

Е.А. Демидик
МОДЕЛИРОВАНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У МЫШЕЙ
ФОТОТРОМБОЗОМ

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. А.В. Волчек
Кафедра фармакологии
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Е.А. Demidik
MODELING OF ISCHEMIC STROKE IN MICE WITH PHOTOTHROMBOSIS
Tutor: PhD, associate professor A.U. Vauchok
Department of Pharmacology
Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Посредством фототромбоза церебральных сосудов воспроизвели в эксперименте ишемический инсульт верхней поверхности правого полушария головного мозга мышей. Площадь нежизнеспособной вследствие инсульта ткани мозга, окрашенной трифенилтетразолия хлоридом, определяли морфометрически, а также фотометрически при 500 нм после экстракции формазана 96% этанолом.

Ключевые слова: инсульт ишемия мозг тромбоз.

Resume. Photothrombosis of cerebral vessels was used to reproduce in an experiment an ischemic stroke of the upper surface of the right hemisphere of the brain of mice. The area of non-viable brain tissue due to stroke, stained with triphenyltetrazolium chloride, was determined morphometrically, as well as photometrically at 500 nm after formazan extraction with 96% ethanol.

Keywords: stroke ischemia brain thrombosis.

Актуальность. В настоящее время церебральный инсульт является наиболее частым жизнеугрожающим неврологическим заболеванием. По данным Всемирной организации здравоохранения заболеваемость инсультами за последних десять лет возросла от 1,5 до 5,1 на 1000 населения. Инсульт занимает третье место среди причин смерти и первое среди причин инвалидности по данным Министерства здравоохранения Беларуси. В острой стадии болезни погибают 25-30% пациентов, к концу первого года жизни после инсульта – больше половины. Все это делает необходимым совершенствование методов лечения инсульта, в том числе посредством разработки и внедрения новых эффективных лекарственных средств, повышающих выживаемость тканей головного мозга при острой патологии.

На доклиническом этапе изучения потенциальных церебропротекторов в экспериментальной фармакологии широко применяют моделирование острого ишемического инсульта головного мозга у лабораторных животных путем обтурации на определенное фиксированное время магистрального церебрального сосуда с последующим устранением окклюзии и реперфузией. При этом, оценивая влияние веществ на устойчивость тканей к гипоксии и выраженность постреперфузионных повреждений, такая модель не позволяет обнаружить вероятное влияние изучаемых веществ на систему гемостаза, что может иметь существенное значение в результирующем действии лекарства [1]. В связи с этим ведется поиск альтернативных методов индукции ишемического инсульта головного мозга у

лабораторных животных, дающих возможность изучать весь комплекс событий при ишемическом инсульте коры головного мозга, включая образование тромба, собственно ишемию, естественную реканализацию тромба, реперфузию, инфильтрацию клетками воспаления и последующие процессы. В настоящем исследовании мы модифицировали оригинальный метод индукции инфаркта мозга [1, 2, 3], основанный на фотохимической реакции между светочувствительным красителем бенгальским розовым и светом в присутствии молекулярного кислорода [1].

Цель: разработка пригодной для скрининговых исследований малоинвазивной экспериментальной модели ишемического инсульта головного мозга у мышей фототромбозом с последующим количественным определением доли жизнеспособной ткани мозга.

Задачи:

1. Воспроизвести в эксперименте ишемический инсульт верхней поверхности правого полушария головного мозга мышей посредством фототромбоза церебральных сосудов.

2. После окраски макропрепаратов головного мозга мышей 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом (ТТС) определить площади жизнеспособной и нежизнеспособной ткани.

3. Экстрагировать из мозга мышей окрашенный формазан и определить его фотометрически.

Материалы и методы. Работа выполнена на 24 нелинейных белых мышах, массой 30-35 г, находившихся на стандартном рационе вивария. Все эксперименты проводили в соответствии с этическими нормами обращения с животными и правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях, обоснованными рекомендациями и требованиями «Всемирного общества защиты животных» и «Европейской конвенцией по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986). Обездвиженных интраперитонеальной инъекцией 40% водного раствора этанола в дозе 0,1 мл / 10 г массы тела мышей фиксировали на операционном столике, в хвостовую вену вводили изотонический раствор бенгальского розового из расчета 0,05 мл/г для индукции инсульта. Твердотельным лазером с диодной накачкой мощностью 75 мВт и длиной волны 532 нм формировали параллельный пучок излучения диаметром 5 мм, который на протяжении 3 минут направляли перпендикулярно верхней поверхности черепа в область правого полушария, облученность составляла 0,1 Вт/см². При освещении лучом лазера сосудов сенсibilизированных бенгальским розовым животных инициируется каскад реакций, приводящий к образованию тромба [1]. Эталонный церебропротектор мелатонин в дозе 10 мг/кг либо плацебо (дистиллированную воду) вводили в виде растворов внутрибрюшинно за 30 минут до индукции наркоза. Мышей выводили из эксперимента на следующие сутки летальной дозой хлорэтана. После извлечения мозга его окрашивали в 2% растворе ТТС. Жизнеспособная ткань, содержащая лактатдегидрогеназу, превращала бесцветный ТТС в нерастворимый в воде формазан, окрашенный в глубокий красный цвет. Нежизнеспособные участки оставались неокрашенными. В дальнейшем в стандартных условиях делали

макрофотографии верхней поверхности полушарий мозга, полученные цифровые изображения использовали для определения площади «живой» (ТТС+) и некротизированной (ТТС-) ткани [4]. Затем полушария разделяли по центральной борозде, взвешивали, измельчали в стеклянном гомогенизаторе в 96% этаноле для экстракции формазана, центрифугировали на 3000 об/мин, отделяли надосадочную жидкость. Фотометром Solar PM2111 определяли показатели поглощения света супернатанта при 500 нм (максимум абсорбции формазана [3]).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что облучение лучом лазера верхней поверхности черепа сенсibilизированных бенгальским розовым животных в проекции правого полушария вызывает обширный ишемический инсульт. Окраска в ТТС препаратов мозга мышей показала, что поверхность левого полушария содержит жизнеспособную ткань, превращая краситель в формазан красного цвета. На правом полушарии в проекции зоны, освещенной лучом лазера, визуальнo выявляются неокрашенные участки нежизнеспособной ткани средней площадью 0,75 мм², соответствующие площади сечения пятна луча лазера на поверхности черепа. Различия относительной оптической плотности при 500 нм супернатантов гомогенизаторов левого (2,230) и правого (1,564) полушарий коррелируют с накоплением окрашенного формазана на поверхности мозга. У ложнооперированных мышей, получавших вместо бенгальского розового эквивалентный объем изотонического раствора внутривенно, окрашивание ТТС не выявляет нежизнеспособную ткань, а оптическая плотность супернатантов гомогенизаторов полушарий сопоставима. Средняя площадь инфаркта правого полушария мозга мышей, получавших эталонный церебропротектор мелатонин в дозе 10 мг/кг составляла 0,35 мм², что коррелировало с оптической плотностью гомогенизаторов полушарий мозга (2,329 левое; 2,077 правое).

Выводы:

1. Посредством фототромбоза церебральных сосудов воспроизвели в эксперименте ишемический инсульт верхней поверхности правого полушария головного мозга мышей.
2. Площадь нежизнеспособной вследствие инсульта ткани мозга, окрашенной погружением на 30 минут в 2% ТТС, определяли морфометрически, а также фотометрически при 500 нм после экстракции формазана 96% этанолом.

Литература

1. Wang-Fischer, Y. (Ed.) Manual of stroke models in rats / CRC Press is an imprint of the Taylor & Francis Group // 2009. – P. 360.
2. Boquillon, [M. Photochemically induced, graded cerebral infarction in the mouse by laser irradiation evolution of brain edema / M. Boquillon, J.P. Boquillon, J. Bralet // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. – 1992. – Vol. 27. – P. 1-6.
3. Zheng, Y. Experimental Models to Study the Neuroprotection of Acidic Postconditioning Against Cerebral Ischemia / Y. Zheng, Z. Shen, X. Wu, L. Jiang, [et. al.] // J. Vis. Exp. (125), e55931, doi:10.3791/55931.
4. Волчек А.В., Жданов А.А. Использование графического редактора Adobe Photoshop для градуальной оценки фармакологических эффектов // Труды молодых ученых 2004: Сб. науч. работ. – Минск: БГМУ, 2004. – С. 10 – 13.