

УДК 616.831-005.4-089-092.9

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ПОСРЕДСТВОМ
КОАГУЛЯЦИИ СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ У КРЫС****Трофименко А.И., Каде А.Х., Лебедев В.П., Занин С.А., Мясникова В.В.***ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет**Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации»,**Краснодар, e-mail: zanin77@mail.ru*

В литературе, посвященной созданию модели церебральной ишемии, описываются весьма рутинные и дорогостоящие методики. 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. Послеоперационная летальность возникла за счет тяжелого течения церебральной ишемии, а не от последствий наркоза, истощения животных после операции, гнойно-септических послеоперационных осложнений.

Ключевые слова: церебральная ишемия у крыс, средняя мозговая артерия у крысы, гистологические препараты

**MODELLING OF THE CEREBRAL ISCHEMIA BY MEANS OF COAGULATION
OF THE AVERAGE BRAIN ARTERY AT RATS****Trofimenko A.I., Kade A.K., Lebedev V.P., Zanin S.A., Myasnikova V.V.***Kuban state medical university of Ministry of health and social development of the Russian Federation,**Krasnodar, e-mail: zanin77@mail.ru*

In the literature devoted to creation of model of a cerebral ischemia, rather routine and expensive techniques are described. A creation convenient and easily operated model of a cerebral ischemia at rats for carrying out of chronic experiment with verification of attack of a brain was the purpose of the given work. In work the model of a local cerebral ischemia at rats specially for chronic experiment is created simple enough and practical performed by and use. Updating's have been for this purpose brought in an operation technique, modern kinds of preparations for a narcosis of animals are used, the optimum mode antibiotic therapy is chosen. Histologic acknowledgement of attack of a brain is received. Postoperative death rate arose at the expense of a heavy current of a cerebral ischemia, instead of from consequences of a narcosis, an exhaustion of animals after operation, is purulent-septic postoperative complications.

Keywords: a cerebral ischemia at rats, an average brain artery at a rat, histologic preparations

Анализ литературы по созданию модели церебральной ишемии показал, что используются методики лазерного фототромбоза, эмболизации (избирательное введение различных веществ в кровеносную систему с целью уменьшения просвета или полной окклюзии определённых сосудов), введения микрофиламентов (эндovasкулярная 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 работы было создание более простого способа моделирования церебральной ишемии.

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

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 15 крысах линии Вистар, средней массой – 250 ± 25 г. Содержание животных и постановка экспериментов проводилась 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% раствора атропина на 100 г. веса животного). 15 животных были разделены на 3 группы: 1 группа – из 5 животных, которым выполнялась коагуляция правой СМА с последующим забоем на 1-е сутки; 2 группа – из 5 животных, которым выполнялась коагуляция правой СМА с последующим забоем на 3 сутки; 3 группа – из 5 крыс, контрольная, операция этим животным не выполнялась, производился одномоментный забой животных.

Операцию производили с помощью налобной лупы. 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 задненижнем квадрате операционного поля. Слюнную железу вместе с сосудистым спле-

тением аккуратно отделяли от окружающих тканей и перемещали в задневерхний 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 крысам проводили с использованием эфира, после окончательной остановки дыхания

и сердечной деятельности проводили декапитацию с последующим выделением головного мозга и дальнейшей его фиксацией в 10-м % формалине, заливкой образцов в парафин. Окрашивание полученных срезов выполняли гематоксилином-эозином [25].

Результаты исследования и их обсуждение

Случаев незапланированной гибели и осложнений у животных не было. Проведенное морфологическое исследование показало преимущественное поражение каудопутамена и гибель значительных участков неокортекса, локализованных в бассейне кровоснабжения правой СМА.

На рис. 1 представлены фотографии гистологических препаратов животных 1-й группы.

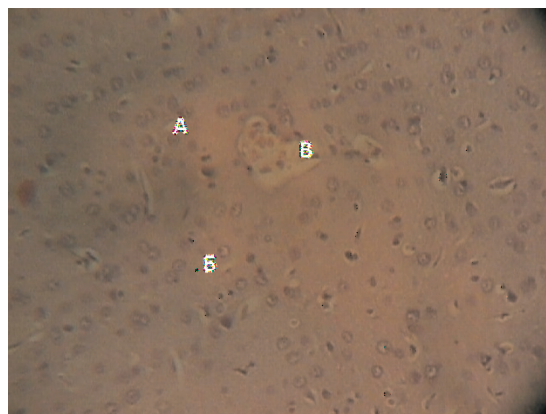
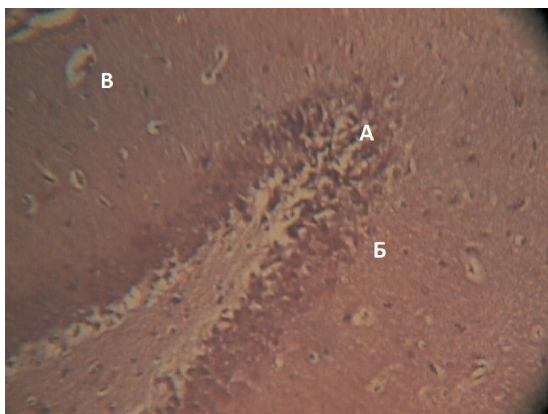


Рис. 1. Гистологические препараты животных 1-й группы (пояснения в тексте)

В 1-й группе в ядерной зоне ишемии (А) обычно обнаруживаются признаки необратимого клеточного повреждения в виде разрушения цитоплазматических и ядерных мембран [12, 13]. 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 2-й группе животных на препаратах (рис. 2) отчетливо выявляется ядерная зона инфаркта мозга (А), выявляются многочисленные клетки-«тени» (Б) (погибшие нейроны). Активированная микроглия (В) широко представлена во всей области ишемии, особенно в зоне пенумбры [15, 18]. Широко представлены признаки нейрональной дегенерации [1, 2, 18]. Выявляются признаки инфильтрации нейтрофилами (Г) ишемизированной ткани мозга [9, 12, 14, 26, 27].

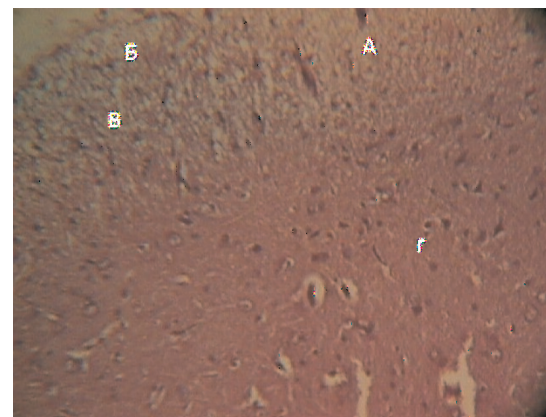
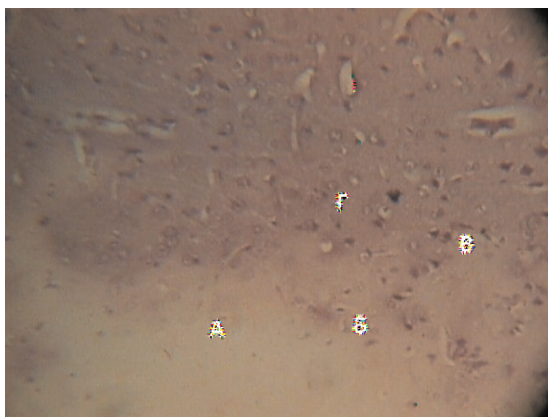


Рис. 2. Гистологические препараты животных 2-й группы (пояснения в тексте)

На рис. 3 представлены срезы мозга 3-й (контрольной) группы животных с нормальной картиной мозговой ткани. Мозговая ткань организована, четко видно слойное строение коры (А).



Рис. 3. Гистологические препараты животных 3-й группы (контроль)

Закключение

Преимущества «нашей» методики состоят том, что выживаемость после наркоза составляет 100% (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 для наркоза, использованные нами, доступны, в меньшей степени угнетают функцию дыхания и гемодинамики, чем описанные в литературе [3–8, 10–11, 17, 19–25]. Применяемые в комбинации, они обеспечивают около 1 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 выживаемость (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. – С. 3235.
2. Бурд Г.С. Дыхательная недостаточность у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения: дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1983. – С. 355.
3. Лопухин Ю.М. Экспериментальная хирургия. – М.: Медицина, 1971. – 346 с.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. – М.: ОАО «ИЗ-во «Медицина», 2005.
5. 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.
6. Badani I., Buchhold B., Hamma A. et al., Accelerated glial reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery // J. Cereb Blood Flow Metab. – 2003. – №23. – С. 845–854.
7. Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries / S. Brint, M. Jacewicz, M. Kiessling, J. Tanabe, W. Pulsinelli // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1988. – №8. – С. 474–485.
8. Up-regulation of TACE/ADAM17 after ischemic preconditioning is involved in brain tolerance / A. Cardenas, M.A. Moro, J.C. Leza, E. OrShea, A. Davalos, J. Castillo, P. Lorenzo, I. Lizasoain // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2002. – №22. – С. 1297–1302. Coyle P: Middle cerebral artery occlusion in the young rat. Stroke 1982, 13:855-859.
9. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study / R.K. Clark, E.V. Lee, C.J. Fish, R.F. White, W.J. Price, Z.L. Jonak, G.Z. Feuerstein // Brain Res Bull. – 1993. – №31. – P. 565–572.
10. Chen, S.T. et al., A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction // Stroke. – 1986. – №17. – P. 738.
11. Chen P., Goldberg D.E., Kolb B. L.M., et al. Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke. ProcNatlAcadSci USA. 2002; 99:9031-9036.
12. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats / J.H. Garcia, S. Wagner, K.F. Liu, X.J. Hu // Stroke. – 1995. – №26. – P. 627–635.
13. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat / J.H. Garcia, Y. Yoshida, H. Chen, Y. Li, Z.G. Zhang, J. Lian, S. Chen, M. Chopp // Am J Pathol. – 1993. – №142. – P. 623–635.
14. Garcia J.H., Liu K.F., Yoshida Y. et al. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat) // Am J Pathol. – 1994. – №144. – P. 188-199.
15. Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system / D. Giulian, M. Corpuz, S. Chapman, M. Mansouri, C. Robertson // J Neurosci Res. – 1993. – №36. – P. 681–693.
16. Iadecola C. Mechanisms of cerebral Ischemic damage. In: Cerebral Ischemia (Wolfgang Walz ed.) // New Jersey. – Totowa, Humana Press, 1999. – №3. – P. 33.
17. Laing R.J., Jakubowski J., Laing R.W. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best // Stroke. – 1993. – №24. – P. 294–298.
18. Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ. Characterization of microglia reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. J Comp Neurol. 1993;327:123-132.
19. 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. – P. 2196–2202.
20. The rat nervous system // Third edition edited by G. Paxinos, Academic Press. – 2004. – P. 1165–1190.
21. 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 blod flow and metabolism. – 1981. – Vol. 1. – P. 53–60.

22. Tyson G., Teasdale G., Graham D., McCulloch J. Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological change // *Ann Neurol.* – 1984. – №15. – P. 559–567.

23. Wang, Y. et al. Bone morphogenetic protein-6 reduces ischemia-induced brain damage in rats // *Stroke.* – 2001. – №32. – P. 2170–2178.

24. 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 Triborough Symposium, Biotechnology in the 21st Century and Beyond, presenting poster 10, Philadelphia. – June 8–10, 2003.

25. Manual of stroke models in rats, edited by Yanlin Wang-Fischer, CRC Press Taylor & Francis Group. – 2009.

26. 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. – P. 217–226.

27. 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. – P. 3–10.

Рецензенты:

Шантыз А.Ю., д.б.н., профессор, зав. кафедрой анатомии с.-х. животных ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет», г. Краснодар;

Абушкевич В.Г., д.м.н., профессор, профессор кафедры нормальной физиологии ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, г. Краснодар;

Быков И.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фундаментальной и клинической биохимии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздравсоцразвития России, г. Краснодар.

Работа поступила в редакцию 15.11.2011.