

Перевязка средней мозговой артерии крысы: сравнение модификаций моделей фокальной ишемии мозга у крысы

*Кафедра неврологии с клиникой Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова; Институт экспериментальной медицины Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова
e-mail: langendorff@gmail.com*

Реферат

Было выбрано 5 модификаций ишемии мозга, вызванных окклюзией левой СМА, 2 с реперфузией и 3 без реперфузии: перевязка изолированно левой СМА, окклюзия левой СМА на 40 минут, перевязка левой СМА и левой общей сонной артерии (ОСА), перевязка левой СМА и обеих ОСА, окклюзия левой СМА и обеих ОСА на 40 минут. На первом этапе изучали кровоток в бассейне левой СМА при окклюзии артерий и зону нарушения перфузии (зону «ишемического риска», или зону нарушения перфузии). На втором этапе сравнивали выраженность повреждения и однородность данных: через 48 часов после моделирования ишемии изучали повреждение мозга, используя оценку размера инфаркта, неврологического дефицита по шкале Гарсия и выраженность отека мозга.

Ишемическое повреждение было получено при использовании всех вариантов модели ишемии мозга. Однако при постоянной или 40-минутной окклюзии левой СМА размер некроза был маленьким и неоднородным, не возникало отека мозга и неврологического дефицита. При окклюзии левой СМА и левой ОСА возникал значимый некроз и отек головного мозга, но не возникало неврологического дефицита. Данные были недостаточно однородны. При окклюзии левой СМА и обеих ОСА с реперфузией (40-минутная окклюзия) или без возникало значимое снижение кровотока, формировались некроз и отек ткани головного мозга, развивался стойкий и выраженный неврологический дефицит. Однако при перевязке обеих ОСА и левой СМА без реперфузии возникали инфекционные осложнения, связанные с длительной ишемией. При транзиторной окклюзии этих артерий на 40 минут инфекционных осложнений не возникало и данные были более однородны.

Из всех пяти предложенных моделей фокальной ишемии головного мозга только модель 40-минутной окклюзии ОСА и перевязки левой СМА позволяет получить необходимые для экспериментальной оценки и однородные показатели фокального ишемического повреждения головного мозга. Для оценки ишемического повреждения головного мозга крысы целесообразно использовать оценку размера инфаркта и отека мозга с применением трифенилтетразолия хлорида, оценку неврологического дефицита по шкале Гарсия, кровотока с применением высокочастотной ультразвуковой доплерографии и оценку зоны нарушения перфузии с применением окраски синим Эванса.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, модели инсульта, окклюзия средней мозговой артерии, крысы, размер инфаркта, неврологический дефицит, коллатеральный кровоток.

Shmonin A. A.

Reopoliglucin and blood photo modification influence on patient's with peripheral occlusive disease peripheral blood flow

*I. P. Pavlov Saint-Petersburg Medical University; V. A. Almazov Federal Centre of Heart, Blood and Endocrinology
e-mail: langendorff@gmail.com*

Abstract

Five models of focal cerebral ischemia in the rat were tested: 1. Isolated left MCA ligation; 2. 40-min left MCA occlusion; 3. Permanent ligation of both left common carotid artery (LCCA) and left MCA; 4. Permanent bilateral common carotid artery (BCCA) and left MCA ligation; 5. Permanent left MCA ligation and 40-min BCCA occlusion with reperfusion (Zhao H., 2006). Adult male Wistar rats were randomly subjected to one of the protocols of focal cerebral ischemia. Cerebral blood flow and anatomical area at risk (comprises ischemic penumbra and ischemic core) were determined in the following groups: 1. Isolated permanent left MCA ligation; 2. Permanent ligation of both left common carotid artery (LCCA) and left MCA; 3. Permanent BCCA and left MCA ligation.

Blood flow in the MCA vascular bed was measured with use of Doppler ultrasound. Evans blue was used for delineation of anatomical area at risk. Histochemical determination of infarct size with triphenyltetrazolium chloride staining, evaluation of neurological deficit (Garcia score) and extent of brain swelling (asymmetry of cerebral hemisphere) were performed 48 hours after ischemia in all groups.

The evidence for ischemic cerebral injury was obtained in all groups. Isolated left MCA ligation and 40-min left MCA occlusion produced small infarct size and anatomical area at risk. These protocols were not associated with neurological deficit or brain swelling.

Permanent ligation of both LCCA and MCA resulted in significant variability in infarct size, anatomical area at risk and brain swelling with no neurological deficit. Permanent bilateral ligation of CCA and left MCA as well as permanent left MCA ligation with 40-min BCCA occlusion demonstrated the best characteristics: reproducible data on infarct size, anatomical area at risk, extent of brain swelling and neurological deficit.

Permanent BCCA and left MCA ligation was associated with infectious complications; in contrast, permanent left MCA ligation with 40-min BCCA occlusion did not produce infection.

Permanent left MCA ligation with 40-min bilateral CCA occlusion can be recommended for preclinical research on neuroprotection as the most reproducible and reliable model of focal cerebral ischemia.

Keywords: transient and permanent focal brain ischemia, experimental models, rat, infarct size, neurological deficit, collateral circulation, cerebral blood flow.

Введение

Ежегодно в России поражается более 450 000 человек, т. е. каждые 1,5 минуты кто-то из россиян впервые переносит инсульт. Кроме того, наблюдается увеличение заболеваемости инсультом лиц работоспособного возраста — до 64 лет [3]. Разработка новых методов лекарственной терапии инсультов является приоритетной задачей современных российских исследователей.

Изучение новых лекарственных препаратов и методов лечения начинается с доклинических исследований на лабораторных животных [8]. Для моделирования ишемии головного мозга предложено большое количество моделей, что связано как с гетерогенностью патогенеза инсульта, так и с отсутствием моделей, удовлетворяющих требованиям современных исследователей [12, 20]. Выбор моделей ишемии определяет результат эксперимента.

В настоящий момент для моделирования ишемии используют следующих экспериментальных животных: крысы, мыши, кролики, кошки, собаки, свиньи и даже ежи. 80 % исследователей предпочитают лабораторных крыс, так как эти животные наиболее близки к человеку по строению сосудистой системы и уровню метаболизма [20].

Выделяют глобальную (ишемия всего мозга) и фокальную (ишемия на участке мозга, ограниченного здоровой тканью) модели ишемии, а в зависимости от полноты нарушения кровообращения модели делят на неполную и полную ишемию [12, 19, 20]. В данной статье обсуждается вопрос только фокальной неполной ишемии мозга, так как именно она является экспериментальным эквивалентом ишемического инсульта. Наиболее часто используется два варианта моделей ишемии: филаментная модель и перевязка средней мозговой артерии. Филаментная модель предложена в 1986 г. J. Koitsumi [15] и имеет множество вариаций. Она сложна в исполнении (необходимо изготовление и тестирование филаментов), требует животных небольшого веса (200–250 г), и, главное, она не позволяет использовать ишемию без реперфузии. Модель, основным этапом которой является перевязка СМА, имеет еще большее количество вариаций. Однако ее преимуществом является простота выполнения операции, возможность воспроизводить ишемию у животных разной массы и моделировать ишемию как с реперфузией, так и без реперфузии. На основании анализа литературы нами были разработаны условия, которым должны соответствовать экспериментальные модели ишемии мозга:

1) при моделировании ишемии должны формироваться значимое снижение кровотока в пораженной артерии, стабильная и воспроизводимая зона нару-

шения перфузии и некроза ткани головного мозга, отчетливый неврологический дефицит;

2) операция должна наносить минимальную травматизацию и выполняться быстро;

3) модель должна быть проста в исполнении.

Нами была выбрана модель перевязки СМА у крыс, поскольку она в наибольшей степени соответствует вышеуказанным требованиям.

При использовании данной модели эксперимент состоит из трех этапов: оперативный доступ, моделирование ишемии и ушивание раны. Основные вариации при моделировании ишемии возможны на втором этапе эксперимента. Доступ к СМА получается за счет трепанации черепа в височной области, а в зависимости от особенностей и количества окклюзируемых артерий используется три основных модификаций данной модели [20]:

— перевязка только СМА [7, 18];

— окклюзия ипсилатеральных СМА и ОСА [5, 7];

— окклюзия двух ОСА и одной СМА [7].

Результатом моделирования является создание фокальной неполной ишемии без реперфузии (перманентной ишемии). Однако окклюзия может быть не постоянной, а транзиторной. Таким образом, возможно использование ишемии с реперфузией:

— транзиторная окклюзия СМА на 30–40 минут [2, 18];

— транзиторная окклюзия двух ОСА и СМА на 30–40 минут [21, 22].

Цель исследования

Сравнить модификации моделей фокальной ишемии, вызванной перевязкой СМА.

Задачи:

1) оценить кровоток в бассейне СМА при окклюзии СМА и ОСА;

2) изучить зону нарушения перфузии, размер инфаркта, отек головного мозга и неврологический дефицит при использовании всех модификаций моделей;

3) сравнить и выбрать модификации моделей, наиболее соответствующие требованиям современных экспериментаторов.

Материал и методы исследования

Исследование проводилось на крысах-самцах (n=97) линии Вистар массой 250–300 г под хлоралгидратной анестезией (550 мг/кг).

На первом этапе исследования оценивали кровоток в бассейне левой СМА в норме, при окклюзии левой СМА, левой ОСА, обеих ОСА и при комбинированной окклюзии левых СМА и ОСА, левой СМА и обеих ОСА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки размера зоны нарушения перфузии использовались три экспериментальные группы (соответственно трем вариантам окклюзии артерий на втором этапе исследования):

группа 1 — перевязка только СМА и немедленное определение размера зоны нарушения перфузии;

группа 2 — перевязка левых СМА и ОСА и немедленное определение размера зоны нарушения перфузии;

группа 3 — перевязка левой СМА и двух ОСА и немедленное определение размера зоны нарушения перфузии.

На втором этапе исследования моделировали ишемию с применением всех пяти (трех без реперфузии и двух с реперфузией) модификаций модели (рис. 1).

Группа 1 — транзиторная окклюзия СМА выполнялась по методике Поляковой Е. А., и др. [2, 18]. После выделения левой СМА лигатура-держалка не затягивалась, на ее концах формировались петли, которые растягивались за счет конструкции равномерно растянутых нитей. За счет поднятия СМА над поверхностью мозга на лигатурах-держалках происходило формирование перегиба, что приводило к временной окклюзии артерии и формированию ишемии. Для реперфузии лигатура-держалка опускалась, перегиб ликвидировался и кровоток восстанавливался (транзиторная ишемия — с реперфузией).

Группа 2 — перевязка изолированно левой СМА (без реперфузии) [7, 18].

Группа 3 — перевязка левых СМА и ОСА (без реперфузии) [5, 7].

Группа 4 — перевязка обеих ОСА и левой СМА (без реперфузии) [7].

Группа 5 — перевязка левой СМА и наложение клипс на обе ОСА на 40 минут по методике Н. Zhao. [21, 22] (транзиторная ишемия — с реперфузией).

Доступ к СМА и ОСА. Для моделирования ишемии и изучения кровотока в бассейне СМА необхо-

димо получить доступ к левой СМА и ОСА. 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. Далее расширяли операционный доступ. Под операционным микроскопом (увеличение 1:80) визуализировалась СМА и оценивалась ее топография. Цвет артерии — красно-розовый, а вены — багряно-красный. Артерию отличает более прямой ход, а вену — более извитой.

Перевязка корковой ветви левой СМА осуществлялась полипропиленовой нитью (7-0). Многие авторы предлагают использовать коагуляцию СМА [18]. Однако наш опыт показал, что технически выполнить коагуляцию сложнее и менее безопасно, чем перевязку СМА. Так, в случае неумелого расположения коагулирующего электрода возможно повреждение ткани головного мозга и развитие неврологического дефицита, не связанного с ишемией. Причем после окраски ткани головного мозга трифенилтетразолия хлоридом ишемическое и температурное повреждения будут выглядеть одинаково (белого цвета).

Для доступа к ОСА производится разрез по белой линии шеи. Кожа разводится в стороны. ОСА располагается между глубокими мышцами шеи в составе сосудисто-нервного пучка, и ее можно увидеть, отодвинув грудино-ключично-сосцевидную мышцу. ОСА отделяется от других элементов сосудисто-нервного пучка, а после этого под нее подводится лигатура.

Через 48 часов после моделирования ишемии изучали повреждение мозга, используя оценку размера инфаркта, неврологического дефицита по шкале Гарсия (табл. 1) [11] и выраженность отека мозга.

Оценка магистрального кровотока. Магистральный кровоток оценивали в бассейне левой СМА через трепанационное отверстие, для чего использовали метод прямой высокочастотной ультразвуковой доплерографии при помощи прибора «Минимакс-Допплер-К», датчик 20 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.

Оценка зоны нарушения перфузии («зоны риска», или «зоны ишемии»). Для оценки степени тканевой перфузии в ишемизированной области исследовалась так называемая «зона ишемии». Зона ишемии [21, 22] (некоторые авторы называют ее зоной риска [1]) включает в себя зоны ядра ишемии и «ишемической пенумбры». Для определения зоны ишемии использовалось введение синего Эванса («Вектон», Россия) в левый желудочек. Через 5 секунд животное выводилось из эксперимента и мозг извлекался для

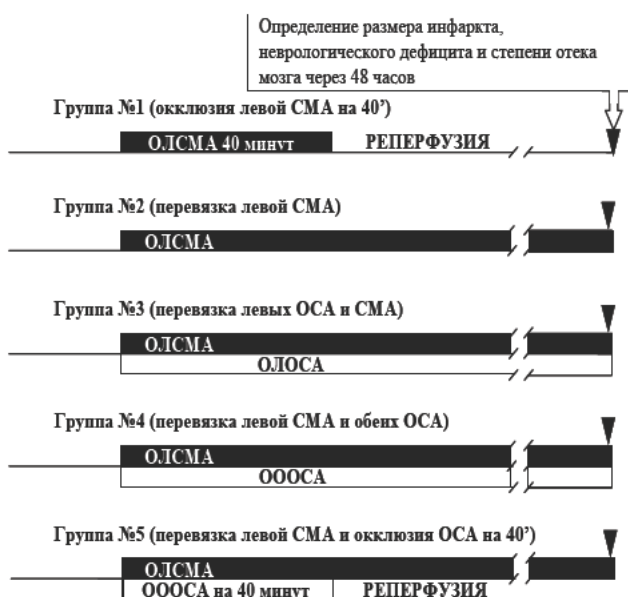


Рис. 1. Протокол второго этапа исследования

Шкала неврологического дефицита Гарсия у крыс с инсультом

Таблица 1

Параметр	Количество баллов			
	0	1	2	3
Спонтанная активность (в клетке в течение 5 мин)	Движения отсутствуют	Едва двигается	Двигается, но не приближается, по крайней мере, к трем сторонам клетки	Двигается и достигает, по крайней мере, трех сторон клетки
Симметричность движений (4 конечности)	Левая сторона: отсутствует движение	Левая сторона: небольшое движение	Левая сторона: двигается медленно	Обе стороны: двигаются симметрично
Симметричность предплечий (крыса вытягивает конечности, когда ее держат за хвост)	Левая сторона: отсутствует движение, отсутствует вытягивание конечностей	Левая сторона: небольшое движение, чтобы вытянуть конечности	Левая сторона: двигается и пытается вытянуть конечность меньше, чем с правой стороны	Симметричные вытягивания
Забирается по стенке проволочной клетки	—	Не удается забраться	Левая сторона слабая	Нормально забирается
Реакция на прикосновение к каждой стороне туловища	—	Отсутствует ответ с левой стороны	Слабый ответ с левой стороны	Симметричный ответ
Ответ на прикосновение вибриссы	—	Отсутствует ответ с левой стороны	Слабый ответ с левой стороны	Симметричный ответ

дальнейшего исследования. Синий Эванса попадал в хорошо перфузируемые участки мозга, окрашивая ткани в синий свет. Оставшиеся неокрашенными участки мозга составляли зону ишемии. Анализировалось 5 срезов мозга толщиной 2 мм, произведенных во фронтальной плоскости. Вычисляли средний относительный показатель площади нарушения кровотока (как в целом, так и отдельно для коры и подкорковых структур).

Оценка размера зоны повреждения и выраженности отека мозга. Оценка величины зоны инфаркта производилась с помощью количественного анализа срезов мозга, гистохимически окрашенных хлоридом трифенилтетразолия [4, 14]. Для этого срезы головного мозга толщиной 3 мм инкубировали в 0,1%-м растворе трифенилтетразолия хлорида (MP Biomed., США) при $t=37,0$ °C в течение 15 минут. Затем получали цифровые фотографии поверхности срезов.

Анализировали 5 срезов мозга толщиной 3 мм, произведенных во фронтальной плоскости. Вычисляли средний относительный показатель площади инфаркта и коэффициент асимметрии полушарий головного мозга (процентное отношение площади пораженного полушария к площади всего среза).

Статистический анализ данных. Осуществлялся с помощью программного пакета SPSS 12,0. Сравнивали медианы и дисперсии. Для статистической оценки двух независимых выборок использовали критерий Манна-Уитни.

Результат представлен в виде графиков «с точками», «ящики и усы» и таблиц, а значения приведены в виде медианы и 25 и 75 % процентилей в круглых скобках.

Результаты исследования и их обсуждение

Первый этап исследования — оценка топографии левой СМА, исследование кровотока в бассейне левой СМА и изучение размера зоны нарушения перфузии. При исследовании топографии СМА было выделено три варианта ветвления СМА: магистральный, рассыпной и смешанный, которые встречались с частотой 61, 6 и 34 % соответственно [10, 17]. При магистральном типе можно было видеть основную корковую ветвь СМА, которая проходит через все операционное поле, видны мелкие ответвления по ходу артерии. При рассыпном типе происходит разделение артерии на несколько ветвей еще до вхождения в проекцию трепанационного отверстия, и в операционном поле видно сразу несколько ветвей артерии. При смешанном варианте разделение артерии на ветви происходит в проекции трепанационного отверстия, но артерия сразу делится на множество мелких ветвей. При рассыпном типе крайне сложно было вызвать окклюзию СМА. Так, попытки перевязать все ветви СМА приводили к дополнительному повреждению мозга, но не вызывали значимого снижения кровотока по данным ультразвуковой доплерографии.

На рис. 2 представлены показатели кровотока в бассейне левой СМА при пережатии основных артерий во время моделирования ишемии мозга. После окклюзии сосудов наблюдалась доплерографическая картина, характерная для постстенотического кровотока. Наиболее информативным показателем была систолическая линейная скорость, и для оценки использовалось максимальное из зарегистрированных значений. В норме систолическая линейная

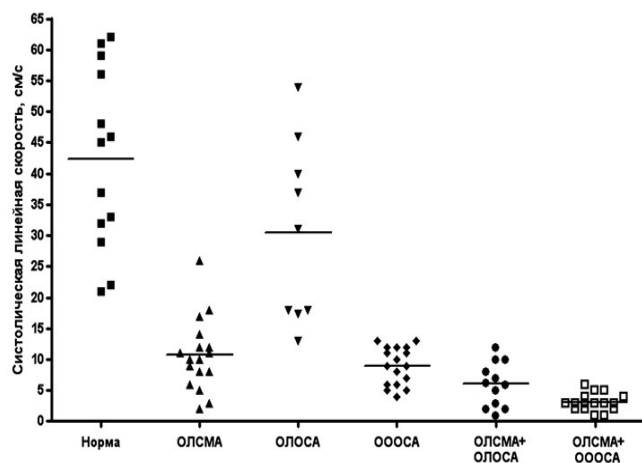


Рис. 2. Систолическая линейная скорость в бассейне левой СМА после окклюзии основных артерий: ОЛСМА — окклюзия (перевязка или пережатие) левой СМА; ОЛОСА — окклюзия (перевязка или пережатие) левой ОСА; ОООСА — окклюзия (перевязка или пережатие) обеих ОСА; ОЛСМА+ОЛОСА — окклюзия (перевязка или пережатие) левой СМА и левой ОСА; ОЛСМА+ОООСА — окклюзия (перевязка или пережатие) левой СМА и обеих ОСА

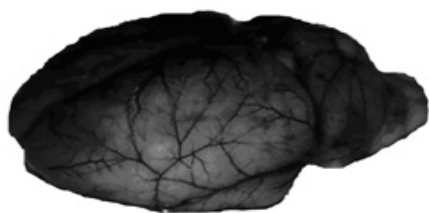


Рис. 3. Мозг после перевязки левой СМА и обеих ОСА и введения синего Эванса. Видна зона нарушения перфузии, которая захватывает лобную, височную, теменную и небольшую затылочную области

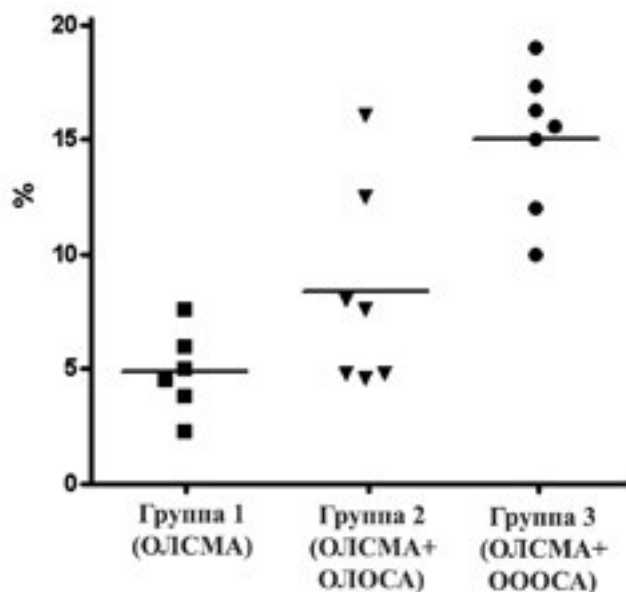


Рис. 4. Оценка размера зоны нарушения перфузии («зона риска») во всех группах первого этапа: ОЛСМА — окклюзия (перевязка) левой СМА; ОЛСМА+ОЛОСА — окклюзия (перевязка) левой СМА и левой ОСА; ОЛСМА+ОООСА — окклюзия (перевязка) левой СМА и обеих ОСА

скорость в бассейне левой СМА имела большой разброс значений (дисперсия, вариабельность — 210) и составляла 42 (31; 57) см/с. При перевязке левой ОСА систолическая линейная скорость уменьшалась незначимо ($p=0,071$) по сравнению с нормой — до 31 (18; 41) см/с, и дисперсия по своим значениям приближалась к норме — 214. Известно, что у крыс в головном мозге очень развито коллатеральное кровообращение, за счет чего при окклюзии сонных артерий не происходит гемодинамически значимых нарушений, которые могут привести к ишемии мозга [13]. Происходит открытие коллатералей основания мозга, позволяющее осуществлять немедленный компенсаторный кровоток из противоположного полушария [6, 13]. При окклюзии двух ОСА показатели скорости кровотока достоверно снижались в 4 раза ($p<0,0001$) — 9 (6; 12) см/с, и уменьшалась дисперсия до 9,3. Это происходит потому, что компенсация кровотока из противоположного полушария невозможна и адаптация реализуется за счет открытия лептотомингиальных анастомозов с вертебрально-базилярным бассейном. При перевязке левой СМА кровоток значимо снижался до 10 (7; 13) см/с ($p<0,0001$). При пережатии левой СМА дисперсия снижалась до 34. Причем примерно в 30–40 % наблюдений в краевых участках височного трепанационного окна был зафиксирован слабый ретроградный кровоток. Данная находка свидетельствует о начале функционирования коллатералей внутри одного сосудистого бассейна — бассейна левой ОСА (также лептотомингиальные анастомозы). Перевязка левых ОСА и СМА уменьшала систолическую скорость кровотока до 6,1 (3; 9) см/с ($p<0,0001$ по сравнению с нормой) с дисперсией 12,7. Наименьшие показатели кровотока в бассейне СМА наблюдались при совместной окклюзии левой СМА и двух ОСА — 3 (2,1; 4) см/с ($p<0,0001$ по сравнению с нормой), а дисперсия была минимальной — 2. Таким образом, хорошая развитость коллатерального кровообращения в головном мозге крысы не позволяет моделировать ишемию за счет окклюзии только одной ОСА. Для значимой редукции кровотока требуется пережатие нескольких артерий (двух ОСА и одной СМА) для блокирования основных путей коллатерального кровообращения и формирования полноценного очага фокальной ишемии в ткани головного мозга в эксперименте.

Зона нарушения перфузии позволяет оценить, насколько пространственно нарушен кровоток в головном мозге крысы после пережатия артерий. Этот показатель является динамическим для мозга, так как «зона ишемии» может меняться в различные периоды после окклюзии, как было показано в нашей статье [собственные неопубликованные данные из РФЖ 2011]. Поскольку изменение этого показателя не является целью нашего исследования, мы изучали зону нарушения перфузии в первые секунды после окклюзии артерий (рис. 3).

Как показано на рис. 4, перевязка левой СМА (группа 1) приводит к формированию зоны нарушения перфузии 4,74 (3,8; 6) % от объема головного мозга крысы. При окклюзии левых СМА и ОСА (группа 2) зона нарушения перфузии составила 7,6

(4,8; 11,4) %, а при перевязке левой СМА и обеих ОСА (группа 3) «зона риска» составила 15,6 (12,8; 17) %. Оклюзия общих сонных артерий блокирует коллатеральный кровоток и делает невозможным уменьшение зоны нарушения перфузии за счет собственных механизмов сосудистой коллатеральной адаптации.

Как показали наши исследования, для моделирования ишемии очень важно изучение кровотока в головном мозге, поскольку успешность воспроизведения ишемии зависит от степени блокирования коллатерального кровотока в головном мозге.

Второй этап исследования — изучение размера инфаркта, неврологического дефицита и отека головного мозга при моделировании фокальной ишемии и сравнение ее с размером зоны нарушения перфузии.

При моделировании ишемии всеми пятью модификациями модели происходит формирование зоны инфаркта. Причем при окрашивании срезы мозга с применением ТТС некротические изменения могут быть выявлены не ранее 24 часов после моделирования ишемии, достигают максимальных размеров к 48 часам и постепенно регрессируют к 72 часам. Эти данные согласуются с литературными [16, 20]. При всех вариантах моделей ишемии инфаркт располагался исключительно в коре головного мозга. Дистантных ишемических изменений не наблюдалось. Иногда, при грубом обращении с ОСА или длительном использовании окклюзий (более 60 минут), в месте наложения клипсы (на ОСА) может формироваться пристеночный тромб, который при снятии клипс может стать причиной эмболии. Поэтому при воспроизведении экспериментатору необходимо быть внимательным, так как это может приводить к возникновению дополнительного повреждения в виде незапланированных инфарктов в противоположном полушарии.

При 40-минутной окклюзии левой СМА (группа 1) инфаркт располагался в 1–2 срезах, его размер оказывался незначительным и составлял 0,25 (0,042; 0,36) % объема мозга, дисперсия тоже была небольшой — 0,046. Недостатком данной модели была высокая вероятность разрыва левой СМА при фиксации ее на нитях. При изолированной перевязке левой СМА (группа 2) размер инфаркта и дисперсия составили 0,33 (0; 0,7) и 0,18 % соответственно, что достоверно не отличалось от группы 1 ($p=0,93$), и это при том, что моделировалась ишемия без реперфузии. Вероятность разрыва СМА при использовании модели в группе 2 была значительно меньше и зависела исключительно от навыка экспериментатора. При небольшом объеме повреждения (как в группах 1 и 2) размер инфаркта зависел от того, как проходит срез, а в редких случаях небольшой участок инфаркта вообще не попадал в срез. Это вносит определенную долю ошибки при подсчете объема инфаркта, а значит, делает результат необъективным. При сочетанной перевязке левых СМА и ОСА (группа 3) происходит блокирование коллатералей в бассейне ОСА и размер инфаркта становится значительно больше, чем в группе 2, где изолированно перевязывается

только одна СМА ($p<0,0001$), — 5,98 (2,1; 8) % объема мозга. Участок инфаркта в группе 3 занимает 2–3 среза, при этом отмечается значительный разброс данных (дисперсия — 11,52). Сочетанная перевязка левой СМА и двух ОСА (группа 4) без реперфузии позволяла вызвать самый большой инфаркт объемом 14,56 (11,4; 17,9) % ($p=0,019$ по сравнению с группой 3 и $p<0,0001$ по сравнению с группой 2), который распространялся на все срезы, однако разброс данных был также большим (дисперсия — 57,9). Двусторонняя перевязка сонных артерий приводит к ишемии не только передних отделов головного мозга, но и мягких тканей головы. За счет этого в значительной степени возрастает риск местных инфекционных осложнений. Основным недостатком моделей ишемии без реперфузии (перманентной ишемии), вызванной окклюзией левой СМА и одной или двух ОСА (группы 3 и 4), является большой разброс данных размера инфаркта в выборке. При исследовании нейропротективных свойств препаратов данный недостаток может быть компенсирован за счет большой выборки. При использовании модели, предложенной Н. Zhao [22], — перевязки левой СМА и транзиторной окклюзии ОСА на 40 минут (группа 5), происходило формирование инфаркта, сопоставимого по размеру и характеристикам с группой 4 ($p=0,2$), где кровоток по ОСА не восстанавливается, — 11,28 (10; 14,24) %. Особенностью этой модификации является высокая однородность результатов (дисперсия — 4,73). Данный результат связан с тем, что на открытие лептоменингеальных коллатералей (для связи с вертебрально-базиллярным бассейном), как было показано в наших и зарубежных публикациях [6], необходимо более 40 минут. Модель, представленная в группе 5, удачно сочетает в себе эмпирическим путем подобранный интервал времени (40 минут), необходимый для компенсации кровотока, который блокируется при окклюзии ОСА, что используется для транзиторной ишемии — ишемии с реперфузией.

В условиях отсутствия ишемического повреждения головного мозга полушария имеют одинаковый размер и коэффициент асимметрии равен 1. При увеличении очага размеров ишемического повреждения увеличивается размер пораженного за счет увеличения отека и коэффициент становится больше 1. На рис. 6 показаны результаты оценки степени отека головного мозга. При перевязке левой СМА (группа 2) и 40-минутной окклюзии левой СМА (группа 1) значимой асимметрии полушарий не выявлено — 1,0 (0,96; 1,0) и 1,0 (0,86; 1,0) соответственно, что свидетельствует об отсутствии значимого отека головного мозга при маленьком размере очага. При совместной окклюзии левой СМА и ОСА (группа 3) коэффициент асимметрии возрастает с увеличением размера инфаркта по сравнению с изолированной окклюзией левой СМА ($p=0,002$) и составляет 1,08 (1,05; 1,11). Перевязка обеих ОСА и левой СМА (группа 4), а также 40-минутная окклюзия обеих ОСА и перевязка левой СМА (группа 5) приводят к значимому увеличению отека мозга по сравнению с группой 2, где изолированно перевязывалась левая СМА

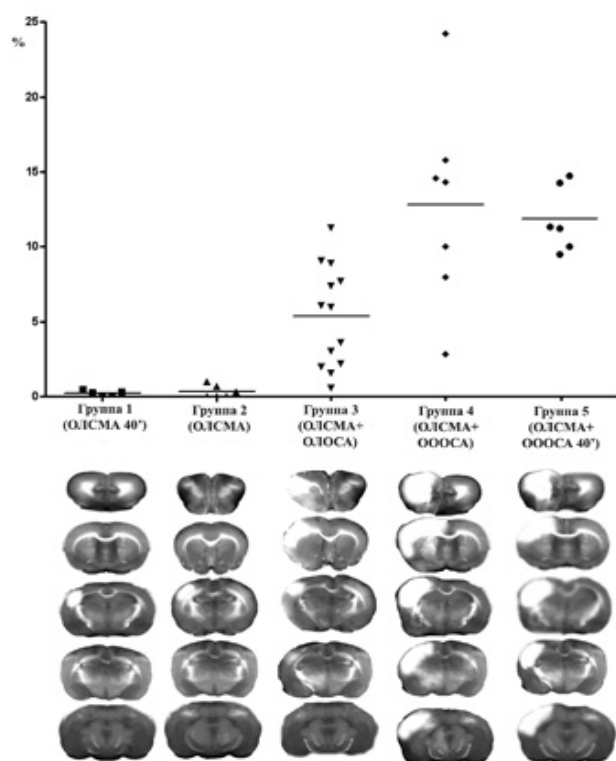


Рис. 5. Размер инфаркта во всех группах второго этапа через 48 часов после моделирования ишемии. ОЛСМА 40' — окклюзия (перезакрытие) на 40 минут левой СМА; ОЛСМА — окклюзия (перевязка) левой СМА; ОЛСМА+ОЛОСА — окклюзия (перевязка) левой СМА и левой ОСА; ОЛСМА+ОООСА — окклюзия (перевязка) левой СМА и обеих ОСА; ОЛСМА+ОООСА 40' — окклюзия (перевязка) левой СМА и перезакрытие обеих ОСА на 40 минут

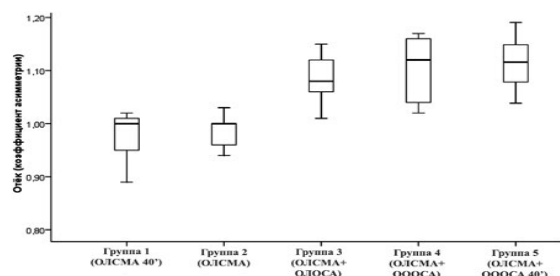


Рис. 6. Оценка асимметрии — степени отека полушарий головного мозга во всех группах второго этапа через 48 часов после моделирования ишемии. ОЛСМА 40' — окклюзия (перезакрытие) на 40 минут левой СМА; ОЛСМА — окклюзия (перевязка) левой СМА; ОЛСМА+ОЛОСА — окклюзия (перевязка) левой СМА и левой ОСА; ОЛСМА+ОООСА — окклюзия (перевязка) левой СМА и обеих ОСА; ОЛСМА+ОООСА 40' — перевязка левой СМА и перезакрытие обеих ОСА на 40 минут

($p=0,004$ и $0,002$, соответственно) и коэффициент асимметрии составлял $1,12$ ($1,03$; $1,16$) и $1,11$ ($1,07$; $1,15$) соответственно. Статистически значимой разницы между группами 3, 4 и 5 не было выявлено, но в группе перевязки левой СМА и ОСА (группа 3) разброс данных был значительно больше, чем в группах 4 и 5, где временно или постоянно перевязывались обе ОСА и левая СМА (дисперсия — $0,079$, $0,005$

и $0,003$ соответственно). Таким образом, наиболее продуктивным для оценки степени отека головного мозга является использование моделей перевязки левой СМА и постоянной или 40-минутной окклюзии обеих ОСА (группы 4 и 5), так как именно эти модели позволяют получить наибольший отек и наименьший разброс данных.

Неврологический дефицит в нашем исследовании является наиболее интересным показателем. Внимание современных исследователей привлечено к оценке несоответствия между нейропротективным эффектом препаратов, проявляющимся в уменьшении размеров морфологически выявленного дефекта, и регрессом неврологического дефицита. Оказывается, существуют нейропротективные вмешательства, способные повлиять на неврологический дефицит без уменьшения морфологического дефекта, и наоборот. Возможно, за этим несоответствием кроется понимание трудностей в проведении клинических исследований нейропротекторов при ишемическом инсульте. Как известно, ни один из современных препаратов не доказал своей эффективности в третьей фазе исследований, несмотря на то, что демонстрировал выраженный защитный эффект при экспериментальной ишемии на доклинической фазе изучения [8, 9].

Шкала Гарсия (таблица 1) [11] включает в себя оценку как чувствительных, так и двигательных нарушений, поэтому наличие у экспериментального животного послеоперационной раны, как в группе ложнооперированных, может повлиять итоговое количество баллов. Данные о неврологическом статусе через 48 часов после моделирования ишемии представлены на рис. 7. В группе ложнооперированных животных неврологический дефицит составил 17 ($16,3$; 18), дисперсия — 1. Неврологический статус при 40-минутной окклюзии левой СМА (группа 1), при перевязке левой СМА (группа 2), при тандемной перевязке левой СМА и ОСА (группа 3) значимо не отличался от группы ложнооперированных животных — 17 (16 ; 18), 17 ($16,4$; $17,9$) и 16 ($15,7$; $17,5$) баллов соответственно ($p=0,94$, $p=0,95$ и $p=0,41$ соответственно). Наибольший неврологический дефицит наблюдался в группе перевязки обеих ОСА и левой СМА (группа 4) — 11 ($8,5$; $13,6$) баллов, что достоверно отличалось от группы ложнооперированных ($p=0,002$). В группе 5, где моделировалась 40-минутная окклюзия обеих ОСА и перевязка левой СМА, неврологический дефицит был значимо больше — 14 ($12,5$; $14,4$) баллов, чем в группе ложнооперированных ($p=0,001$). В группе 5 данные были более однородными, чем в группе 4 (дисперсия $1,9$ и $7,6$ соответственно), хотя незначимо неврологический дефицит был больше в группе 4 ($p=0,139$).

Как показано на рис. 8 перевязка левой СМА (группа 1) приводит к формированию зоны нарушения перфузии, которая значительно больше ($p=0,004$), чем зона некроза, — $4,74$ ($3,8$; 6) и $0,15$ (0 ; $0,7$) % соответственно. Данный результат объясняется открытием коллатералей, которые восстанавливают кровоток в нарушенной зоне мозга и сводят ишемическое повреждение до минимума.

А при окклюзии левых СМА и ОСА (группа 2) зона нарушения перфузии значимо ($p=0,165$) не отличается от зоны некроза — 7,6 (4,8; 11,4) и 5,98 (2,1; 8) % соответственно. Аналогичная закономерность прослеживается и при перевязке левой СМА и обеих ОСА (группа 3): значимой разницы ($p=0,372$) между «зоной риска» и зоной некроза не выявлено — 15,6 (12,8; 17) и 14,56 (11,4; 17,9) % соответственно. Окклюзия ОСА блокирует коллатеральный кровоток и делает невозможным уменьшение зоны нарушения перфузии за счет собственных механизмов сосудистой коллатеральной адаптации.

Зона нарушения перфузии может быть дополнительным параметром в оценке степени повреждения головного мозга при ишемии. Она позволяет выявить, насколько влияет исследуемый препарат на открытие коллатерального кровообращения в головном мозге. В данном исследовании показано, что при ишемии головного мозга, моделируемой за счет перевязки ОСА и левой СМА, происходит формирование циркуляторных нарушений, которые сопоставимы с размером морфологического повреждения. При применении данной модификации формируется устойчивая зона повреждения, где не происходит уменьшения зоны перфузионных нарушений.

Таким образом, модель 40-минутной окклюзии двух ОСА и перевязка левой СМА (группа 5) соответствует всем критериям для модели фокальной ишемии головного мозга, представленным в начале статьи. Она позволяет моделировать значимое снижение кровотока в бассейне левой СМА, получить большой очаг некроза, выраженный неврологический дефицит и отек головного мозга. Причем данные, получаемые по всем показателям, являются однородными, а значит, для успешного эксперимента можно использовать группы с небольшим количеством экспериментальных животных (6–10).

Согласно данным наших исследований, можно заключить, что нецелесообразно использовать модель фокальной ишемии посредством постоянной или временной окклюзии СМА, так как данные модификации приводят к формированию нестойкого, неоднородного очага некроза, не вызывают неврологического дефицита и отека мозга, а кровоток зависит от индивидуальных возможностей коллатералей конкретного экспериментального животного. Использование данных моделей может приводить к методическим ошибкам при исследовании нейропротективных свойств препаратов. Модели перевязки левой ОСА и левой СМА приводят к формированию относительно однородного очага некроза и отека головного мозга, но не вызывают значимого неврологического дефицита. Коллатеральное кровообращение в данной модели блокируется не полностью, что вносит определенную неоднородность в данные. Данная модель может быть использована для исследований, но для получения достоверных результатов потребуются большая выборка, а отсутствие данных по неврологическому дефициту сократит возможности для исследования нейропротективных свойств препаратов. Перевязка обеих ОСА и левой СМА приводит к формированию большого и однородного

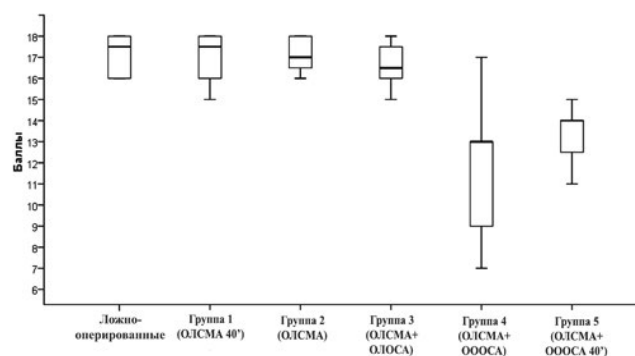


Рис. 7. Оценка неврологического дефицита по шкале Гарсия во всех группах второго этапа через 48 часов после моделирования ишемии. Ложнооперированные — группа животных, где производили трепанацию, выделение ОСА и левой СМА; ОЛСМА 40' — окклюзия (перевязка) на 40 минут левой СМА; ОЛСМА — окклюзия (перевязка) левой СМА; ОЛСМА+ОЛОСА — окклюзия (перевязка) левой СМА и левой ОСА; ОЛСМА+ОООСА — окклюзия (перевязка) левой СМА и обеих ОСА; ОЛСМА+ОООСА 40' — перевязка левой СМА и перевязка обеих ОСА на 40 минут

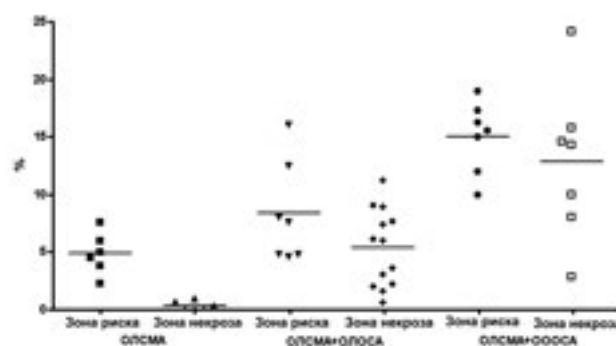


Рис. 8. Оценка размера зоны нарушения перфузии («зона риска») во всех группах третьего этапа и сравнение размеров некроза через 48 часов после моделирования ишемии: ОЛСМА — перевязка левой СМА; ОЛСМА+ОЛОСА — перевязка левой СМА и левой ОСА; ОЛСМА+ОООСА — перевязка левой СМА и обеих ОСА

очага некроза и отека головного мозга, значимого неврологического дефицита и выраженных нарушений кровообращения, которые не меняются на протяжении исследования. Недостатком данной модели является высокий риск инфекционных осложнений и относительно высокая вариабельность исследуемых параметров. Следует отдельно отметить, что представленная модель является моделью ишемии без реперфузии, т. е. перманентной фокальной ишемии головного мозга. Модель перевязки левой СМА и 40-минутной окклюзии обеих ОСА продемонстрировала наилучшие показатели (однородность, воспроизводимость, безопасность) по всем исследованным параметрам: линейная скорость кровотока, размер инфаркта, отек головного мозга и неврологический дефицит, что выделяет ее в ряду других исследуемых модификаций фокальной ишемии. Инфекционных осложнений при использовании предложенной моде-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ли не зафиксировано. Данная модель воспроизводит ишемию с реперфузией, т. е. неполную транзиторную фокальную ишемию головного мозга. Единственным недостатком этой модели является необходимость обширного оперативного вмешательства с использованием двух операционных доступов. Таким образом, данная модель соответствует всем вышеуказанным критериям экспериментальной модели ишемии и может быть рекомендована для широкого использования.

Выводы:

1. Для оценки ишемического повреждения головного мозга крысы целесообразно использовать оценку размера инфаркта и отека мозга с применением ТТС, оценку неврологического дефицита по шкале Гарсия, кровотока с применением высокочастотной ультразвуковой доплерографии и оценку зоны на-

рушения перфузии с применением окраски синим Эванса.

2. Из всех пяти предложенных моделей фокальной ишемии головного мозга только модель 40-минутной окклюзии ОСА и перевязки левой СМА позволяет получить необходимые для экспериментальной оценки и однородные показатели фокального ишемического повреждения головного мозга.

Автор выражает благодарность главному врачу ветеринарной клиники «Зеленый Дом» Мальцевой Марии Николаевне за помощь при проведении исследования.

Работа выполнена на средства субсидии молодым ученым, молодым кандидатам наук вузов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, в 2010 г.

Литература

1. Блохин, И. О. Зависимость инфаркт-лимитирующего эффекта ишемического preconditionирования миокарда от продолжительности тестовой ишемии миокарда / И. О. Блохин [и др.] // *Росс. физиол. журн. им. Сеченова*. — 2008. — № 94 (7). — С. 785–789.
2. Полякова, Е. А. Метод моделирования обратимой окклюзии средней мозговой артерии / Е. А. Полякова, Н. В. Дранишников, Т. Д. Власов // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*, 2004. — № 3. — С. 61–63.
3. Данные сайта НАБИ: <http://www.nabi.ru>
4. Benedek, A. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats / A. Benedek [et al] // *Brain Res.* — 2006. — № 1116 (1). — P. 159–165.
5. Brint, S. 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 [et al] // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* — 1988. — № 8 (4). — P. 474–485.
6. Brozici, M. Anatomy and functionality of leptomeningeal anastomoses: a review / M. Brozici [et al] // *Stroke*. — 2003. — № 34. — P. 2750–2762.
7. Chen, S. T. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction / S. T. Chen [et al] // *Stroke*. — 1986. — № 17 (4). — P. 738–743.
8. Durukan, A. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia / A. Durukan, T. Tatlisumak // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 2007. — № 87 (1). — P. 179–197.
9. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008 // *Cerebrovasc. Dis.* — 2008. — № 25 (5). — P. 457–507.
10. Fox, G. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat / G. Fox [et al] // *Stroke*. — 1993. — № 24 (12). — P. 2087–2092.
11. Garcia, J. H. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion: statistical validation / J. H. Garcia [et al] // *Stroke*. — 1995. — № 26. — P. 627–635.
12. Graham, S. M. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care / S. M. Graham, L. D. McCullough, S. J. Murphy // *Comp. Med.* — 2004. — № 54 (5). — P. 486–496.
13. Herz, R. C. Collateral hemodynamics after middle cerebral artery occlusion in Wistar and Fischer-344 rats / R. C. Herz // *Brain Res.* — 1998. — № 793 (1–2). — P. 289–296.
14. Joshi, C. N. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts / C. N. Joshi [et al] // *Brain Res. Protoc.* — 2004. — № 13 (1). — P. 11–17.
15. 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 area / J. Koizumi [et al] // *Jpn. J. Stroke*. — 1986. — № 8. — P. 1–8.
16. Liszczak, T. M. Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain / T. M. Liszczak [et al] // *Acta Neuropathol.* — 1984. — № 65 (2). — P. 150–157.
17. Rubino, G. J. Ischemic cortical lesions after permanent occlusion of individual middle cerebral artery branches in rats / G. J. Rubino, W. Young // *Stroke*. — 1988. — № 19 (7). — P. 870–877.
18. Sundt, T. M. Experimental cerebral infarction: Retro-orbital extradural approach for occluding the middle cerebral artery / T. M. Sundt, Jr. and A. G. Waltz // *Mayo. Clin. Proc.* — 1966. — № 41. — P. 159–168.
19. Traystman, R. J. Animal models of focal and global cerebral ischemia / R. J. Traystman // *ILAR J.* — 2003. — № 44 (2). — P. 85–95.
20. Wang-Fischer, Y. *Manual of Stroke Models in Rats* / Y. Wang-Fischer. — N.-Y.: Taylor & Francis Group, 2009. — P. 360.
21. Zhao, H. Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke / H. Zhao // *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* — 2009. — № 29 (5). — P. 873–885.
22. Zhao, L. CBF changes associated with focal ischemic preconditioning in the spontaneously hypertensive rat / L. Zhao, T. S. Nowak // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2006. — № 26 (9). — P. 1128–1140.