



УКРАЇНА

(19) UA (11) 6208 (13) U

(51) 7 G09B23/28

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ПРОЦЕС МОДЕЛЮВАННЯ ГОСТРОГО ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ТЯЖКОСТІ

1

2

(21) 20041108983

(22) 03 11 2004

(24) 15 04 2005

(46) 15 04 2005, Бюл. № 4, 2005 р.

(72) Ярош Олександр Кузьмович, Кириченко
Сергій Васильович, Халімончик Сергій Петрович,
Данилов Микола Миколайович, Кузьменко Костян-
тин Олександрович(73) Інститут фармакології та токсикології АМН
України(57) Процес моделювання гострого геморагічного
інсульту різного ступеня тяжкості, що включає сте-
реотаксичне введення ін'єкційної голки в мозок та
інфузію через неї аутокрові, який відрізняється
тим, що для відтворення різного ступеня тяжкості
інсульту у тварин у головний мозок вводять різні
об'єми аутокрові, мкл/100 г маси тіла тварини

для досягнення помірного

ступеня

середнього ступеня

тяжкого ступеня

10

20

30

Корисна модель належить до експеримен-
тальної медицини і може бути використана для
вивчення порушень вищої нервової діяльності
(ВНД), патоморфології уражених ділянок мозку, а
також для дослідження фармакодинаміки і фарма-
кокінетики новостворюваних засобів терапії гемо-
рагічного інсульту. Процес дозволяє відтворювати
різні за тяжкістю (помірна, середня та тяжка) фор-
ми інтрацеребральної геморагії.

Відомі існуючі процеси моделювання гемо-
рагічного інсульту на різних дрібних лабораторних
тваринах шляхом внутрішньомозкового введення
певних ферментів (колагенази) [1] або аутокрові
[2, 3].

Найбільш близькими до даного процесу є мо-
делювання інтрацеребральної геморагії шляхом
уведення у внутрішню капсулу головного мозку
0,3-0,4мл аутокрові тварини протягом 3-4хв [2] та
механічної деструкції тканини мозку спеціальним
мандреном-ножем з наступною інфузією (через 2-
3хв) 0,1-0,14мл аутокрові в пошкоджену зону [3].

Але вказані процеси мають такі недоліки

1 Для обох процесів моделювання гемо-
рагічного інсульту загальним недоліком є
відсутність урахування тяжкості ураження та його
стабільного градування з наступним
відтворенням у різних лабораторіях

2 Моделювання геморагічного інсульту у
щурів з використанням процесу введення у
внутрішню капсулу 0,3-0,4мл аутокрові [2] призво-
дить до високого рівня летальності (75-80%) впро-
довж першої-другої доби, що позбавляє можли-

вості вивчення динаміки порушення фізіологічних
функцій протягом тривалого часу в хронічних ек-
спериментах

3 Відтворений за іншим процесом гемо-
рагічний інсульт, для моделювання якого у тварин
попередньо травмуються ділянки мозку з наступ-
ним (через 2-3хв) введенням аутокрові в кількості
0,05-0,08мл протягом 3-4хв [3] має протилежні
недоліки. Піддослідні щури, в яких був відтворений
геморагічний інсульт за допомогою даного проце-
су, в постінсультний період мали незначні невро-
логічні розлади. Дані ознаки не можна вважати
адекватними симптомам перебігу геморагічного
інсульту.

Задачею корисної моделі є відтворення типо-
вої клінічної картини інтрацеребральної геморагії
помірного, середнього та тяжкого ступеня перебігу
патологічного процесу у білих лабораторних
щурів.

Поставлена задача вирішується шляхом сте-
реотаксичного введення в необхідну структуру
мозку ін'єкційної голки, через яку інфузують пев-
ний об'єм гепаринізованої аутокрові (зі швидкістю
5-10мкл/хв) - 10, 20 та 30мкл/100г відповідно.

Дослідження були проведені на 50 стате-
возрілих білих щурах-самцях лінії Вістар масою
270,0±30,0г. Усі експериментальні процедури та
оперативні втручання здійснювали відповідно до
"Положення про використання тварин у
біомедичних дослідках".

Піддослідних тварин було розділено на 5 груп.
Експерименти проводили після наркотизації щурів.

(13) U

(11) 6208

(19) UA

тіопенталом натрію (40мг/кг внутрішньоочеревинно) в стані загальної анестезії. Тварин фіксували в стереотаксичному апараті. Після підготовки операційного поля в ділянці склепіння черепа по сагітальній лінії робили розріз шкіри довжиною 1,0-1,5см, видаляли окістя. Відповідно до стереотаксичних координат проекції внутрішньої капсули (capsula interna dextra - CI) (H=6,5мм, L=3,0мм, A=-1,5 від брегми) в черепі висвердлювали отвір діаметром 0,7-0,9мм, крізь який ін'єкційну голку занурювали на потрібну глибину.

У щурів групи I (n=9) геморагічний інсульт відтворювали шляхом введення у внутрішню капсулу головного мозку 0,3-0,4мл аутокрові протягом 3-4хв. [2].

Тваринам групи II (n=10) проводили механічну деструкцію тканини мозку за допомогою спеціального металевго мандрена-ножа, після чого через 2-3хв. у пошкоджену зону інфузували 0,1-0,14мл крові [2].

У піддослідних щурів III (n=11), IV (n=11) та V (n=9) груп відтворювали модель захворювання з помірним, середнім та тяжким перебігом відповідно, для чого в ділянку CI через ін'єкційну голку за допомогою мікроінфузійного насоса вводили зі швидкістю 5-10мкл/хв. гепаринізовану аутокров. Тваринам групи III вводили в ділянку внутрішньої капсули 10мкл аутокрові на 100г маси тіла, групи IV - 20мкл/100г маси, а групи V - 30мкл/100г маси тіла. Голку повільно виймали через 5-7хв. після закінчення інфузії. Після цього краї рани зшивали вузловим швом та обробляли 5% розчином йоду.

Порівняльний аналіз рішення, що заявляється, з прототипами показує, що вперше стандартизований за тяжкістю перебігу (помірний, середній та тяжкий) геморагічний інсульт моделюється шляхом інтрацеребрального введення через ін'єкційну голку у внутрішню капсулу гепаринізованої аутокрові з розрахунку 10мкл/100 для помірного, 20мкл/100г - для середнього та 30мкл/100г маси тіла - для тяжкого перебігу постінсультного періоду зі швидкістю 5-10мкл/хв.

Таким чином, запропонований нами процес відповідає критерію "новизна".

Відомі процеси відтворення інтрацеребральної геморагії шляхом внутрішньомозкової ін'єкції крові та з попередньою механічною деструкцією тканини мозку в заданій ділянці. Поряд з цим, метод, що пропонується, відрізняється від вищезазначених тим, що аутокров вводиться в ділянку внутрішньої капсули дискретно в залежності від необхідного ступеня тяжкості (10мкл/100г маси тіла - незначного, 20мкл/100г - помірного та 30мкл/100г - тяжкого) післяінсультного періоду зі швидкістю 5-10мкл/хв.

Це дозволяє зробити висновок про відповідність розробленого способу критерію "суттєві відмінності".

Детальний аналіз результатів, отриманих у ході проведення експериментальних досліджень, підтверджує, що найбільш адекватними моделями, при застосуванні яких виявляється найвища відтворюваність інтрацеребральної геморагії, є ті, що були відтворені у тварин III, IV та V груп. Конкретні приклади експериментального відтворення

інтрацеребральної геморагії свідчать про те, що поставлена задача була досягнута.

Приклад 1. Піддослідний - білий щур масою 280г, самець. Після наркотизації тіопенталом натрію (40мг/кг внутрішньоочеревинно) тварину фіксували в стереотаксичному апараті. Шкіру на голові після знезараження антисептиком (5% розчин йоду) розтинали (довжина розтину - 1,0-1,5см), оголювали кістки черепа та видаляли окістя. Відповідно до стереотаксичних координат внутрішньої капсули (H=6,5мм, L=3,0мм, A=-1,5 від брегми) в ділянці правої півкулі в кістці робили отвір діаметром 0,7-0,9мм. У тканину мозку за допомогою стереотаксичного приладу занурювали голку діаметром 0,5-0,7мм та вводили 0,3-0,4мл аутокрові протягом 3-4хв. Після ін'єкції голку залишали на місці на 3хв., а після її вивільнення шкіру на голові зшивали вузловим швом і обробляли антисептиком.

Після операції в перші хвилини спостерігалось прогресуюче зниження частоти дихальних рухів аж до 50-55/хв. Тварина лежала нерухомо, але періодично спостерігалися судоми, значно знижувалась температура тіла, наступала глибока кома. Через 40хв. зафіксовано смерть тварини. Морфологічний огляд макроскопічних зрізів мозку померлої тварини з'ясував, що швидка смерть була зумовлена відносно швидким інфузуванням (3-4хв.) досить значного об'єму крові, що призвело до різкого наростання внутрішньомозкової компресії мозку, потрапляння крові в цереброспінальну рідину бічних шлуночків (прорив їх оболонок) зі стисненням довгастого мозку і смертельним пригніченням дихального центру на дні IV шлуночка. Паралельно цьому ретроградним шляхом кров розповсюдилася під оболонки головного мозку, що викликало додатковий набряк мозку і прискорило смерть тварини.

Приклад 2. Білий щур масою 270г, самець, анестезований тіопенталом натрію (40мг/кг внутрішньоочеревинно). Після фіксації у стереотаксичному апараті та підготовки операційного поля, в ділянці склепіння черепа зроблено розріз шкіри по сагітальній лінії довжиною 1-1,5см. З верхніх кісток черепа видалено окістя. Відповідно до стереотаксичних координат проекції внутрішньої капсули (H=4,5мм, L=3,0мм, A=-1,5 від брегми) в черепі висвердлено отвір діаметром 0,7-0,9мм. Направляючу голку-канюлю (пристрій для моделювання локального крововиливу в структури мозку) занурено в тканини мозку за допомогою маніпулятора стереотаксичного апарату на глибину 4,5мм. Після цього висунуто мандрен-ніж до верхнього фіксатора та здійснено 3 повороти праворуч, потім - ліворуч, підсікаючи таким чином тканини зі судинами в цій зоні. Мандрен-ніж повернули в початкове положення, голку-канюлю занурили до 6,5мм. Знову витягали мандрен-ніж, аналогічним чином прокручували його та витягали з черепа. Через 2-3хв. в ділянку механічно ушкодженої тканини вводили за допомогою направляючої голки-канюлі 0,1-0,14мл аутокрові. Голку-канюлю залишали в мозку тварини на 3-4хв. Шкіру на голові зашивали вузловим швом та обробляли антисептиком.

Після виходу з наркозу (в найгостріший період

розвитку патології) тварина самостійно пересувалася. Дихання та температура тіла - в межах норми, наявні більшість неврологічних реакцій. У 1-й день після відтворення моделі інтрацеребральної геморагії тварини відносно динамічні, повне відновлення моторної поведінки та неврологічних реакцій спостерігається на 3-й день. На препаратах мозку були відсутні чітко локалізовані й оформлені гематоми (виявлено лише незначні краплинні крововиливи в ділянці деструкції тканини мозку). Натомість помітніша зона механічного пошкодження ділянки СІ, яка більше відповідає травматичному пошкодженню, а не розвитку геморагічного інсульту.

Приклад 3. Білий щур масою 275г, самець. Загальна анестезія проводилася внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію (40мг/кг). Після фіксації, підготовки операційного поля та відбору крові з бічної хвостової вени (до крові для попередження її зсідання додавали 7-10мкл розчину геларину - 5ОД на 1мл) у ділянці склепіння черепа робили розтин шкіри за сагітальною лінією довжиною 1,0-1,5см. З поверхні черепа ретельно видаляли окістя та, відповідно до стереотаксичних координат проекції внутрішньої капсули ($H=6,5\text{мм}$, $L=3,0\text{мм}$, $A=-1,5\text{мм}$ від брегми), в кістці робили отвір діаметром 0,6-0,8мм. Після цього в тканину мозку занурювали голку діаметром 0,5-0,7мм до досягнення розрахункової необхідної глибини. За допомогою мікроінфузійного насоса в ділянку внутрішньої капсули вводили 0,1мкл/100г маси тіла (27,5мкл) аутокрові тварини зі швидкістю 10мкл/хв, після чого голку залишали в мозковій тканині на 3-5хв., потім її повільно витягали за допомогою стереотаксичного маніпулятора. Операційну рану зшивали вузловим швом, краї рани обробляли антисептиком.

Після виходу з наркозу щур рухався повільно, дихання - в межах норми, температура тіла дещо знижена, частина неврологічних реакцій відсутня. На 1-й день після відтворення інтрацеребральної геморагії тварина малорухлива. Стабілізація локомоторної поведінки у таких тварин спостерігається на 3-4-й день. На 5-ту добу щура виведено з експерименту для подальшого морфологічного дослідження мозку. На макроскопічних зрізах виявлено крововиливи в ділянці СІ.

Загалом щури цієї групи, в яких моделювання інсульту проводили шляхом введення у внутрішню капсулу головного мозку крові в об'ємі 0,1мкл/100г (25мкл на середнього за масою щура) з надмалою швидкістю (не перевищувала 10мкл/хв.), спостерігалися такі зміни. В найгостріший період розвитку патології тварини повільно рухалися, дихання залишалося в межах норми, температура тіла дещо знижувалася. З боку ВНД реєструвалося послаблення частини неврологічних реакцій, зокрема рефлексів хапання, перевертання, постановки лапи на опору, здригання. На 1-й день після відтворення інтрацеребральної геморагії тварини залишалися малорухливими, а також були послаблені реакції здригання, перевертання, рогішковий рефлекс. Навпаки, тактильна чутливість у більшості тварин навіть підвищувалася. Стабілізація локомоторної поведінки спостерігалася на 3-4-у добу. Тільки у одного щура

виявлялися розлади функціонування вестибулярного апарату. В цій групі зафіксовано один летальний випадок на 7-й день експерименту. На макроскопічних зрізах забитих тварин були виявлені крововиливи в ділянці СІ (Фіг. А).

Приклад 4. Білий щур, маса - 295г, самець. Усі маніпуляції та оперативні втручання аналогічні прикладу 3. Різниця полягала в об'ємі аутокрові, що інфузували в ділянку СІ. У даному випадку в зазначену ділянку правої півкулі вводили 0,2мкл/100г маси тіла (59мкл) аутокрові.

У перші години після відтворення моделі тварина адинамічна, температура тіла та частота дихальних рухів знижені. Втрачена частина безумовних рефлексів. Через 24 години тварина малорухлива, рефлекси слабовиражені. Дихання та температура стабілізувалися, але пригнічені. На 3-ю добу помітні розлади вестибулярного апарату, які прогресують до 5-ї доби. Через 5 днів після відтворення моделі інтрацеребральної геморагії піддослідного щура виведено з експерименту. На макроскопічних препаратах мозку забитої тварини - добре виражена гематома з чіткою локалізацією.

Загалом у групі в перші години після відтворення моделі тварини залишалися рухливими, але у 10-20% спостерігалася невпевнена хода, температура тіла та частота дихальних рухів знижувалися. У 60% тварин реєструвалася відсутність рефлексів хапання, перевертання, постановки лапи на опору. Незважаючи на це, у них реєструвалися (хоча дещо послаблені) рефлекси роівки, згинання та здригання. Через 24 години тварини залишалися малорухливими, у 30% були послаблені рефлекси перевертання та здригання. Колювання дихальних екскурсій та температури стабілізувалися, але залишалися пригніченими. На 3-ю добу у 3 щурів (27%) залишалися розлади вестибулярного апарату, які навіть прогресували до 5-ї доби. Смертність у цій дослідній групі склала 18%. На макроскопічних препаратах мозку забитих тварин - добре виражена гематома з чіткою локалізацією (Фіг. В).

Приклад 5. Білий щур масою 290г. Після анестезії тіопенталом натрію (40мг/кг внутрішньоочеревинно) всі наступні процедури здійснювали згідно із загальним процесом, детально описаним у прикладах 2 і 3. Виняток становив об'єм уведеної в мозок аутокрові, який дорівнював 0,3мкл/100г маси тіла (87мкл).

З перших годин розвитку патологічного процесу тварина перебувала в комі, рефлекси були відсутніми, дихання - глибоке (80-95/хв.), температура тіла - значно знижена. Через 20год. тварина померла. Морфологічний огляд мозку виявив гематому досить значних розмірів з чіткими формами. Прориву крові в шлуночкову систему, а також виходу її під оболонки головного мозку не виявлено (Фіг. С).

Загалом у тварин цієї групи після проведення заходів з моделювання інсульту спостерігався коматозний стан, який манифестував відсутністю рефлексів, поглибленим диханням (65-85/хв.), значно зниженою температурою тіла. Через 20год. був зафіксований перший летальний випадок, а на другу добу (через 48 годин) померло 7 тварин, що склало 78%. Морфологічний огляд мозку помер-

лих щурів виявив гематоми значних розмірів з чіткими формами в усіх тварин. Прориву крові в шлуночкову систему, а також виходу її під оболонки головного мозку не було виявлено. Високий відсоток летальності (78%) у даній групі, можливо, був спричинений, як і в клінічних умовах, розвитком набряку мозку, що прогресивно розвивався після внутрішньомозкової інфузії аутокрові.

Таким чином, моделювання геморагічного інсульту способом, що заявляється, дозволяє одержати типові порушення неврологічного статусу та загальну симптоматику гострого геморагічного інсульту різного ступеня тяжкості в залежності від об'єму введеної аутокрові для задоволення вимог хронічного дослідження порушень функціонування різних систем організму, виявлення морфологічних змін та розробки методів фармакологічної корекції стану, а також підвищення відтворюваності методу до 95%.

Джерела інформації:

1. Alumbabic M., Peeling J., Del Bigio M.R. Intracerebral hemorrhage in the rat. Effect of hematoma aspiration // *Stroke*. - 1998. - Vol. 29. - P.1917-1923.
2. Мирзоян Р.С., Саратиков А.С., Плотников М.Б. и др. Методические указания по экспериментальному изучению препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени // *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. - М.: ИИА "Ремедиум", 2000. - С.159-161.
3. Макаренко А.Н., Косицын Н.С., Пасикова Н.В., Свинов М.М. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных // *Журн. высш. нервн. деятельности*. - 2002. - Т. 52, №6. - С.765-768.



Fig.