

ШМОНИН А. А.^{1, 2}, ДАЙНЕКО А. С.¹,
ПРОСВИРНИНА М. С.¹,
КОЛПАКОВА М. Э.¹, ШУМЕЕВА А. Г.¹,
МЕЛЬНИКОВА Е. В.¹, ВЛАСОВ Т. Д.^{1, 2}

Контроль качества эксперимента при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс по методике Koidzumi

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия
e-mail: langendorff@gmail.com

Реферат

Качественное моделирование ишемии головного мозга является одним из важных условий проведения доклинических испытаний лекарственных средств. Для создания инструмента контроля кровотока в головном мозге крысы при ишемии предложено использовать ультразвуковую доплерографию.

Цель работы — оценить эффективность использования высокочастотной ультразвуковой доплерографии для верификации мозгового кровотока при ишемии мозга у крыс.

Ишемия головного мозга крысы моделировалась по методике J. Koidzumi — 30-минутная филаментная окклюзия средней мозговой артерии (СМА). Животные были разделены на группы: 1) без доплерографического контроля; 2) с доплерографическим контролем. Для оценки кровотока была использована высокочастотная ультразвуковая доплерография («Минимакс–Допплер–К», датчик с частотой 25 МГц) через трепанационное окно в проекции левой СМА на всех этапах эксперимента. Для оценки величины зоны инфаркта использовалась окраска трифенилтетразолием. Для описания причин неудачных попыток окклюзии СМА проанализирован опыт проведения 352-х экспериментов по моделированию ишемии у крыс.

В группе 1 в 20 % опытов либо не выявлено морфологического повреждения мозга, либо инфаркт занимал весь бассейн СМА, что свидетельствует об отсутствии реперфузии. В группе с доплерографией животные без полной окклюзии СМА либо без восстановления кровотока после ишемии, исключались из исследования. Инфаркт мозга был получен во всех опытах второй группы. В группе 1 размер инфаркта составил $13,03 \pm 1,96$ %, а группе 2 — $13,39 \pm 0,69$ % ($p > 0,05$). Однако разброс значений был больше в группе 1, где не использовался контроль ультразвуковой доплерографией.

Использование ультразвуковой доплерографии позволяет отобрать животных для исследования, проконтролировать степень и стабильность окклюзии во время ишемии, исключить из эксперимента животных с атипичным мозговым кровооток, что приводит к повышению качества экспериментальной ишемии головного мозга.

Ключевые слова: транзиторная фокальная ишемия головного мозга у крыс, окклюзия среднемозговой артерии, ультразвуковая доплерография.

Введение

В настоящее время цереброваскулярная патология по-прежнему остается одной из ведущих причин смертности и инвалидизации населения [13]. Более того, прогнозируется рост смертности от ишемического инсульта до 6,7 млн человек к 2015 г., если не будут предприняты глобальные меры по борьбе с этой эпидемией [7]. Поэтому поиск новых методов защиты головного мозга от ишемического и реперфузионного повреждения является приоритетной задачей современной ангионеврологии.

Изучение новых лекарственных препаратов и методов лечения начинается с доклинических исследований на лабораторных животных [8]. Для моделирования ишемии головного мозга пред-

ложено большое количество моделей, что связано как с гетерогенностью патогенеза инсульта, так и с отсутствием моделей, удовлетворяющих требованиям современных исследователей [9, 12]. Выбор моделей ишемии определяет результат эксперимента. В современных исследованиях для моделирования ишемии мозга используются крысы, мыши, кролики, кошки, собаки, свиньи и даже ежи. Однако приблизительно в 80 % исследований моделирование ишемии производится на лабораторных крысах, так как эти животные наиболее близки к человеку по строению сосудистой системы и уровню метаболизма [12].

В наших предыдущих исследованиях [1–4] была показана большая эффективность филаментной методики фокальной транзиторной ишемии голо-

ного мозга по J. Koidzumi [11], одним из основных преимуществ которой является создание локальной ишемии головного мозга в бассейне средней мозговой артерии. Данная модель позволяет обеспечить снижение кровотока до 0–3 см/с в основном стволе СМА, что труднодостижимо при использовании других моделей [5, 6].

Относительным недостатком методики является 20 %-я вероятность формирования разрыва средней мозговой артерии (СМА) с попаданием крови в субарахноидальное пространство, а также вероятность неполной окклюзии устья СМА (2–5 %). В настоящий момент не существует эффективных методик оценки церебрального кровотока у крыс в эксперименте. Нами была предпринята попытка оценки скорости и характера кровотока с использованием прибора «Минимакс–Допплер–К» (рис. 1), с датчиком частотой излучения 25 МГц, позволяющий определять кровотоки в ткани до глубины 0,4 см.

Цель исследования: оценить эффективность использования высокочастотной ультразвуковой доплерографии («Минимакс–Допплер–К», датчик 25 МГц) для оценки качества проведения операции по моделированию фокальной транзиторной ишемии головного мозга по методике Koidzumi.

Материал и методы исследования

Эксперименты проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья № 85-23, США) и «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под общей редакцией Р. У. Хабриева, 2-е изд., 2005).

В эксперименте использованы крысы-самцы линии Wistar массой 200–250 г. Животных содержали на стандартном рационе для лабораторных крыс K-120 («Информ–корм», Россия) со свободным доступом к еде и воде. Все оперативные вмешательства проводились под анестезией хлоралгидратом (430 мг/кг), внутривенно. Протокол операции моделирования фокальной транзиторной ишемии головного мозга крысы вели по методике J. Koidzumi, (1986) [6, 10, 11]. Доступ к СМА осуществлялся через трепанационное окно в проекции корковой ветви левой СМА. Для этого производился U-образный разрез кожи с основанием лоскута, обращенным вниз. После вскрытия фасции височной мышцы височная мышца удалялась. Три фрезевых отверстия накладывались в верхнем каудальном углу операционного поля, формировалось трепанационное окно. Под операционным микроскопом (увеличение 1:80) визуализировалась СМА и оценивалась ее топография.

После оценки кровотока в левой СМА производился операционный доступ на передней поверхности шеи крысы. Полипропиленовая нить (4–00, Ethicon) длиной 22 мм, обработанная силиконом и поли-L-лизинном (далее — филламент), вводилась ретроградно в левую наружную сонную артерию, после чего проводилась через бифуркацию общей сонной артерии и внутреннюю сонную артерию к устью СМА, перекрывая его (рис. 2). Через 30 ми-



Рис. 1. Аппарат «Минимакс–Допплер–К»

нут (продолжительность ишемии) нить извлекалась, рана ушивалась. Магистральный кровоток в левой СМА оценивали через трепанационное отверстие, для чего использовали метод прямой высокочастотной ультразвуковой доплерографии при помощи прибора «Минимакс–Допплер–К», датчик 25 МГц («Минимакс», Санкт-Петербург). Для улучшенного проведения звукового сигнала использовали эхо-гель. Датчик располагали непосредственно над поверхностью мозга, таким образом, чтобы ось основной ветви СМА и продольная ось датчика располагались по одной линии. В нашем исследовании использовали оценку систолической и диастолической скоростей кровотока и индексов резистентности.

Изучение скорости кровотока производили на всех этапах эксперимента для оценки качества моделируемой ишемии (глубины ишемии): до ишемии (после трепанации), во время ишемии (в начале ишемии и перед реперфузией), сразу после восстановления кровотока (при транзиторной ишемии) и через 30 минут.

Животные были разделены на 2 группы:

- группа 1 (n=25) — 30-минутная эндоваскулярная окклюзия левой СМА без использования ультразвукового контроля во время опыта;
- группа 2 (n=20) — 30-минутная эндоваскулярная окклюзия левой СМА с использованием ультразвукового доплерографического контроля на всех этапах опыта.

Оценка величины зоны инфаркта производилась с помощью количественного анализа срезов мозга, гистохимически окрашенных хлоридом трифенилтетразолия (ТТС). Для этого срезы головного мозга толщиной 3 мм инкубировали в 0,1 %-м растворе трифенилтетразолия хлорида (MP Biomed., США) при $t=37,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут. Затем получали

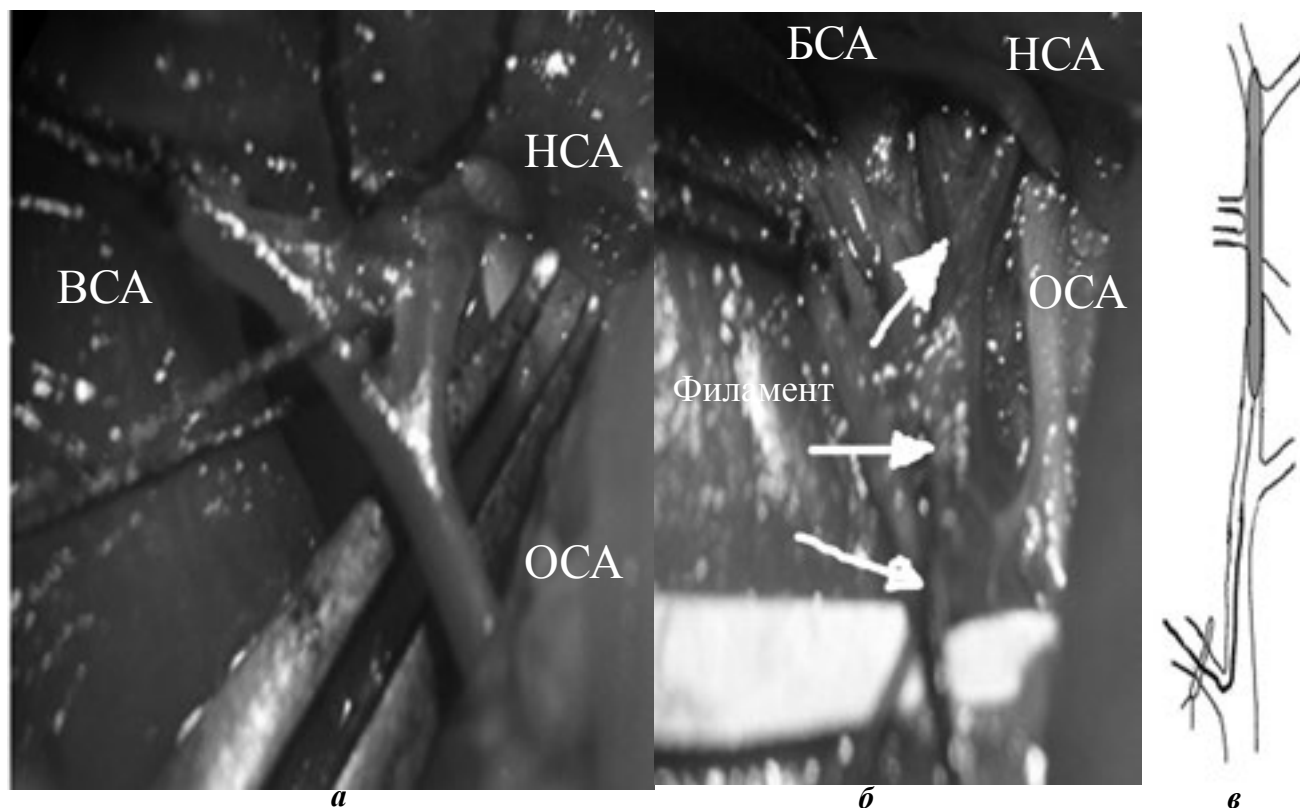


Рис. 2. Схема моделирования окклюзии СМА по J. Koidzumi, 1986 [11]: *а* — выделена бифуркация внутренней сонной артерии; *б* — во внутреннюю сонную артерию введен филамент через наружную сонную артерию; *в* — схема расположения филамента в СМА; ОСА — общая сонная артерия, ВСА — внутренняя сонная артерия, НСА — наружная сонная артерия

цифровые фотографии поверхности срезов. Анализировали 5 срезов мозга толщиной 3 мм, произведенных во фронтальной плоскости. Вычисляли средний относительный показатель объема инфаркта.

Для описания причин неудачных попыток окклюзии СМА и отсутствия реперфузии был проанализирован собственный опыт проведения экспериментов по моделированию фокальной транзиторной ишемии на 352-х крысах самцах линии Вистар. Скорость кровотока по СМА оценивалась на всех этапах исследования.

Результаты исследования и их обсуждение

В первой группе в 20 % опытов не выявлено морфологического повреждения при окраске с применением ТТС, либо инфаркт по размеру занимал весь бассейн СМА, что свидетельствует об отсутствии реперфузии. После исключения животных без инфаркта и животных с большим инфарктом из первой группы производилась оценка размера ишемического очага. В группе 1 он составил $13,03 \pm 1,96$ %, а группе 2 — $13,39 \pm 0,69$ % ($p > 0,05$). Статистически значимой разницы между группами не выявлено. Однако разброс значений, и, следовательно, показатель стандартного отклонения был больше в первой группе, где не использовался контроль ультразвуковой доплерографии.

Во группе 2 во время эксперимента при сохранении кровотока в СМА по данным доплерографии после введения филамента (т. е. при неполной окклюзии СМА) нить проводилась чуть дальше или использовалась другая нить для достижения полной окклюзии, что подтверждалось данными доплерографии (рис. 3, *а*). Животные, у которых полная окклюзия СМА не достигалась (рис. 3, *б*) или не происходило восстановления кровотока во время реперфузии (рис. 3, *в*) (например, при субарахноидальном кровоизлиянии), исключались из групп. Таким образом, инфаркт мозга был получен во всех опытах второй группы, а доплерографический контроль позволил исключить опыты, где невозможно было добиться полноценной окклюзии СМА при введении филамента (около 5 %).

При проведении ультразвуковой доплерографии наиболее информативным показателем была систолическая линейная скорость, и для оценки использовалось максимальное из зарегистрированных значений. В норме систолическая линейная скорость в бассейне левой СМА имела большой разброс значений и составляла 42 (31; 57) см/с. При эффективной окклюзии СМА происходило снижение систолической линейной скорости кровотока до $3,1 \pm 1,1$ см/с, в конце ишемии скорость не изменялась и составляла также $3,1 \pm 1,3$ см/с. После извлечения филамента кровоток восстанавливался и в начале реперфузии достигал до 35 ± 10 см/с, что достоверно не отличалось от исходных значений до ишемии.

При анализе ранее проведенных экспериментов по моделированию фокальной транзиторной ишемии на 352-х крысах самцах Вистар были выявлены следующие причины, которые не позволили добиться полной окклюзии СМА (сохранение кровотока в СМА после введения филамента) или привели к ситуации, когда отсутствовала реперфузия после извлечения филамента:

— невозможность ввести филамент во внутрен-

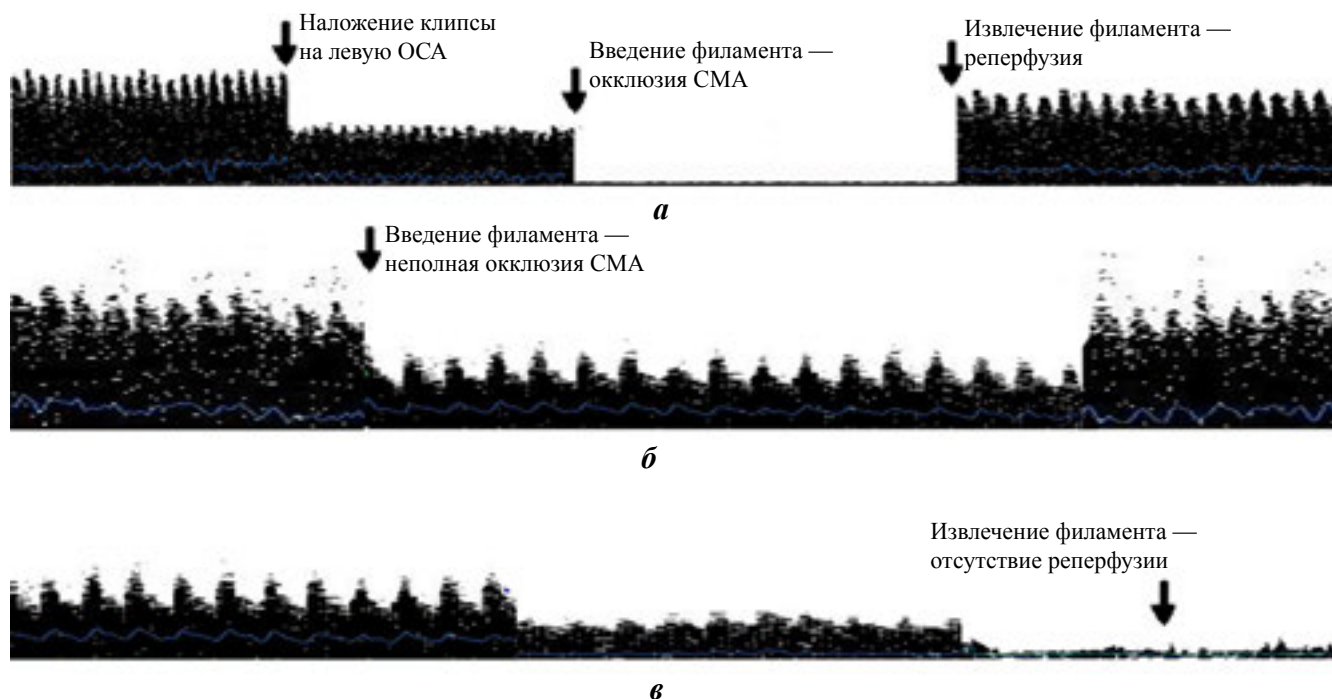


Рис. 3. Допплерограмма СМА у крыс при различных вариантах окклюзии СМА филаментом: *а* — пример доплерограммы в успешном опыте (полная окклюзия СМА после введения и полное восстановление кровотока после извлечения филамента); *б* — неполная окклюзия СМА — введение филамента требует коррекции или опыт должен будет исключен из исследования; *в* — отсутствие реперфузии по СМА после извлечения филамента — опыт должен будет исключен из исследования.

нюю сонную артерию из-за анатомически узкого входа в полость черепа;

- недостаточно глубокое введение филамента (частая ошибка неопытных исследователей, которая устраняется повторной коррекцией положения филамента относительно СМА);

- введение филамента не во внутреннюю, а в наружную сонную артерию (также частая ошибка неопытных исследователей);

- перфорация стенки артерии при введении филамента на любом этапе исследования;

- несоответствие диаметра СМА и филамента (филамент имеет меньший диаметр, чем СМА, — требуется замена филамента). В наших опытах использовались только крысы весом от 200 до 250 г. Превышение данных показателей не позволяет моделировать качественную полную ишемию мозга из-за большего диаметра средней мозговой артерии;

- аномалии развития сосудов (высокая или низкая бифуркация сонных артерий);

- разрыв СМА и субарахноидальное кровоизлияние или паренхиматозное кровоизлияние, которые приводят к сдавлению СМА и отсутствию реперфузии (инфаркт занимает 100 % бассейна СМА);

- пристеночное тромбообразование, которое приводит к отсутствию реперфузии по СМА после извлечения филамента (инфаркт занимает 100 % бассейна СМА). Такое осложнение встречается не чаще 5 % случаев.

Таким образом, использование ультразвуковой доплерографии позволяет на ранних этапах эксперимента отобрать животных для включения в исследование, проконтролировать степень окклюзии, исключить из эксперимента животных с атипичным кровотоком в головном мозге и проконтролировать

стабильность окклюзии во время ишемии. Эти особенности приводят к повышению качества экспериментальной ишемии головного мозга, а также способствуют экономии животных.

Выводы

Как показали наши исследования, для моделирования фокальной транзиторной ишемии очень важно контролировать характер кровотока в средней мозговой артерии. Для этой цели можно эффективно использовать высокочастотную ультразвуковую доплерографию («Минимакс–Допплер–К», датчик 25 МГц).

При фокальной ишемии мозга у крыс высокочастотная ультразвуковая доплерография с помощью прибора «Минимакс–Допплер–К» (датчик 25 МГц) может быть использована для:

- тестирования филаментов для окклюзии СМА у крыс по методике Koidzumi [11] (например, после их изготовления);

- контроля степени окклюзии СМА при ишемии мозга;

- оценки стабильности расположения филамента во время ишемии;

- контроля восстановления кровотока после извлечения филамента;

- отбора животных для опыта, стандартизации по гемодинамике: исключение крыс с исходно низкими или высокими показателями линейной скорости кровотока;

- контроля состояния животного во время опыта, УЗ-сигнал меняется при изменении системного артериального давления;

- оценки влияния фармакологических препаратов на церебральную гемодинамику.

Литература

1. Власов Т. Д., Байса А. Е., Шмонин А. А. и др. Защитный эффект ишемического preconditionирования при фокальной ишемии головного мозга крысы различной продолжительности // *Клин. патофизиол.* 2008. № 1. С. 54–57.
2. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Байса А. Е., Власов Т. Д. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии // *Бюлл. эксперимент. биол. мед.* 2009. № 147(2). С. 217–219.
3. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г., Власов Т. Д. Структурная организация микроглиоцитов-стриатума после транзиторной фокальной ишемии // *Морфология.* 2012. № 141(2). С. 28–32.
4. Шмонин А. А., Байса А. Е., Мельникова Е. В. и др. Защитные эффекты раннего ишемического preconditionирования при фокальной ишемии мозга у крыс: роль коллатерального кровообращения // *Росс. физиолог. журн. им. И. М. Сеченова.* 2011. № 97(2). С. 203–213.
5. Шмонин А. А. Перевязка средней мозговой артерии крысы: сравнение модификаций моделей фокальной ишемии мозга у крысы // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2011. №3 (39). С. 68–76.
6. Belayev L. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation // *Brain. Res.* 1999. № 833(2). P. 181–190.
7. Culebras A. Stroke is preventable catastrophic disease // *Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова* // *Цереброваскулярная патология и инсульт: Материалы II Росс. международ. конгр. «».* 2007. С. 75–76.
8. Durukan A., Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2007. № 87(1). P. 179–197.
9. Graham S.M., McCullough L.D., Murphy S.J. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care // *Comp. Med.* 2004. № 54 (5). P. 486–496.
10. Longa E. Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats // *Stroke.* 1989. № 20. P. 84–91.
11. Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic // *Jpn. J. Stroke.* 1986. № 8. P. 1–8.
12. Wang-Fischer Y. *Manual of Stroke Models in Rats.* N.-Y.: Taylor & Francis Group, 2009.
13. Warlow C.P. Epidemiology of stroke // *Lancet.* 1998. № 352 (3). P. 1–4.

UDK [616.831 – 005.4 : 61.001.57] – 092.4

**Shmonin A. A.^{1, 2}, Dayneko A. S.^{1, 2}, Prosvirnina M. S.¹,
Kolpakova M. E.¹, Shumeeva A. G.¹, Melnikova E. V.¹,
Vlasov T. D.^{1, 2}**

Quality control of the experiment during focal cerebral ischemia in rats by Koidzumi

¹First Pavlov state medical university of St. Petersburg, St. Petersburg, Russia

²Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

e-mail: langendorff@gmail.com

Abstract

Introduction. The quality control of experimental focal cerebral ischemia is one of the most important prerequisites of preclinical studies in rodents. We suggest ultrasound Doppler examination to be useful instrument for cerebral blood flow assessment during MCA occlusion in rats.

The aim of our work was to test efficacy of the ultrasound Doppler examination for cerebral blood flow verification during MCA occlusion in rats.

Methods. We applied focal cerebral ischemia by Koizumi. All animals were subjected to 30 minutes of MCA occlusion via filament implantation. They were divided in two groups: 1) without ultrasound Doppler examination and 2) with ultrasound Doppler examination. We performed left craniectomy for monitoring the efficacy of ischemia with the help of ultrasound dopplerography («Minimax-Doppler-K» sensor 25 MHz). Brain tissue slices were stained with 2 % triphenyl tetrazolium chloride (TTC) to assess the infarction volume.

Results. 20 % of experiments in first group didn't show morphological brain lesion after TTC staining, or infarction spanned the entire MCA territory which is indicative of the lack of reperfusion. There was no significant difference in infarction size between two groups. However, the values were more heterogenous in group 1.

Conclusion. By using dopplerography in experimental group we could exclude the animals with severe no-reflow. Ultrasonic dopplerography offers the opportunity of selecting animals, control occlusion extent, and occlusion stability during the ischemia, while the animals with atypical brain blood supply could be excluded. Eventually, it results in better reproducibility of experimental brain ischemia and promote animal saving.

Keywords: Koizumi focal transient rat's brain ischemia model, middle cerebral artery occlusion, ultrasonic dopplerography.

References

1. Vlasov T.D., Bajsa A.E., Shmonin A.A. et al. Zashhitnyj jeffekt ishemicheskogo pre Kondicionirovaniya pri fokal'noj ishemii golovnog mozga krysy razlichnoj prodolzhitel'nosti // *Klinicheskaja patofiziologija* [Clinical pathophysiology]. 2008. No 1. P.54-57. [Protective effect of ischemic preconditioning at focal ischemia of rat brain of various duration]. [In Russian].
2. Korzhevskij D.Je., Kirik O.V., Bajsa A.E. et al. Modelirovanie odностороннего ishemicheskogo povrezhdeniya neјronov striatuma s pomoshh'ju neprodolzhitel'noj okkljuzii srednej mozgovoj arterii // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny* [Bull Exp Biol Med]. 2009. Vol 147(2). P. 217-219. [Modeling of unilateral ischemic damage of striatum neurons by short occlusion of middle brain artery]. [In Russian].
3. Korzhevskij D.Je., Kirik O.V., Suhorukova E.G. et al. Strukturnaja organizacija mikroglіocіtov striatuma posle tranzіtornoj fokal'noj ishemii // *Morfologija* [Morphology]. 2012. V. 141(2). P.28-32. [The structural organization of microglіocіtes of a striatum after transient focal ischemia]. [In Russian].
4. Shmonin A.A., Bajsa A.E., Mel'nikova E.V., Vasilov V.N., Vlasov T.D. Zashhitnye jeffekty rannego ishemicheskogo pre Kondicionirovaniya pri fokal'noj ishemii mozga u krysy: rol' kollateral'nogo krovoobrashhenija // *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*. [Russian Journal of physiology]. 2011. Vol 97(2). P. 203-213. [Protective effects of an early ischemic preconditioning at focal ischemia of rat's brain: role of collateral blood circulation]. [In Russian].
5. Shmonin A.A. Perevjazka srednej mozgovoj arterii krysy: sravnenіe modіfkacіj modelej fokal'noj ishemii mozga u krysy // *Regionarnoe krovoobrashhenіe і mikroсіrkuljacіja* [Regional haemodynamic and microcirculation]. 2011. V.3 (39). P. 68-76. [Bandaging of an average brain artery of a rat: comparison of modifications of models of focal ischemia of a brain at a rat]. [In Russian].
6. Belayev L. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation // *Brain. Res.* 1999. № 833(2). P. 181–190.
7. Culebras A. Stroke is preventable catastrophic disease // *Журн. неврол.и психиатрии*. С.С. Корсакова // *Цереброваскулярная патология и инсульт: Материалы II Росс. междунаро. конгр. «»*. 2007. С. 75–76.
8. Durukan A., Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2007. № 87(1). P. 179–197.
9. Graham S. M., McCullough L. D., Murphy S. J. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care // *Comp. Med.* 2004. № 54 (5). P. 486–496.
10. Longa E. Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats // *Stroke*. 1989. № 20. P. 84–91.
11. Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic // *Jpn. J. Stroke*. 1986. № 8. P. 1–8.
12. Wang-Fischer Y. *Manual of Stroke Models in Rats*. N.-Y.: Taylor & Francis Group, 2009.
13. Warlow C. P. Epidemiology of stroke // *Lancet*. 1998. № 352 (3). P. 1–4.