



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92300** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
G09B 23/28 (2006.01)
A61B 17/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 02398	(72) Винахідник(и): Цимбалюк Віталій Іванович (UA), Колесник Володимир Володимирович (UA), Торяник Інна Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 11.03.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.08.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.08.2014, Бюл.№ 15	(73) Власник(и): Колесник Володимир Володимирович, пер. 23 Серпня, 1, кв. 86, м. Харків, 61103 (UA)

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ГОСТРОГО ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ІШЕМІЧНОГО (ЕМБОЛІЧНОГО) ІНСУЛЬТУ У ЩУРІВ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання гострого церебрального ішемічного (емболічного) інсульту у щурів здійснюють шляхом емболізації судин. Тваринам у сонну артерію вводять гістоакрил, розчинений у співвідношенні 1:5 у ліпоїдолі в кількості 0,1-0,2, потім ін'єкційну голку видаляють, місце пункції тампонуєть шматочком "Тахокомбу" розміром 3×3 мм, експозиція до 4-5 хвилин, лігатуру видаляють, пошарово рану зашивають.

UA 92300 U

Корисна модель належить до галузі фундаментальної (експериментальної) медицини, а саме, до патологічної анатомії, фізіології та експериментальної (відновної) нейрохірургії. Спрямована на поглиблене дослідження етіопатогенезу гострої ішемії головного мозку та пов'язаних із нею розладів гемодинаміки, розвитку трофічних, запальних, деструктивно-дегенеративних процесів, некрозу, склерозу.

Корисна модель може бути використана з метою вивчення первинних (ранніх) ознак ішемії, диференціально-діагностичних маркерів інсульту, відновних, компенсаторних реакцій у разі розвитку останніх. Пропонована модель націлена на вивчення стратегічних закономірностей клінічного перебігу, умов хронізації ішемічного процесу; прогнозу ризику розвитку ускладнень, найближчих та віддалених наслідків.

Спосіб є перспективним з точки зору експертної оцінки фізико-хімічних, біологічних, фармакологічних, клінічних властивостей лікарських засобів та способів їх застосування за умов розвитку ішемії.

Відомими є способи, згідно яких, з метою моделювання ішемічного пошкодження головного мозку здійснюють припинення кровотоку по гілках сонної артерії. Основною відмінною цих способів є механічне перекриття кровотоку по гілках сонної артерії (Zhang R.L., Zhang L., Jiang Q., Zhang Z.G., Goussev A, Chopp M. Postischemic intracarotid treatment with TNK-tPA reduces infarct volume and improves neurological deficits in embolic stroke in the unanesthetized rat. Brain Res.-2000. - V. 878, N 1-2. - P.64-71). В цьому випадку зберігається колатеральний кровообіг з контрлатеральної сонної артерії (CA) та вертебро-базиллярного басейну. Показової картини гострої церебральної ішемії не спостерігаються.

Відомим є спосіб моделювання ішемічного ураження головного мозку (Zhang Z., Zhang R.L., Jiang Q., Raman S.B., Cantwell L., Chopp M. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia /J Cereb Blood Flow Metab. 1997. V.17, N 2. P. 123-35.), який передбачає введення у середню мозкову артерію через зовнішню сонну артерію катетера, заповненого тромбіном. Після цього забирають кров, яка швидко перетворюється на тромб, що й вводять до артерії. У басейні середньої мозкової артерії виникає об'ємне вогнище інфаркту, а лізис тромбу відбувається протягом 4 діб.

Недоліками способу є формування тромбу різного розміру, досить значне варіювання часу його лізису, можлива його організація і облітерація судин.

Відомим є спосіб моделювання гострої ішемії шляхом перев'язування правої сонної артерії з емболізацією зависю сульфату барію (0.1-0.5 мл) гілок правої внутрішньої сонної артерії. Це забезпечує виключення як магістрального, так і колатерального кровопостачання відповідної гемісфери головного мозку (Патент на винахід № 25489А від 30.10.1998р.). Показового інсульту не спостерігається.

Інша корисна модель базується на використанні як емболізуючої речовини суспензії ізольованих адипоцитів у розчині, що містить 2,8 г/л кальцію хлориду та 10 г/л твіну (Патент на корисну модель № 34604 від 11.08.2008.).

Недоліками цих методів моделювання гострої ішемії є те, що емболізація проводилась на перекритому (не працюючому) кровообігу.

Найбільш близьким та вибраним як найближчий аналог (прототип) є спосіб моделювання гострого церебрального ішемічного інсульту у щурів, в якому здійснюють емболізацію гілок правої внутрішньої артерії зависю барію сульфату в кількості 0,1-0,3 мл на працюючому кровообігу. Таким чином досягається надійна емболізація частинами зависі барію сульфату судин головного мозку як магістрального, так і колатерального кровообігу. (Пат. на к/м № 53080).

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу моделювання гострого церебрального ішемічного інсульту у щурів, в якому за рахунок використання гемостатичного матеріалу, досягається виключення перекриття кровообігу, за рахунок чого досягається отримання гострого церебрального ішемічного (емболічного) інсульту.

Поставлена задача вирішується в способі моделювання гострого церебрального ішемічного (емболічного) інсульту у щурів, який здійснюють шляхом емболізації судин, згідно з корисною моделлю, тваринам у сонну артерію вводять гістоакрил, розчинений у співвідношенні 1:5 у ліпоїдолі в кількості 0,1-0,2, потім інжекційну голку видаляють, місце пункції тампують шматочком "Тахокомбу" розміром 3×3 мм, експозиція до 4-5 хвилин, лігатуру видаляють, пошарово рану зашивають.

Важливим фактором є механізм емболізації, що проводиться на працюючому кровообігу. Сенс останньої полягає у тому, що після емболізації перекриття кровообігу не проводиться завдяки використанню як гемостатичного матеріалу "Тахокомб". Це надало можливість

дослідження нейродегенеративних та відновних, компенсаторних процесів з використанням гістологічних, цитологічних, імунологічних методів.

Запропонований спосіб моделювання гострої церебральної ішемії головного мозку у експериментальних тварин здійснюють наступним чином.

Тварину вводять у наркоз за прийнятою методикою і фіксують на операційному столі у положенні на спині. Розтин шкіри виконують по середній лінії тіла від верхньої третини шиї до груднини. Відсепаровують щитоподібну залозу і відводять уверх. Латерально зміщують грудинно-ключично-сосцевидний м'яз. Сепарують нервово-судинний пучок шиї, виділяють сонну артерію. Підводять одну лігатуру для іммобілізації сонної артерії під час пункції. Потім проводять пункцію правої сонної артерії, інтраартеріально вводять розчин гістоакрилу та ліпідолу у співвідношенні 1:5 в кількості 0,1-0,2 мл, потім інжекційну голку видаляють. Місце пункції тампують шматочком "Тахокомбу" розміром 3×3 мм, експозиція до 4-5 хвилин. Лігатуру видаляють. Пошарово рану зашивають.

Таким чином, проводять емболізацію гілок правої внутрішньої сонної артерії рентгеноконтрастною емболізуючою речовиною (розчин гістоакрилу та ліпідолу у співвідношенні 1:5 в кількості 0,1-0,2 мл), яка забезпечує виключення як магістрального, так і колатерального кровообігу, без перекриття загального кровообігу в правій внутрішній сонній артерії з метою гемостазу, як у прототипі, завдяки використанню гемостатичного матеріалу "Тахокомб". Оцінка тяжкості неврологічної симптоматики при ішемії головного мозку у щурів оцінювалась за шкалою (A. Mc Graw, 1977).

Результат: через 1-3 доби після операції спостерігались звуження очної щілини з боку операції, тонічна флексія контрлатеральної передньої лапи та її менший супротив поверхні при пасивному русі назад, рух у контрлатеральний бік при утриманні щура за хвіст, тенденція до спонтанного обертання тварин у контрлатеральну сторону при знаходженні на горизонтальній поверхні. Гістологічно в ураженій півкулі через 1 добу в малих артеріях виявляються адипоцити, спостерігається розширення кровоносних мікросудин, периваскулярний набряк. З третьої доби в сенсорній корі виявляються реактивно змінені нейрони. Через 7-14 діб на верхньо-бічній поверхні ураженої півкулі виявлявся дефект тканини, кіста.

Прикладами конкретного використання способу, що пропонується, є дослідження модельованого ішемічного ушкодження мозку у щурів.

Піддослідні тварини були поділені на дві групи. Оперативні втручання здійснювали під внутрішньочеревним тіопенталовим наркозом (50 мг/кг).

Першу групу (контроль) склали 20 щурів, яким в ліву сонну артерію вводили 0,2 мл фізіологічного розчину та лігували. Другу групу склали 20 тварин, в сонну артерію яким вводили 0,2 мл розчину (вміст 20 мл відмитих ізольованих адипоцитів, 2,8 мл 10 % розчину кальцію хлориду, 10 г твіну та 0,9 % розчин натрію хлориду до 100 мл). Забір матеріалу проводили на 1, 3, 7, 14, 17, 21 та 28 добу після етаназії тварин, що досягалось шляхом передозування кетамінового наркозу. Головний мозок самців щурів лінії Вістар діставали із порожнини черепу, відсепаровували (м'яка оболонка, судини). Потому фіксували у 12 % формаліні на фосфатному буфері (pH=7,0-7,2) протягом 24 годин, постфіксували, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації (від 30° до абсолютного) та заливали у смоли (парафін/целоїдин). Гістологічні зрізи виготовляли із блоків за допомогою санного мікротому (МК-24), товщиною 7 мкм, забарвлювали гематоксиліном та еозином, азур II-еозином, за Рего, Ван-Гізоном, Кахалем, Расказовою.

Зразки препаратів досліджували із застосуванням світлооптичних методів діагностики. Вивчали структурно-функціональні особливості нейронів сенсорної кори, клітин глії, ендотеліоцитів церебральних мікросудин, епіндими латеральних шлуночків. Аналіз отриманих зрізів проводили із застосуванням світлооптичної системи мікроскопу Lieca (Німеччина): x 300; 600. Цифрові знімки отримували за допомогою фотокамери Olympus C4040Z00M та ПЕВМ із програмним забезпеченням. Отримані результати піддавали статистичній обробці (пакет програм "Statistica").

Проведені спостереження показали, що на 1 добу експерименту у щурів з модельованою ішемією спостерігається звуження очної щілини з боку операції, тонічна флексія контрлатеральної передньої лапи та її менший супротив поверхні при пасивному русі назад, рух у контрлатеральний бік при триманні щура за хвіст, тенденція до спонтанного обертання тварин у контрлатеральну сторону при знаходженні на горизонтальній поверхні. Гістологічно в ураженій півкулі мозку іноді виявлялися адипоцити. Кровоносні судини з боку ураження були розширенні. Виявлялись розшарування судинної стінки, значний периваскулярний набряк. Відмічався гіперхроматоз нейронів.

У щурів контрольної групи спостерігалось звуження очної щілини з боку операції, слабка тонічна флексія контрлатеральної передньої лапи. Гістологічно визначалось розширення

окремих мікросудин, іноді незначний периваскулярний набряк. Кількість ушкоджених нейронів у сенсомоторній корі щурів з модельованою ішемією складала $87,1 \pm 1,6$ %, а у контрольній групі – $8,1 \pm 0,4$ %.

На 3-тю добу експерименту у щурів з модельованою ішемією спостерігалось звуження очної щілини з боку операції, тонічна флексія контрлатеральної передньої лапи та її менший супротив поверхні при пасивному русі назад, рух у контрлатеральний бік при утриманні щура за хвіст. Гістологічно: в ураженій півкулі мозку-розширення кровоносних судини з боку ураження, периваскулярний набряк. У щурів контрольної групи неврологічна симптоматика обмежувалася звуженням очної щілини з боку операції. Збоку перев'язаної артерії кількість ушкоджених (гіперхромних, деструктивних) нейронів у корі іпсилатеральної півкулі мозку достовірно не відрізнялася від контрлатеральної. Спостерігались помірно розширення кровоносних мікросудини, незначний периваскулярний набряк.

Практично усі нейрони у сенсомоторній корі щурів з модельованою ішемією є зміненими, тоді як у контрольній групі кількість змінених нейронів складала $8,8 \pm 0,5$ %.

Через 14 діб після початку дослідження в щурів, яким моделювалася ішемія, спостерігається зменшення виразності неврологічної симптоматики, рух у контрлатеральний бік при утриманні щура за хвіст виражений слабо, спонтанне обертання тварин у контрлатеральну сторону при знаходженні на горизонтальній поверхні практично відсутнє. В ураженій півкулі мозку зберігається розширення кровоносних судин, периваскулярний набряк зменшується у порівнянні з попереднім строком спостережень. У щурів контрольної групи зберігалось звуження очної щілини з боку операції. Виявлялися окремі помірно розширені кровоносні мікросудини, периваскулярний набряк практично не визначався.

Практично всі нейрони у сенсомоторній корі щурів з модельованою ішемією зазнають некрозу або знаходяться у стані дегенерації, а у контрольній групі – змінені нейрони складають $9,6 \pm 0,4$ %.

Через 28 діб після початку дослідження у щурів, яким моделювалася ішемія, спостерігається звуження очної щілини з боку операції, коли інша неврологічна симптоматика є невиразною. В ураженій півкулі мозку виявлялися окремі розширені кровоносні судини, незначно виражений навколо них периваскулярний набряк. На гістологічних препаратах з боку операції у корі мозку візуально у 3-х тварин визначався дефект тканин, у 2-х – кісти заповнені ліквором.

Навколо кіст у сенсомоторній корі щурів з модельованою ішемією виявляються змінені нейрони, кількість яких становила $31,7 \pm 1,9$ %, у контрольній групі ці показники становили $9,1 \pm 0,4$ %.

Таким чином, проведені спостереження показали, що емболізація дрібних артерій головного мозку ізольованими адипоцитами призводить до розвитку ішемічних розладів, порушень трофіки, деструктивно-дегенеративних процесів, некрозу, що за своєю структурною суттю є інфарктом мозку.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання гострого церебрального ішемічного (емболічного) інсульту у щурів, який здійснюють шляхом емболізації судин, який **відрізняється** тим, що тваринам у сонну артерію вводять гістоакрил, розчинений у співвідношенні 1:5 у ліпоїдолі в кількості 0,1-0,2, потім ін'єкційну голку видаляють, місце пункції тампують шматочком "Тахокомбу" розміром 3×3 мм, експозиція до 4-5 хвилин, лігатуру видаляють, пошарово рану зашивають.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601