

Экспериментальные исследования

ЩЕРБАК Н. С.^{1,2}, ПОПОВЕЦКИЙ М. А.²,
ГАЛАГУДЗА М. М.^{1,2}, БАРАНЦЕВИЧ Е. Р.^{1,2},
ШЛЯХТО Е. В.^{1,2}

Нейропротективный эффект ишемического посткондиционирования при фокальной ишемии головного мозга у крыс

¹ Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова

² Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Реферат

Одним из новых методов нейропротекции является феномен ишемического посткондиционирования (ИПост) головного мозга (ГМ), возникающий при создании нескольких коротких эпизодов реперфузии/ишемии в раннем реперфузионном периоде. Данные о наличии и выраженности инфарктлимитирующего эффекта ИПост при фокальной ишемии ГМ в настоящее время немногочисленны и противоречивы. В настоящей работе на модели фокальной ишемии-реперфузии ГМ у крыс изучен инфарктлимитирующий эффект ИПост, а также проведен анализ взаимосвязи между анатомическим вариантом корковой ветви средней мозговой артерии (СМА) и размером формирующегося инфаркта. Показано, что протокол ИПост, состоящий из 5 эпизодов реперфузии/ишемии (10 с/10 с), обладает достоверным инфарктлимитирующим эффектом. Для обеспечения лучшей стандартизации результатов экспериментальных исследований в области нейропротекции следует использовать животных, имеющих магистральный вариант анатомического строения СМА.

Ключевые слова: нейропротекция, ишемическое посткондиционирование, фокальная ишемия головного мозга, крысы.

Shcherbak N. S.^{1,2}, Popovetskiy M. A.², Galagudza M. M.^{1,2},
Barantsevitch E. R.^{1,2}, Shlyakhto E. V.^{1,2}

Neuroprotective effect of ischemic postconditioning in the rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion

¹ V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St-Petersburg

² I. P. Pavlov Federal Medical University, St-Petersburg
e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Abstract

Cerebral ischemic postconditioning (IPost) is recently discovered endogenous neuroprotective phenomenon occurring after several brief bouts of reperfusion/ischemia instituted just after prolonged cerebral ischemia. The data on the presence and the extent of infarct size limitation due to IPost in focal cerebral ischemia-reperfusion are scarce and controversial. In this study, we investigated the infarct-limiting effect of IPost in the rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. Besides, the relationship between the anatomical pattern of middle cerebral artery (MCA) and infarct size was studied. It is shown that the protocol of IPost consisting of 5 episodes of 10 s ischemia and 10 s reperfusion, is protective in terms of infarct size limitation. For neuroprotection studies, we recommend the use the animals with single-trunk morphology of MCA for reduction of variability between the individual experiments.

Keywords: neuroprotection, ischemic postconditioning, focal cerebral ischemia, rats.

Введение

Ишемическое посткондиционирование (ИПост) представляет собой универсальный адаптивный феномен, проявляющийся значительным уменьшением проявлений ишемического-реперфузионного повреждения тканей и возникающий вследствие создания нескольких коротких эпизодов реперфузии-ишемии в раннем реперфузионном периоде после продолжительной ишемии [4]. Феномен ИПост был впервые описан в 2003 г. в экспериментах с моделированием регионарной ишемии миокарда у собак [11]. При этом было показано, что прерывание раннего реперфузионного периода после 60-минутной ишемии миокарда тремя эпизодами ишемии по 30 секунд приводило к достоверному уменьшению размера инфаркта, ослаблению постишемической дисфункции эндотелия и ограничению проявлений воспаления. Позднее защитный эффект ИПост было подтвержден во многих экспериментальных исследованиях на моделях ишемии-реперфузии миокарда [5] и головного мозга [10].

С клинической точки зрения, ИПост имеет несомненное преимущество перед хорошо известным феноменом прекондиционирования, поскольку выполнение ишемических стимулов в фазе реперфузии после состоявшейся ишемии является контролируемым и управляемым.

Защитный потенциал ИПост может быть применен для уменьшения последствий ишемического-реперфузионного повреждения головного мозга (ГМ) при хирургических вмешательствах на сосудах головы и шеи с риском развития дополнительной ишемии ГМ, операциях каротидной эндартерэктомии, стентировании сонных артерий при их атеросклеротическом стенозе, а также при операциях на сердце с применением искусственного кровообращения [9]. Внедрение методики ИПост в клиническую практику требует тщательного изучения данного феномена в условиях эксперимента с выявлением наиболее эффективных протоколов ИПост. Кроме того, экспериментальные исследования ИПост позволяют обнаружить внутренние и внешние факторы, влияющие на выраженность нейропротективного эффекта ИПост, а именно: пол, возраст, наличие сопутствующей патологии, генетические факторы, анатомические особенности строения сосудистого русла ГМ, продолжительность предшествующей ишемии и др. В то же время следует признать, что изучению нейропротективной эффективности ИПост при фокальной ишемии ГМ в эксперименте посвящены единичные исследования [8, 10]. Результаты этих работ зачастую противоречивы, что связано с использованием различных протоколов ИПост и различных моделей ишемии ГМ. Отсутствие стандартизированных протоколов применения ИПост в клинике делает риск получения негативных данных достаточно высоким, что дополнительно препятствует эффективному внедрению данного метода в нейрохирургическую практику. Очевидно, что для дальнейшего успешного применения ИПост в клинической практике требуется убедительно доказать наличие инфарктулирующего эффекта ИПост и

дополнительно стандартизировать условия реализации нейропротективного эффекта ИПост.

Цель исследования

Определение частоты встречаемости различных анатомических вариантов строения корковой ветви средней мозговой артерии (СМА) у крыс линии «Вистар» и оценка инфарктулирующего эффекта ИПост при фокальной ишемии-реперфузии ГМ у животных с магистральным типом строения корковой ветви СМА.

Материал и методы исследования

Все эксперименты были проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья, США, № 85-23) и были одобрены локальным этическим комитетом. Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии «Вистар» (питомник «Рапполово», Ленинградская область) массой 250 г, наркотизированных хлоралгидратом в дозе 450 мг/кг. После трепанации черепа определяли строение дистального сегмента СМА с выделением трех анатомических вариантов — магистрального, рассыпного и смешанного [6]. Фокальную ишемию ГМ воспроизводили путем необратимой коагуляции корковой ветви левой СМА и расположенной рядом вены при помощи электрокоагулятора («Фотек Е-80», Россия) и односторонней окклюзии левой общей сонной артерий (ЛОСА) в течение 30 минут с последующей реперфузией [1, 3]. Животные с магистральным типом строения корковой ветви СМА были случайным образом разделены на 3 группы: 1) ложноперированные животные (n=8); 2) контроль (n=10) — животным выполнялась перманентная окклюзия СМА и 30-минутная окклюзия ЛОСА без ИПост; 3) ИПост (n=8) — протокол соответствовал группе контроля, но непосредственно после 30-минутной окклюзии ЛОСА выполнялось 5 эпизодов реперфузии/реокклюзии ЛОСА (10 с/10 с). Все хирургические вмешательства проводились на термостатируемом операционном столе при температуре 37°C. Через 48 часов после хирургических манипуляций оценивали летальность. Выживших животных декапитировали и проводили оценки размера инфаркта гистохимическим способом. Фронтальные срезы ГМ инкубировали при температуре 37 °C в течение 15 минут в 2 %-м растворе трифенилтетразолия хлорида (ТТХ, Sigma, США) с последующей фиксацией в 10%-м забуференном формалине [3]. Затем получали цифровые фотографии срезов. Размер инфаркта рассчитывался планиметрически по площади ТТХ-негативных зон при помощи программы ImageJ. Оценивали процентное отношение суммы площадей ТТХ-негативных зон к сумме общей площади коры левого полушария мозга [1]. Результаты представлены в виде «среднее±стандартное отклонение». Значимость различий оценивали при помощи точного критерия Фишера и U-критерия Манна-Уитни с использованием программы Statistica 6.0. Различия считались достоверными при P<0,05.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования и их обсуждение

Из 60 животных, использованных в экспериментах, магистральный тип строения дистального сегмента СМА наблюдался у 26 (43,3 %) животных, рассыпной — у 20 (33,3 %), смешанный — у 14 (23,3 %). К 48 ч после операции в группе ложнооперированных животных летальных исходов не наблюдалось, в контроле летальность составила 10,0 %, а в группе ИПост — 12,5 % ($P > 0,05$). В контроле через 48 ч после операции размер инфаркта составил $18,9 \pm 1,44$ % от общего объема коры левого полушария. Применение 5 эпизодов ИПост после 30-минутной окклюзии ЛОСА значительно ($P < 0,05$) уменьшило размер инфаркта ГМ (до $8,4 \pm 2,64$ % от общего объема коры левого полушария). Также нами был проведен сравнительный анализ размера инфаркта при различных типах строения дистального сегмента СМА. Так, при магистральном типе он составил $18,9 \pm 1,44$ % от общего объема коры левого полушария, при рассыпном — $9,8 \pm 6,89$ % (Max 16,4 – Min 5,4), при смешанном — $12,3 \pm 2,39$ %. При этом рассыпной тип строения дистального сегмента СМА характеризовался достоверно меньшим размером инфаркта ($p < 0,05$), чем магистральный. Кроме того, при рассыпном типе строения корковой ветви СМА отмечалась наибольшая вариабельность размера инфаркта.

В настоящей работе доказано наличие инфаркт-лимитирующего эффекта ИПост при создании 5 эпизодов 10 с реперфузии/10 с ишемии ЛОСА после ее 30-минутной окклюзии. Эти данные согласуются с результатами исследования, проведенного ранее на крысах линии Sprague-Dawley с использованием другого протокола ИПост [10]. Так, после постоянной окклюзии СМА и билатеральной окклюзии ОСА на 15, 30 и 60 минут последующее применение 3 эпизодов 10-секундной реперфузии и 30-секундной окклюзии ОСА приводило к уменьшению площади повреждения на 80, 51 и 17 % соответственно [10]. Таким образом, в нашем исследовании и в указанной работе фокальная ишемия моделировалась путем постоянной окклюзии корковой ветви СМА, кровоснабжающей преимущественно кору ГМ, а посткондиционирующие эпизоды производились при помощи окклюзии общих сонных артерий. Следовательно, нейропротективное действие ИПост реализовалось фактически в зоне пенумбры, поскольку коротким ишемическим стимулам подвергалась часть ГМ, кровоснабжающаяся из общих сонных артерий.

Выбор экспериментальной модели играет ключевую роль в исследовании механизмов нейропротекции. Так, в недавних экспериментальных исследованиях при применении эндоваскулярной окклюзии СМА у крыс были получены противоречивые результаты. В исследовании [8] не было обнаружено протективных эффектов ИПост при фокальной ишемии ГМ у крыс. Необходимо отметить, что фокальная ишемия, применяемая в исследовании [8], моделировалась при помощи эндоваскулярной окклюзии СМА на 60 минут, а посткондиционирующие стимулы были представлены 3 эпизодами по 30 с реперфузии/10 с ишемии, причем анализ исходов проводился через 24 ч после операции [8]. Однако в другом исследовании при использовании той же экспериментальной модели и линии крыс применение ИПост в виде 6 эпизодов 30 с реперфузии/30 с ишемии, следующих за 60-минутной окклюзией СМА, к 24 и 72 часам анализа демонстрировало выраженный нейропротективный эффект [7]. Ограничение размера инфаркта и уменьшение неврологического дефицита у крыс линии «Вистар» было отмечено при использовании 10 эпизодов ИПост, состоявших из 10 с реперфузии и 10 с ишемии, непосредственно после 40-минутной двухсторонней окклюзии ОСА и перманентной окклюзии СМА [2].

В настоящем исследовании впервые показано, что размер формирующегося инфаркта ГМ существенно зависит от анатомического варианта корковой ветви СМА. В частности, размер инфаркта при рассыпном варианте строения СМА был достоверно ниже, чем при магистральном и смешанном вариантах. Этот факт необходимо учитывать при проведении исследований нейропротективных воздействий на данной модели, поскольку преобладание в экспериментальной группе животных с рассыпным типом строения СМА может привести к получению ложноположительного результата. Эти данные позволяют рекомендовать исключать из исследования животных, имеющих рассыпной тип строения дистального сегмента СМА. Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии достоверного инфаркт-лимитирующего эффекта ИПост при фокальной ишемии ГМ у крыс линии «Вистар». При исследовании нейропротективных воздействий на указанной модели необходимо принимать во внимание анатомический вариант строения дистального сегмента средней мозговой артерии.

Литература

1. Самойленкова, Н. С. Роль АТФ-зависимых калиевых каналов в процессе гипоксического и ишемического preconditionирования у крыс с фокальной ишемией мозга / Н. С. Самойленкова [и др.] // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2008. — Т. 6. — № 4. — С. 68–77.
2. Шмонин, А. А. Эндогенная нейропротекция при ишемии мозга: эритропоэтин, пре- и посткондиционирование / А. А. Шмонин [и др.] // Анналы клин. и эксперимент. неврол. — 2010. — Т. 4. — № 3. — С. 29–35.
3. 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.
4. Galagudza, M. M. Reduction of myocardial ischemia-reperfusion injury with pre- and postconditioning: molecular mechanisms and therapeutic targets / M. M. Galagudza [et al] // Cardiovascular and Hematological Disorders: Drug Targets. — 2008. — № 8 (1). — P. 47–65.
5. Galagudza, M. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm / M. Galagudza [et al] // Eur. J. Cardiothorac. Surg. — 2004. — № 25 (6). — P. 1006–1010.
6. Herz, R. C. Middle cerebral artery occlusion in Wistar and Fischer-344 rats: functional and morphological assessment of the model / R. C. Herz [et al] // J. Cereb. Blood Flow. Metab. — 1996. — № 16 (2). — P. 296–302.
7. Xing, B. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat / B. Xing [et al] // Stroke. — 2008. — № 39 (8). — P. 2362–2369.
8. Yoo Kyung Kim. Ischemic postconditioning may not influence early brain injury induced by focal cerebral ischemia/reperfusion in rats / Yoo Kyung Kim [et al] // Korean J. Anesthesiol. — 2010. — № 58 (2). — P. 176–183.
9. 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.
10. Zhao, H. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats / H. Zhao [et al] // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. — 2006. — № 26 (9). — P. 1114–1121.
11. Zhao, Z. Q. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning / Z. Q. Zhao [et al] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2003. — № 285 (2). — P. H579–H588.