPARATIONS.

Анализ литературы по созданию модели церебральной ишемии показал применение следующих методик: лазерного фототромбоза, эмболизации, введения микрофиламента (эндоваскулярная окклюзия средней мозговой артерии (СМА) с контролируемой длительностью окклюзии), перевязка СМА [4–8, 10–11, 17, 19–25]. Перечисленные варианты получения модели церебральной ишемии весьма рутинные и дорогостоящие. Поэтому целью настоящей работы было создание более простого способа моделирования церебральной ишемии.

С помощью предложенной модели предполагается исследовать комплексное влияние ТЭС-терапии на течение церебральной ишемии, в частности, на формирование очага церебральной ишемии в динамике и на баланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, показатели опиоидергической и стресс-лимитирующей системы.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 20 крысах линии Вистар, средней массой – 250 ± 25 г. Содержание животных и постановка экспериментов осуществлялись в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 11.10.1983 года и № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 года, а также международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

В экспериментах использовали общий наркоз (0,3 мг золетила, 0,8 мг ксиланита, 0,02 мл 0,1 %-го раствора атропина на 100 г веса животного). Из двадцати животных были составлены три группы. В первую группу вошли 6 животных, которым выполнялась коагуляция правой СМА с последующим забоем на 1-е сутки. Вторая группа была представлена 7 животными, которым выполнялась коагуляция правой СМА с последующим забоем на 3-и сутки. Третья группа состояла из 7 крыс, контрольная операция которым не выполнялась, а производился одномоментный забой животных.

Операцию проводили с помощью налобной лупы. Сначала выполнялась обработка операционного поля, затем производилось выделение и перевязка шелковой нитью правой общей сонной артерии, далее производили разрез кожи по ходу скуловой кости (около 2,5 см) справа. Затем обнажали слюнную железу, расположенную в задне-нижнем квадранте операционного поля. Слюнную железу вместе с сосудистым сплетением аккуратно отделяли от окружающих тканей и перемещали в задне-верхний квадрант операционного поля. После частичного удаления скуловой кости проводили выделение височной мышцы, рассекали ее вдоль волокон и брали на крючки с обнажением височной ямки, дно которой образует крыловидная мышца с проходящим рядом нижнечелюстным нервом. Раздвигали крыловидную мышцу и открывали поверхность черепа между овальным отверстием и отверстием зрительного нерва. В этой области сверлили отверстие с помощью микромотора с прямым наконечником диаметром около 3 мм и обнажали место расположения СМА. Правую СМА пережигали с использованием диатермокоагулятора собственного изготовления. После получения модели церебральной ишемии по возможности восстанавливали топографию мышц и мягких тканей. Постоперационный период сопровождался антибиотикотерапией (бициллин-5).

Эвтаназию крыс проводили с использованием эфира, после окончательной остановки дыхания и сердечной деятельности осуществляли декапитацию с последующим выделением головного мозга и дальнейшей его фиксацией в 10 % формалине, заливкой образцов в парафин. Окрашивание полученных стекол выполняли гематоксилином-эозином [25].

Результаты исследований

Случаев незапланированной гибели животных и осложнений в ходе исследований не было. Проведенное морфологическое исследование

показало преимущественное поражение каудопутамена и гибель значительных участков неокортекса, локализованных в бассейне кровоснабжения правой СМА.

На рисунке 1 представлены гистологические препараты животных первой группы.

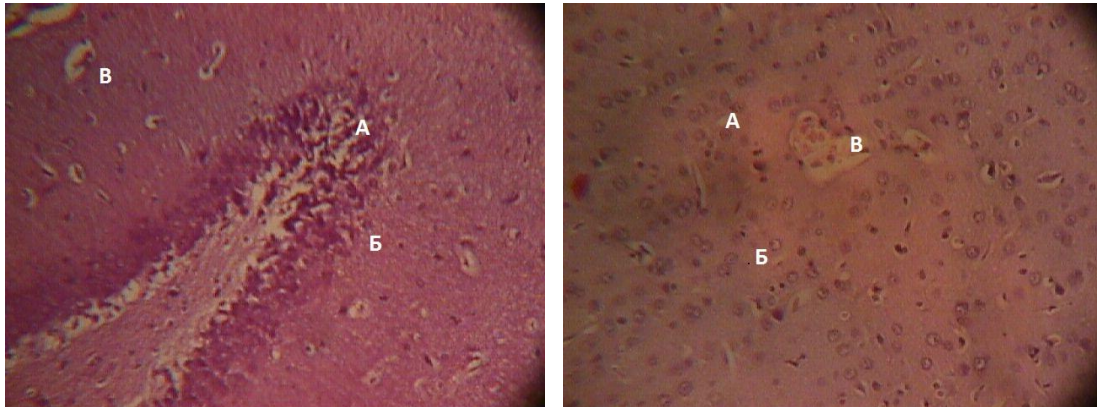


Рисунок 1. Гистологические препараты животных первой группы

В первой группе животных в ядерной зоне ишемии (А) обычно обнаруживаются признаки необратимого клеточного повреждения в виде разрушения цитоплазматических и ядерных мембран [12, 13]. Зафиксированы изменения астроцитов в виде набухания, фрагментации отростков и дезинтеграции. В области инфаркта мозга начинает скапливаться активированная микроглия (Б). В капиллярах краевой зоны выявляются признаки стаза крови (В), что отражает наличие эндотелиальной дисфункции [16].

Во второй группе животных на препаратах отчетливо выявляются ядерная зона инфаркта мозга (А), многочисленные клетки-«тени» (Б) (погибшие нейроны) (рис. 2).

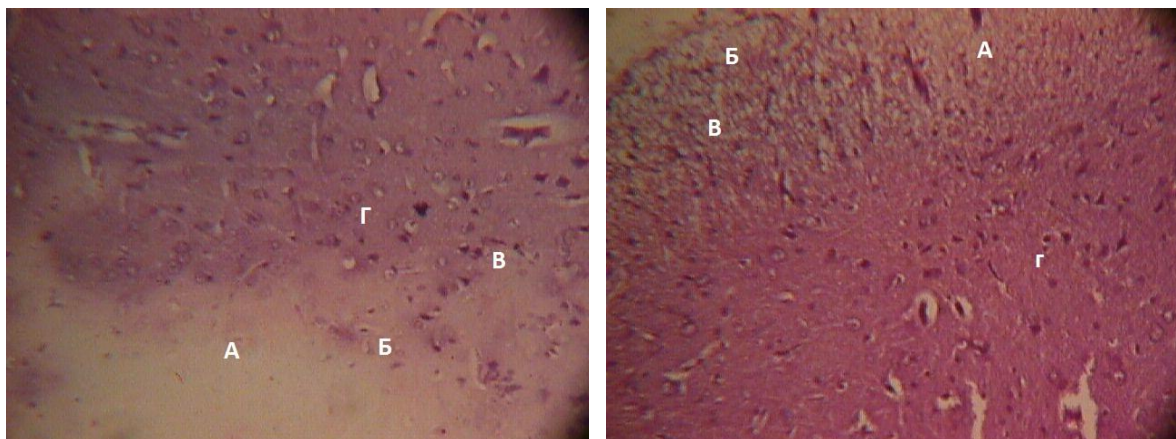


Рисунок 2. Гистологические препараты животных второй группы (пояснения в тексте)

Широко представлены активированная микроглия (В) во всей области ишемии, особенно в зоне пенумбры [15, 18], а также признаки нейрональной дегенерации [1, 2, 18]. Выявляются признаки инфильтрации нейтрофилами (Г) ишемизированной ткани мозга [9, 12, 14, 26, 27].

На рисунке 3 представлены срезы мозга третьей (контрольной) группы животных с нормальной картиной мозговой ткани. Мозговая ткань организована, четко видно послойное строение коры (А).

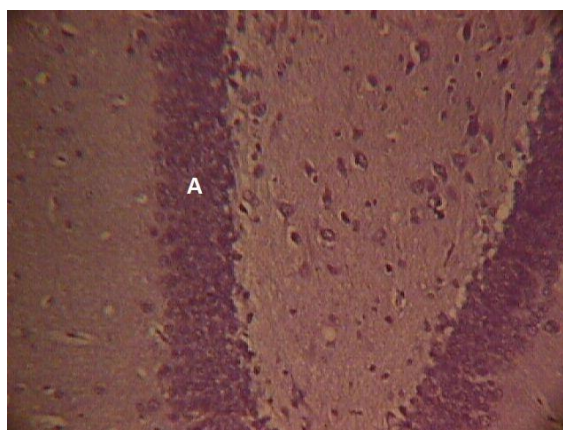


Рисунок 3. Гистологические препараты животных третьей группы (контроль)

Заключение

Преимущество предложенной нами методики операции заключается в 100 %-й выживаемости животных после наркоза (отсутствует основное

осложнение ингаляционного наркоза – острое легочное повреждение, встречающееся примерно у 20 % оперированных животных) [25]. Использование щадящей методики операции, в частности неполное удаление скуловой кости, позволяет максимально сохранить функцию жевания у оперируемых животных. Отмечается минимальный риск инфекционных осложнений наряду с удобным режимом антибиотикотерапии. Препараты, использованные нами для наркоза, доступны, в меньшей степени угнетают функцию дыхания и гемодинамики, чем представленные в литературе [3–8, 10–11, 17, 19–25]. Препараты, применяемые в комбинации, обеспечивают около одного часа глубокого операционного наркоза. Представленная модель церебральной ишемии вызывает преимущественное поражение каудопутамена и гибель значительных участков неокортекса, локализованных в бассейне кровоснабжения правой СМА. Преимуществом этой методики является более высокая степень выживаемости (более 90 %), по сравнению с использованием классических способов (до 50–70 %) [25].

Список литературы

1. *Боголепов Н.Н., Бурд Г.С.* Материалы VII Всесоюзного съезда невропатологов и психиатров. М.: Медицина, 1981. 2. 32–35.
2. *Бурд Г.С.* Дыхательная недостаточность у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения: Дисс. д-ра мед. наук. М., 1983. 355.
1. *Лопухин Ю.М.* Экспериментальная хирургия. М.: Медицина, 1971. 346 с.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. М.: ОАО «Изд-во «Медицина», 2005.
4. *Топчян А.В., Мирзоян Р.С., Баласанян М.Г.* Локальная ишемия мозга крыс, вызванная перевязкой средней мозговой артерии // Экспер. и клин. фармакол. 1996. Т. 59. № 5. С. 62–64.
5. *Badani I., Buchhold B., Hamma A. et al.* Accelerated glair reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery // J Cereb. Blood. Flow Metab. 2003. № 23:845–854.
6. *Brint S., Jacewicz M., Kiessling M., Tanabe J., Pulsinelli W.* Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries // J. Cereb. Blood. Flow Metab. 1988. № 8. 474–485.
7. *Cardenas A., Moro M.A., Leza J.C., Or Shea E., Davalos A., Castillo J., Lorenzo P., Lizasoain I.* Up-regulation of TACE/ADAM17 after ischemic preconditioning is involved in brain tolerance // J. Cereb. Blood. Flow Metab. 2002; 22, 1297–1302. Coyle P: Middle cerebral artery occlusion in the young rat. Stroke 1982, 13:855–859.
8. *Clark R.K., Lee E.V., Fish C.J., White R.F., Price W.J., Jonak Z.L., Feuerstein G.Z.* Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study // Brain Res Bull. 1993; 31:565–572.
9. *Chen S.T. et al.* A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction // Stroke. 1986. 17:738.
10. *Chen P., Goldberg D.E., Kolb B.L.M. et al.* Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99:9031–9036.
11. *Garcia J.H., Wagner S., Liu K.F., Hu X.J.* Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats // Stroke. 1995; 26: 627–635.
12. *Garcia J.H., Yoshida Y., Chen H., Li Y., Zhang Z.G., Lian J., Chen S., Chopp M.* Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat // Am J Pathol. 1993; 142: 623–635.
13. *Garcia J.H., Liu K.F., Yoshida Y et al.* Influx of leukocytes and plateles in an evolving brain infarct (Wistar rat) // Am J Pathol. 1994; 144: 188–199.
14. *Giulian D., Corpuz M., Chapman S., Mansouri M., Robertson C.* Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system // J Neurosci. Res. 1993; 36: 681–693.
15. *Iadecola C.* Mechanisms of cerebral Ischemic damage // Cerebral Ischemia (Wolfgang Walz ed.) // New Jersey, Totowa, Humana Press. 1999; 3–33.
16. *Laing R.J., Jakubowski J., Laing R.W.* Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best // Stroke. 1993, 24:294–298.
17. *Morioka T., Kalehua A.N., Streit W.J.* Characterization of microglia reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain // J Comp. Neurol. 1993; 327:123–132.

18. *Popa-Wagner A., Schroder E., Walker L.C., Kessler C.H.* Beta-amyloid precursor protein and ss-amyloid peptide immunoreactivity in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: effect of age // *Stroke*. 1998, 29:2196–2202.
19. *The rat nervous system // Third edition edited by G. Paxinos, Academic Press, 2004, p. 1165–1190.*
20. *Tamura, A., Graham D.I., McCulloch J., and Teasdale G.M.,* Focal cerebral ischemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion // *Cerebral blood flow and metabolism*. 1981. V.1. P. 53–60.
21. *Tyson G., Teasdale G., Graham D., McCulloch J.* Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological change // *Ann Neurol*. 15: 559–567, 1984.
22. *Wang Y. et al.* Bone morphogenetic protein-6 reduces ischemia-induced brain damage in rats // *Stroke*. 2001. 32: 2170–2178.
23. *Wang-Fischer Y.L. et al.* Refined technique for inducing and grading middle cerebral artery occlusion in rat stroke model, American Association of Laboratory Animal Science 54th National Meeting, Seattle, platform sessions speaker PS 43 2003, October 11–16, and AALAS Tribbranch Symposium, Biotechnology in the 21st Century and Beyond, presenting poster 10, Philadelphia, June 8–10, 2003.
24. *Manual of stroke models in rats, edited by Yanlin Wang-Fischer, CRC Press Taylor& Francis Group, 2009.*
25. *Zhang F., White J.G., Iadecola C.* Nitric Oxide Donors Increase Blood Flow and Reduce Brain Damage in Focal Ischemia: Evidence that Nitric Oxide is Beneficial in the Early Stages of Cerebral Ischemia // *J of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1994; 14: 217–226.
26. *Zhang R.L., Chopp M., Chen H., Garsia J.H.* Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion // *J Neurol. Sci*. 1994; 125: 3–10.