



Традиции петербургской медицины + высокие технологии XXI века

Современные представления о проведении экспериментальных исследований на модели инсульта

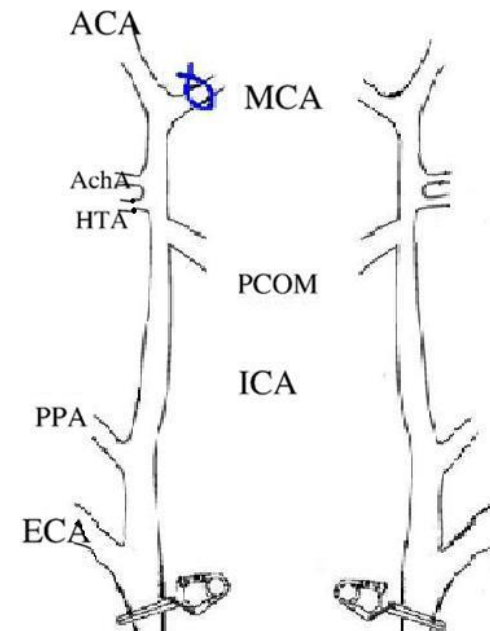
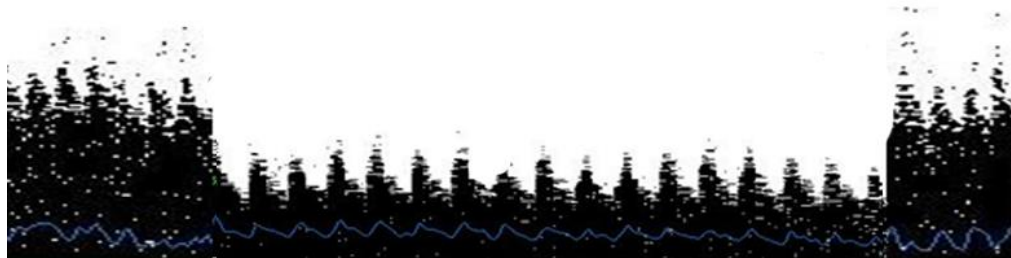
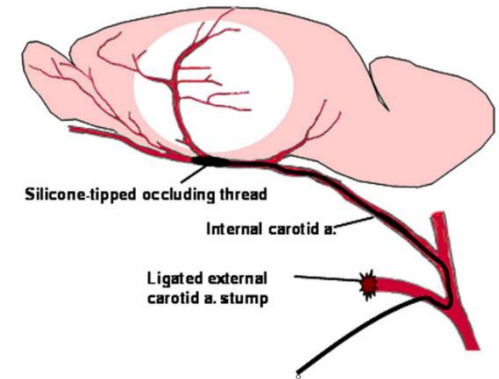
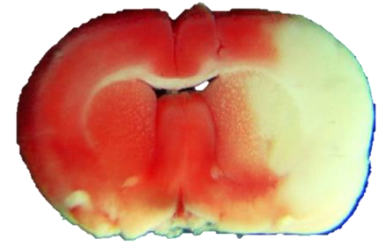
Научный симпозиум:
«Фундаментальные исследования при острой и хронической сосудистой недостаточности 1»

К.М.Н., ассистент
Шмонин Алексей Андреевич
Казань
7.10.2014



Характеристики ишемии мозга с позиции патофизиологии

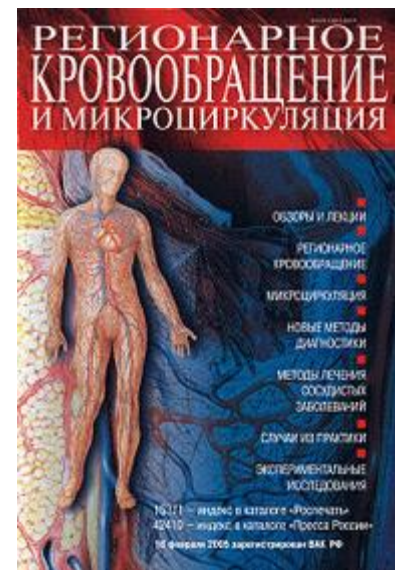
- Полная и неполная ишемия
- С реперфузией и без реперфузии
- Общая и фокальная
- Одноочаговая и многоочаговая



1

Контроль качества эксперимента при моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс по методике Koidzumi

Шмонин А.А, Дайнеко А.С., Просвирнина М.С., Колпакова М.Э., Шумеева А.Г., Мельникова Е.В., Власов Т.Д.



Цель исследования:

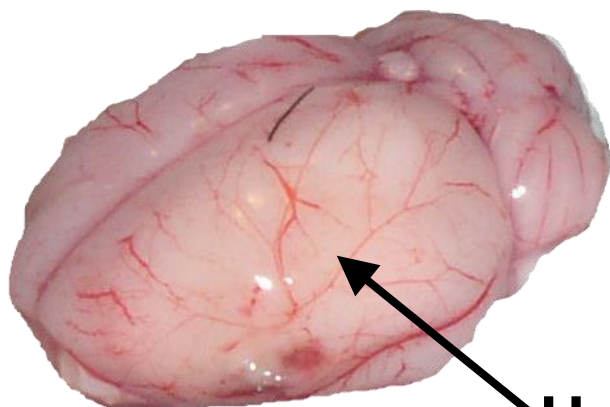
оценить эффективность использования высокочастотной ультразвуковой доплерографии («Минимакс-Допплер-К», датчик 25 мГц) для оценки качества проведения операции по моделированию фокальной транзиторной ишемии головного мозга по методике Koidzumi.

352 крыс самцов Вистар

1

Методика эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии крысы

(Koizumi J. 1986, в модификации Longa E.Z. И Belaeв)

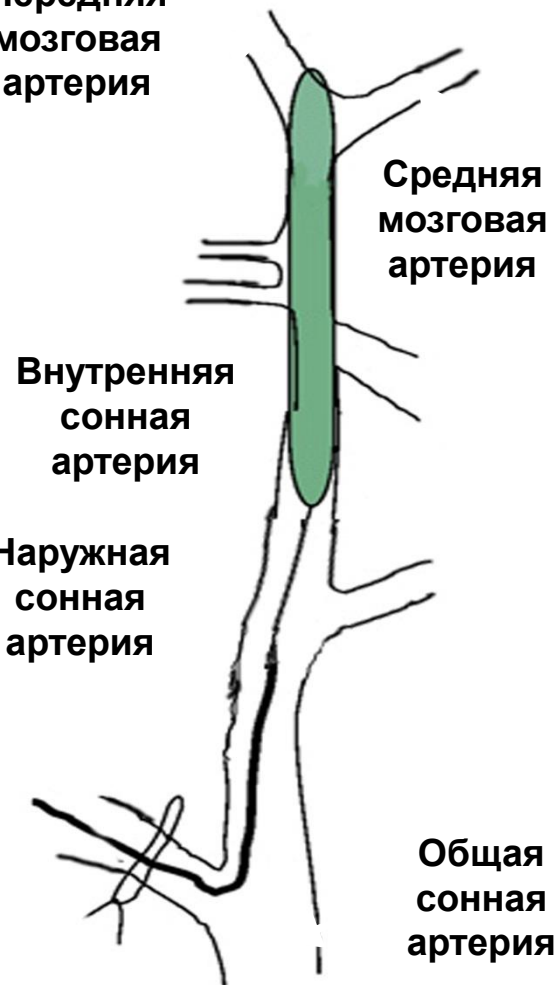


Некроз



**Витальная окраска мозга
трифенил-тетразолия хлорид
(макроскопический анализ)**

Передняя
мозговая
артерия



Средняя
мозговая
артерия

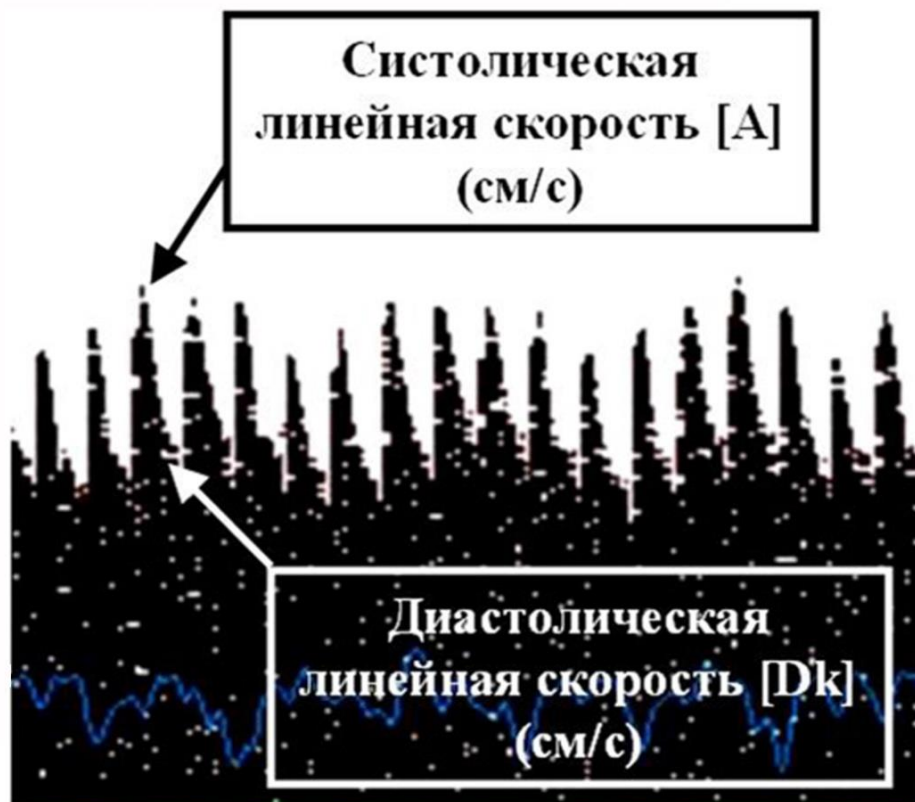
Внутренняя
сонная
артерия

Наружная
сонная
артерия

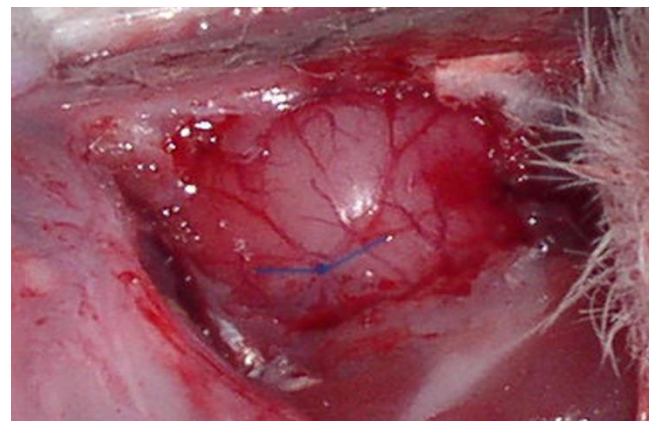
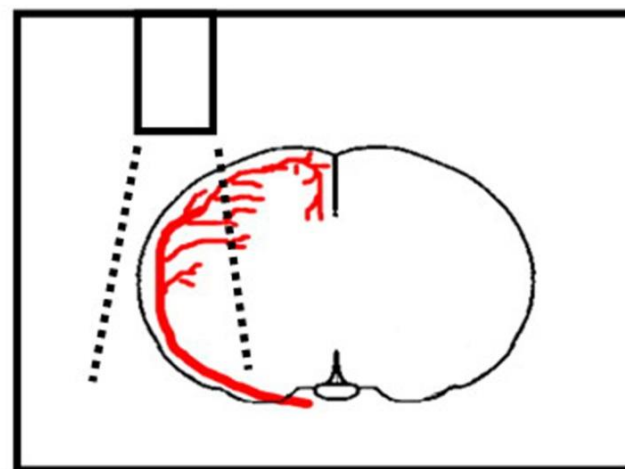
Общая
сонная
артерия

1

Допплерография ЛСМА

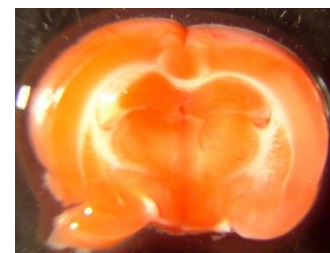
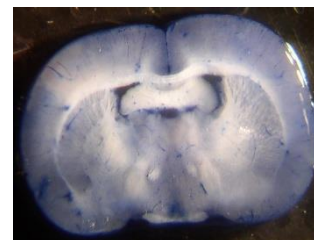
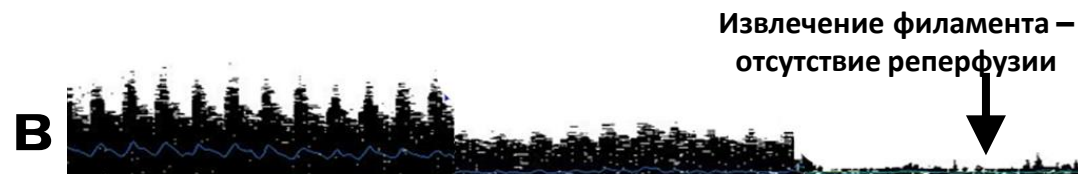
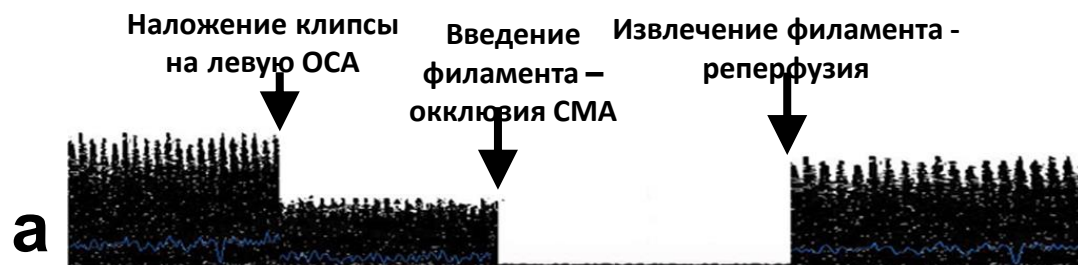


Средняя мозговая артерия (CMA)



1

Допплерограмма СМА у крыс при различных вариантах окклюзии СМА филаментом



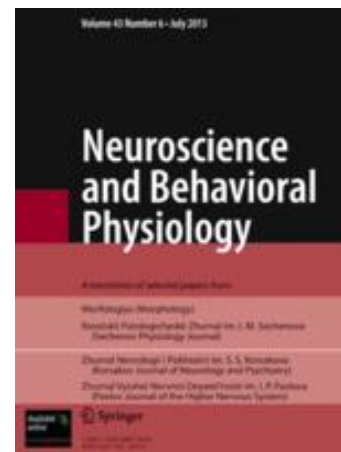
Причины, которые не позволили добиться полной окклюзии или привели к ситуации, когда отсутствовала реперфузия после извлечения филамента:

- Анатомически узкий вход в полость черепа;
- Недостаточно глубокое введение филамента;
- Введение филамента не во ВСА, а в НСА;
- Перфорация стенки артерии при введении филамента на любом этапе исследования;
- Несоответствие диаметра СМА и филамента;
- Аномалии развития сосудов (высокая или низкая бифуркация сонных артерий);
- Разрыв СМА и субарахноидальное кровоизлияние или паренхиматозное кровоизлияние, которые приводят к сдавлению СМА и отсутствию реперфузии (инфаркт занимает 100% бассейна СМА);
- Пристеночное тромбообразование (не чаще 5 % случаев), которое приводит к блокированию реперфузии по СМА после извлечения филамента (инфаркт занимает 100% бассейна СМА).

Как доплерография может помочь в повышении качества исследования?

- Тестирование филаментов для окклюзии СМА у крыс по методике Koizumi (например, после их изготовления);
- Контроль степени окклюзии СМА при ишемии мозга;
- Оценка стабильности расположения филамента во время ишемии;
- Контроль восстановления кровотока после извлечения филамента;
- Отбор животных для опыта, стандартизация по гемодинамике: исключение крыс с исходно низкими или высокими показателями линейной скорости кровотока;
- Контроль состояния животного во время опыта, УЗ сигнал меняется при изменении системного артериального давления;
- Оценка влияния фармакологических препаратов на церебральную гемодинамику.

Neuroscience and Behavioral Physiology, Vol. 42, No. 6, July, 2012



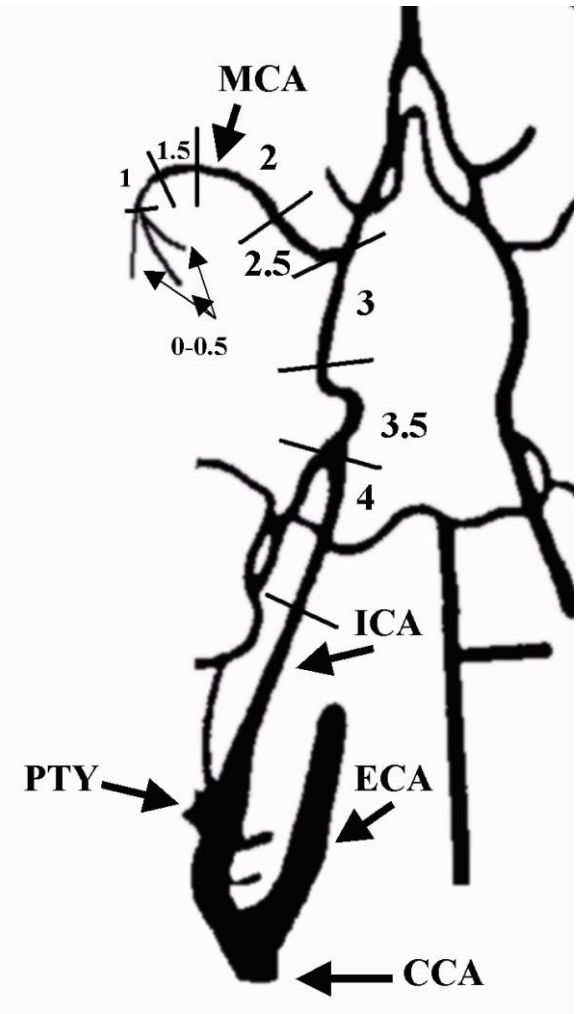
Protective Effects of Early Ischemic Preconditioning in Focal Cerebral Ischemia in Rats: The Role of Collateral Blood Circulation

**A. A. Shmonin,^{1,2} A. E. Baisa,^{1,2} E. V. Melnikova,¹
V. N. Vavilov,^{1,2} and T. D. Vlasov^{1,2}**

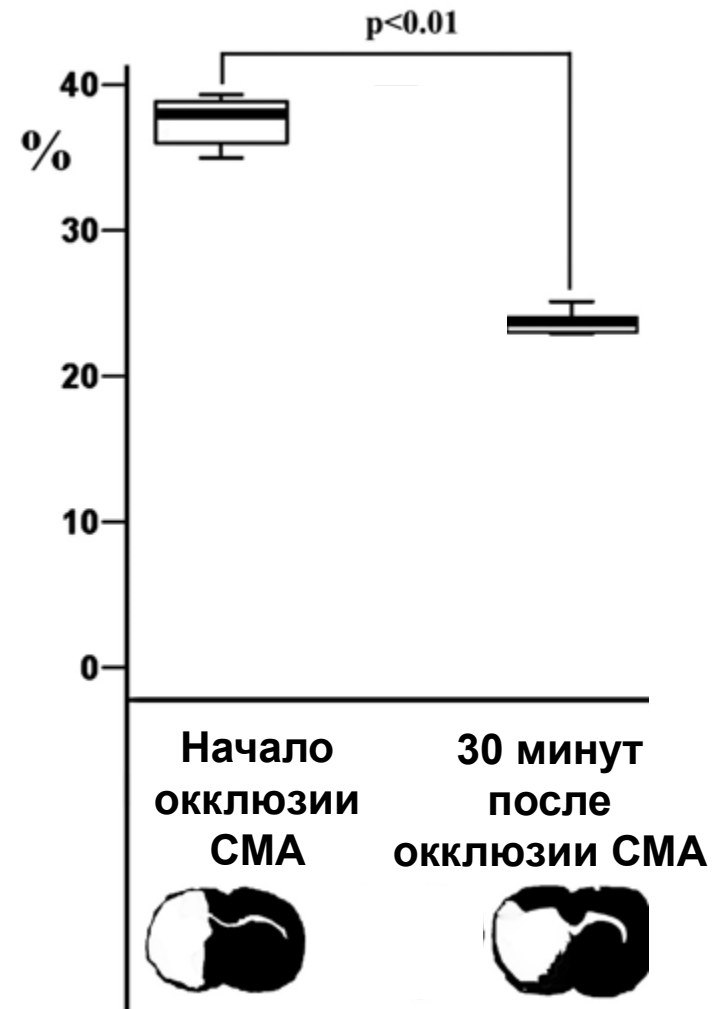
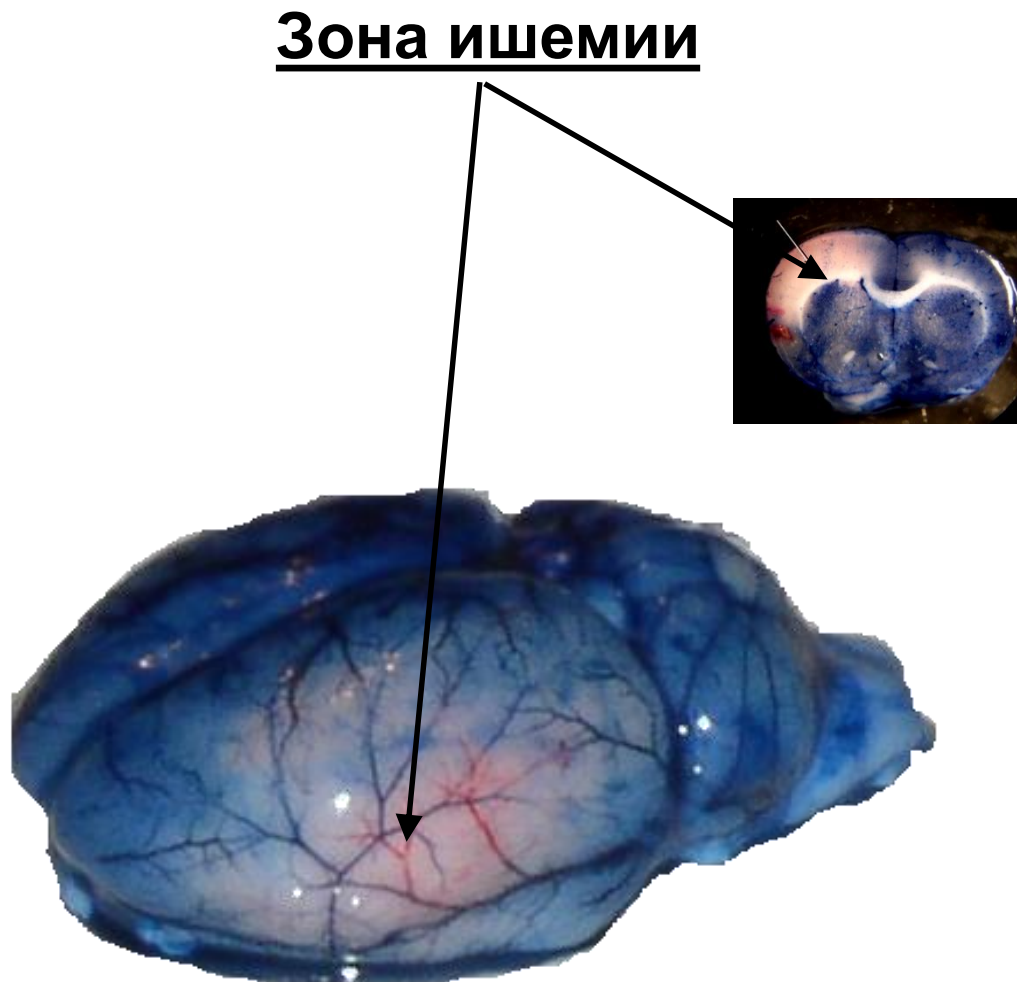
Translated from Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal imeni I. M. Sechenova, Vol. 97, No. 2, pp. 203–213, February, 2011. Original article submitted April 24, 2009.

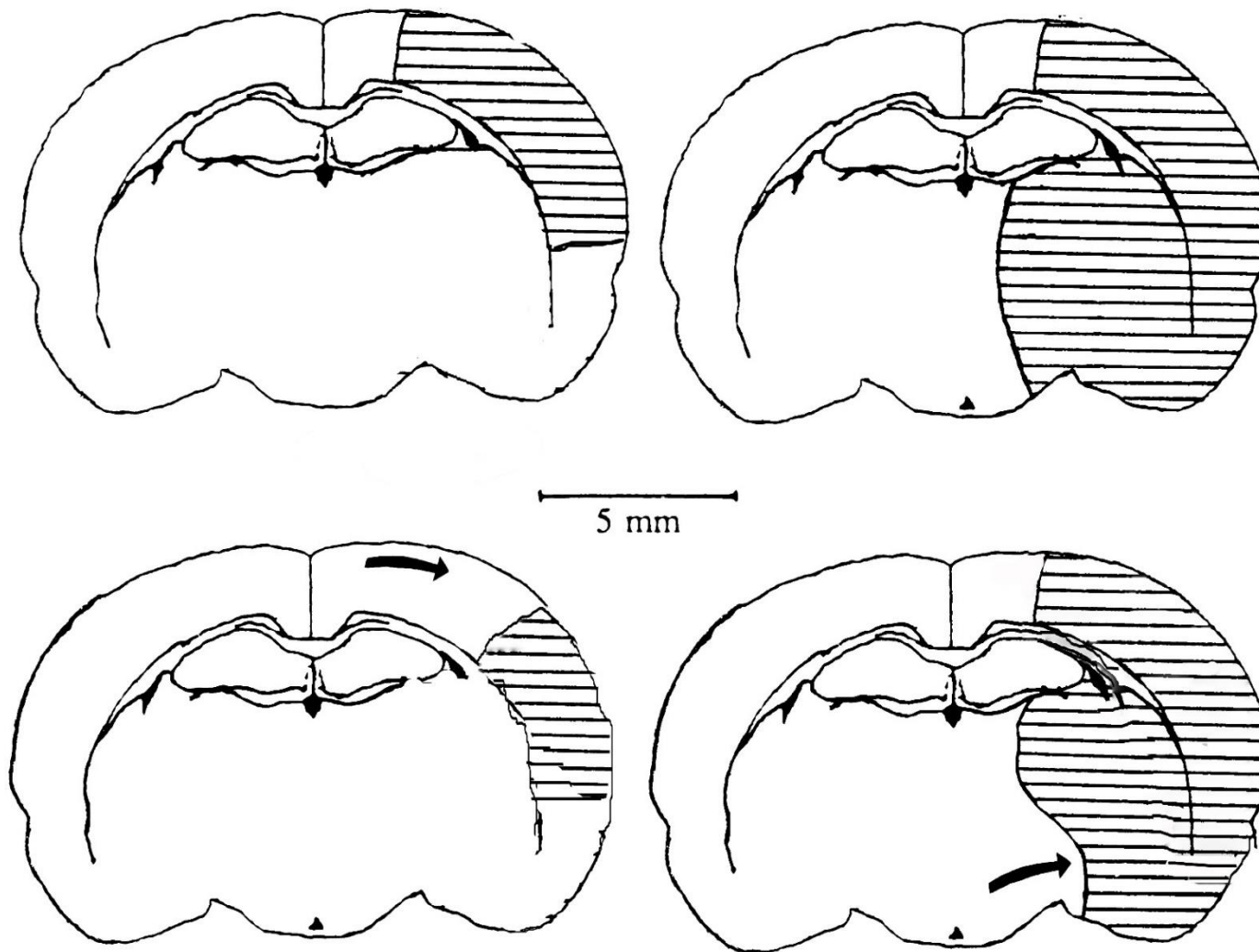
The aim of the present work was to test the hypothesis that early ischemic preconditioning provides effective protection of the brain against ischemic damage via effects on cerebral blood flow. Experiments were performed using male Wistar rats anesthetized with thiopental using two methods to produce ischemia: 1) ligation of the left common carotid and left middle cerebral arteries; 2) endovascular occlusion of the middle cerebral artery for 30 and 60 min. Preconditioning was modeled using two 5-min episodes of bilat-

Кровоснабжение головного мозга крысы



Зона нарушения перфузии в первые минуты и спустя 30 минут после окклюзии СМА

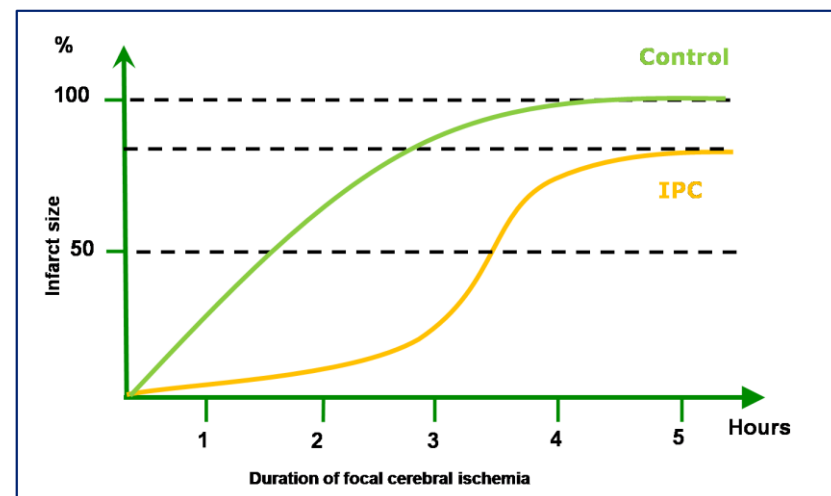
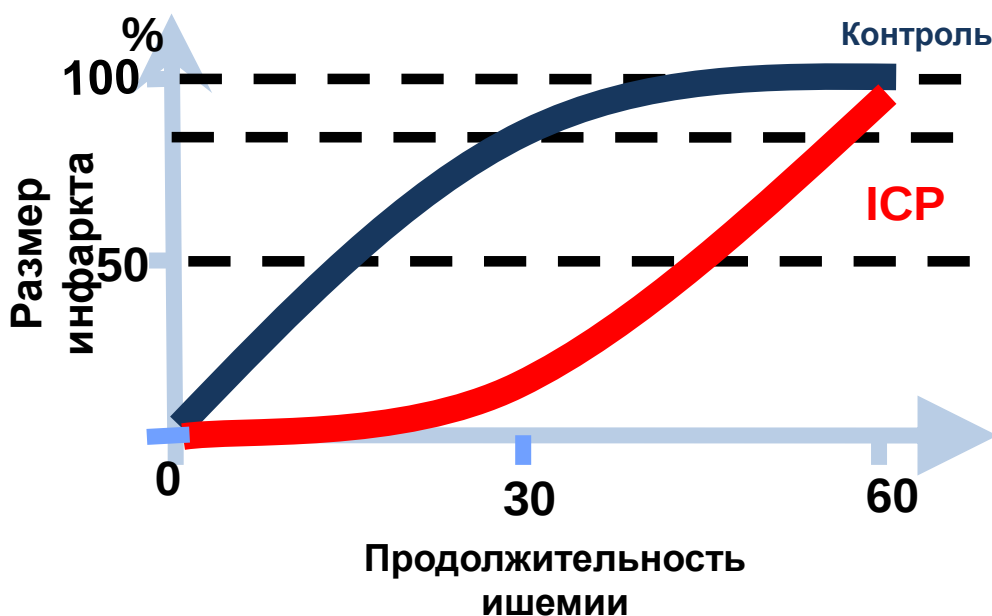




*Модель ишемии мозга крысы
закрывающаяся в перевязке левых
СМА и ОСА*

*Модель филаментной ишемии мозга
крысы (по Коидзуми)*

Инфаркт-лимитирующая эффективность ишемического preconditionирования при различной продолжительности тестовой ишемии сердца и мозга



Блохин И.О., Галагудза М.М. и соавт., 2008 год



Shmonin A.A. Neuroscience and Behavioral Physiology, 2012

Методы оценки неврологического дефицита у крыс после 30-минутной фокальной ишемии мозга на ранних и поздних сроках постишемического периода

Дайнеко А.С.¹, Шмонин А.А.^{1,2}, Шумеева А.В.¹, Коваленко Е.А.¹, Мельникова Е.В.¹, Власов Т.Д.^{1,2}



Целью настоящего исследования являлась изучить неврологический дефицит и сопоставить распространенные стандартные неврологические тесты для определения наиболее оптимального, простого в исполнении и высокочувствительного метода оценки неврологического состояния крысы на ранних и поздних сроках постишемического периода.

Способы оценки неврологического дефицита

- тест - хождение по балке («Ledge Tapered Beam»),
- тест установки позы («Bracing test»),
- угловой тест (Corner test),
- тест с вытягиванием лапы («Placing test»),
- шкала mNSS (Modified Neurological Severity Scores),
- Бедерсон тест (Bederson test)
- шкала Гарсия;

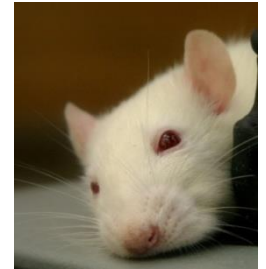


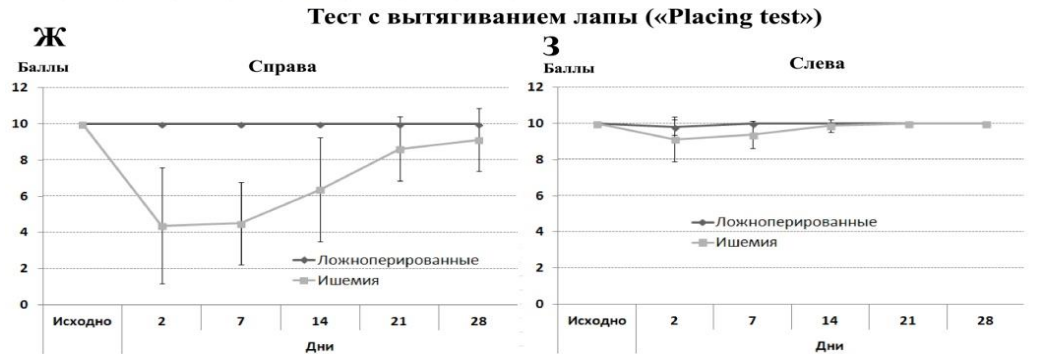
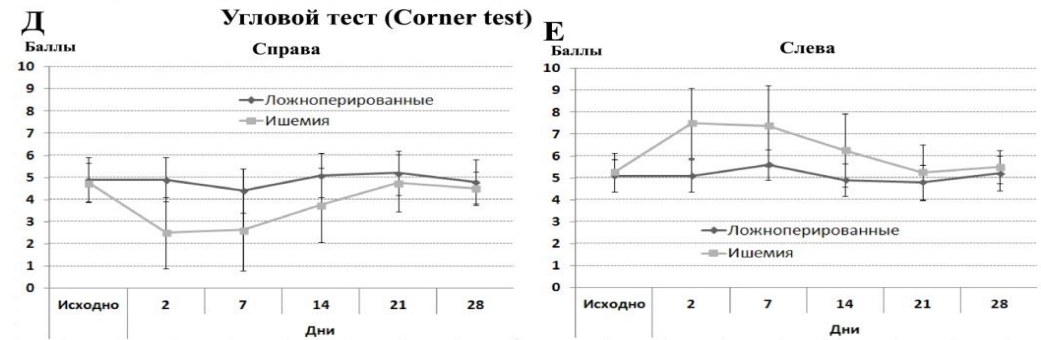
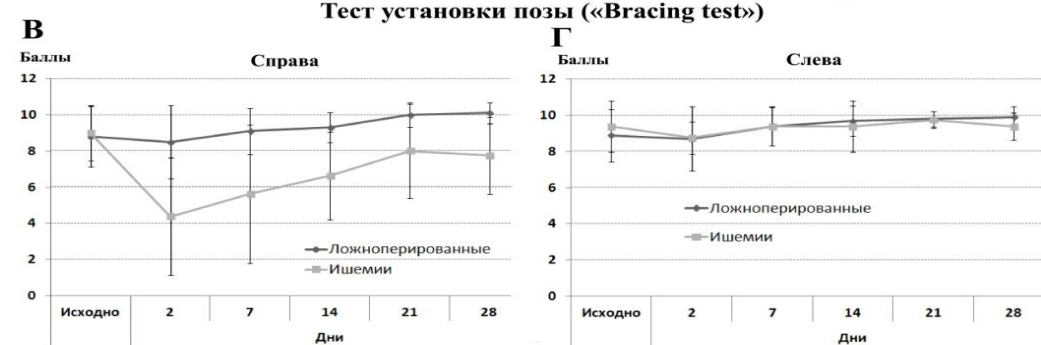
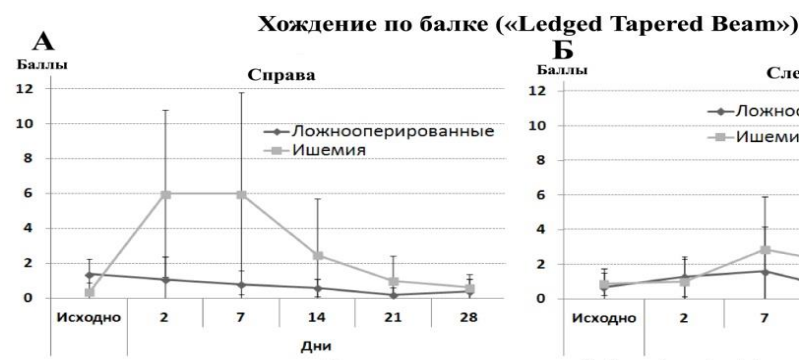
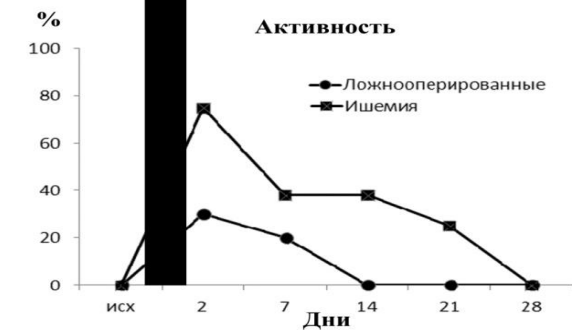
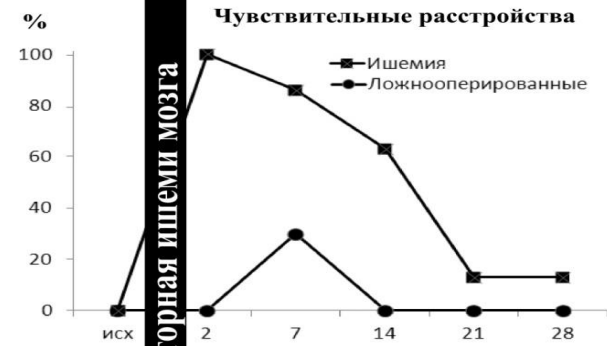
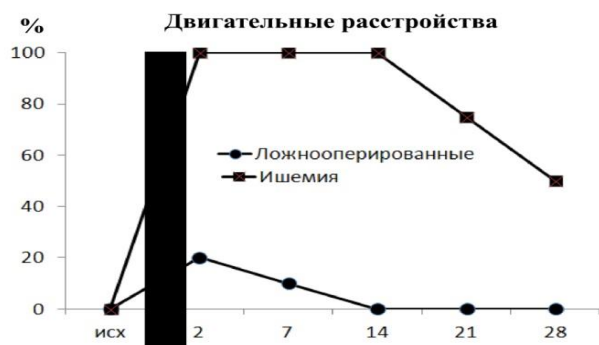
Изучение выраженности неврологического дефицита у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом

Шкала Garcia

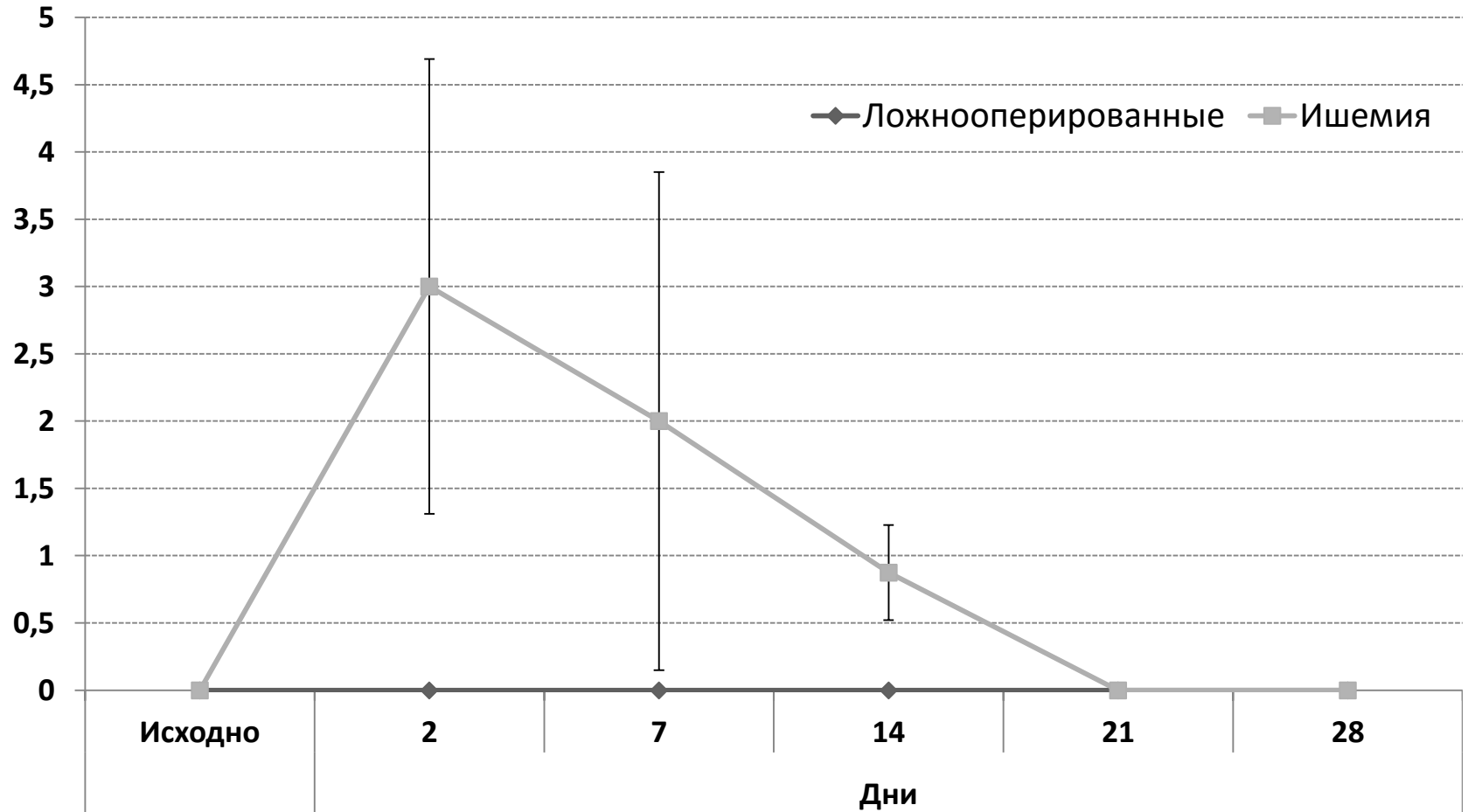
1. Спонтанная активность в клетке за 5 мин
2. Симметричность движений
3. Симметричность вытягивания передних конечностей
4. Способность забираться по стенке проволочной клетки
5. Реакция на прикосновение к каждой стороне туловища
6. Ответ на прикосновение к вибриссам

Максимальный неврологический дефицит – 3 балла, его полное отсутствие – 18 баллов

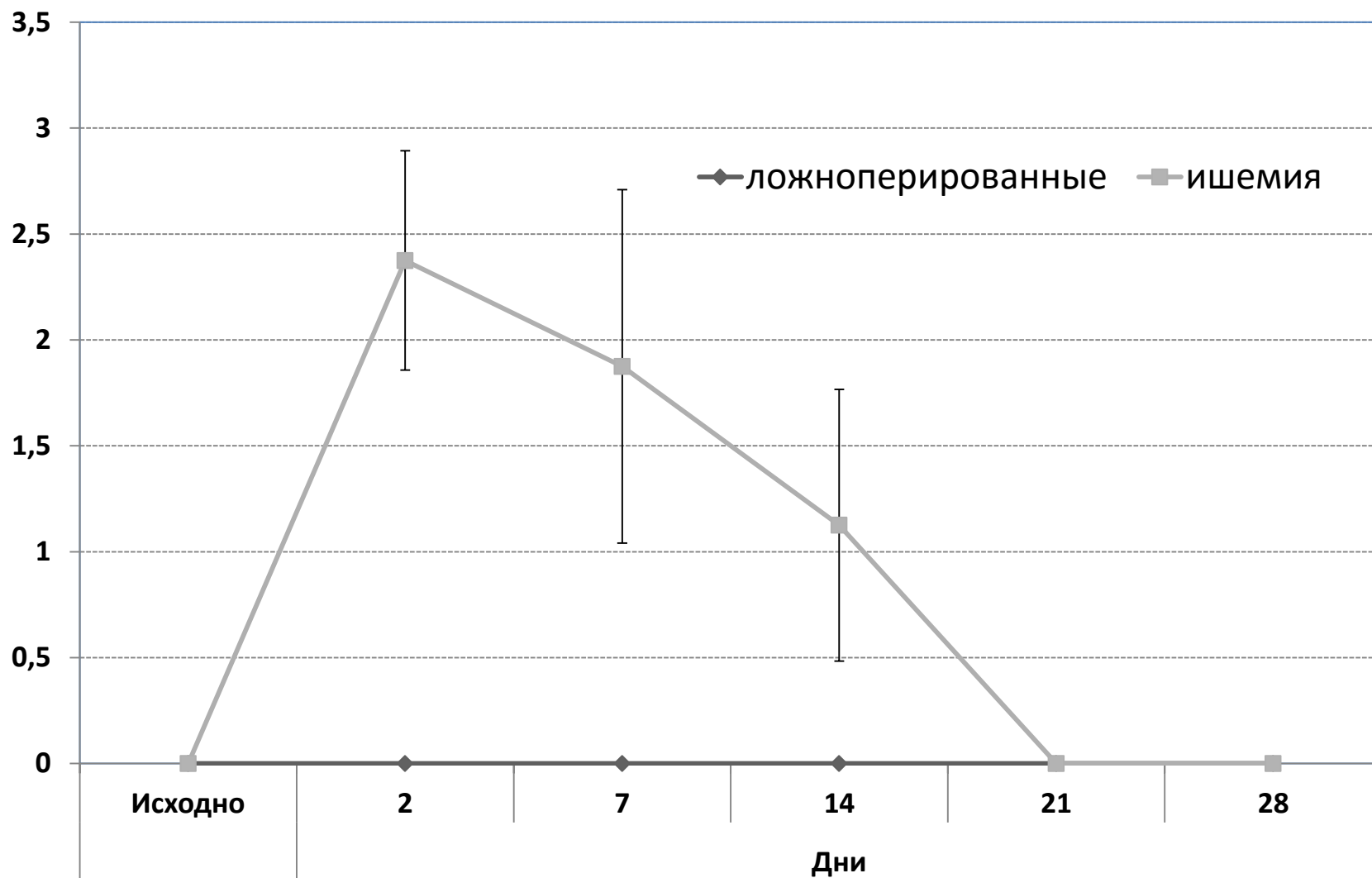




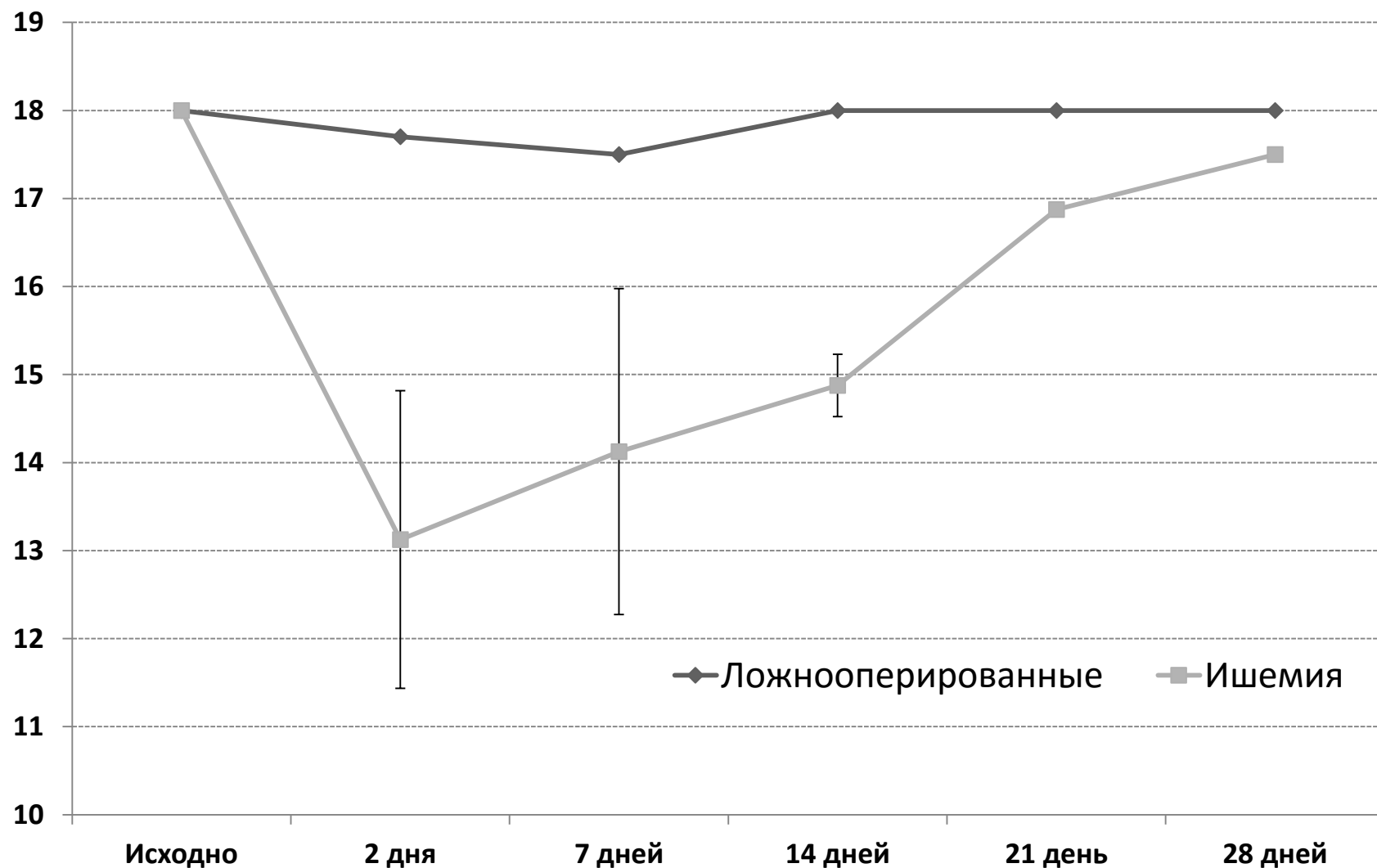
Оценка неврологического дефицита по шкале mNSS в течение 28 дней после 30-минутной окклюзии левой СМА в сравнении с ложнооперированными животными.



Оценка неврологического дефицита по Бедерсон-тесту в течение 28 дней после 30-минутной окклюзии левой СМА по методике Коидзуми в сравнении с ложнооперированными животными.



Оценка неврологического дефицита шкале Гарсия в течение 28 дней после 30-минутной окклюзии левой СМА в сравнении с ложнооперированными животными.



Выводы по методам оценки неврологического дефицита:

- При фокальной транзиторной 30-минутной ишемии головного мозга крысы, развиваются поведенческие нарушения и очаговый неврологический дефицит в виде силовых, чувствительных и координаторных нарушений, а также снижения двигательных нарушений, которые постепенно регрессируют к 28 суткам. То есть данная модель ишемии у крыс позволяет воспроизводить ишемический инсульт с регрессом неврологических симптомов в течение месяца.
- Все предложенные тесты позволяют выявить и количественно оценить неврологический дефицит у крыс. Наиболее чувствительными и репрезентативными оказались шкала Гарсия, тест с вытягиванием лапы («Placing test») и Бедерсон тест (Bederson test).
- Требуется разработка специфичных для крыс тестов для оценки неврологического дефицита, основанных на видовых особенностях используемых лабораторных животных и обладающих высокой чувствительностью.

Электрофизиологический метод оценки повреждения мозга при ишемии

Слуховые вызванные потенциалы - метод исследования электрической реакции мозга и нервной системы в целом на слуховые раздражители, позволяющий оценить сохранность структур слухового анализатора на различных уровнях (от слухового нерва до слуховой коры)



Объективный метод оценки сохранности слуховой функции - регистрация коротколатентных слуховых вызванных потенциалов

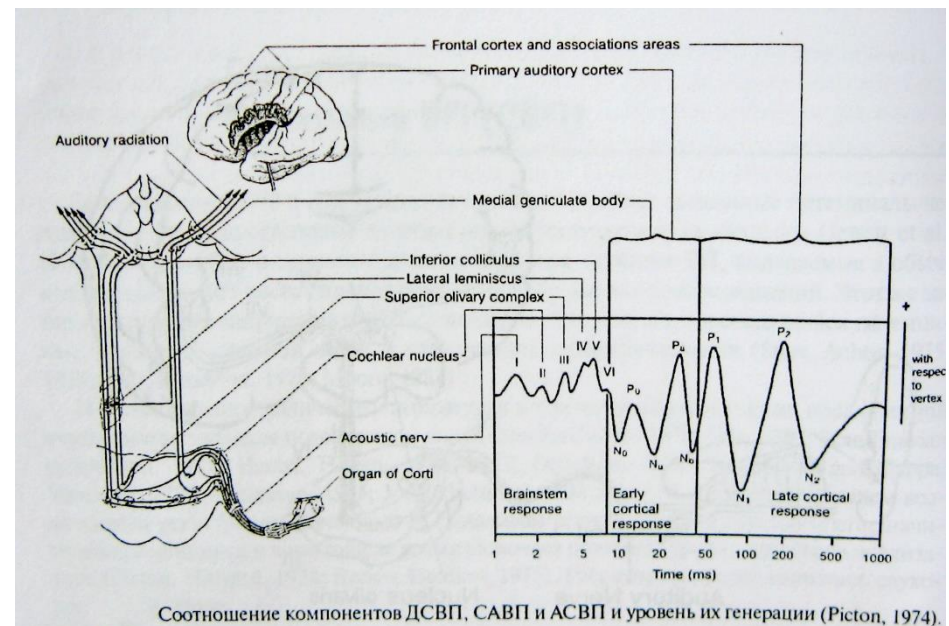
(«Нейро-аудио», ПО «Нейрософт», г. Иваново).

Датчики, устанавливались: лоб, vertex, заушные области с двух сторон.

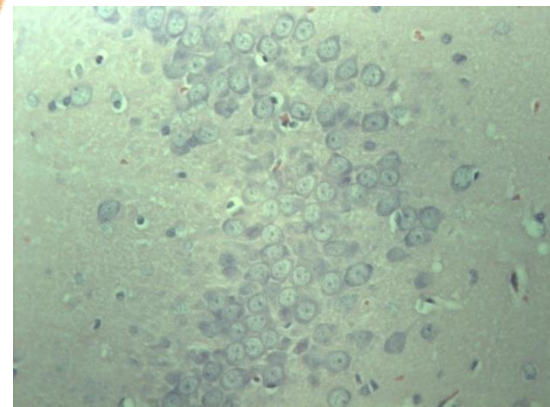
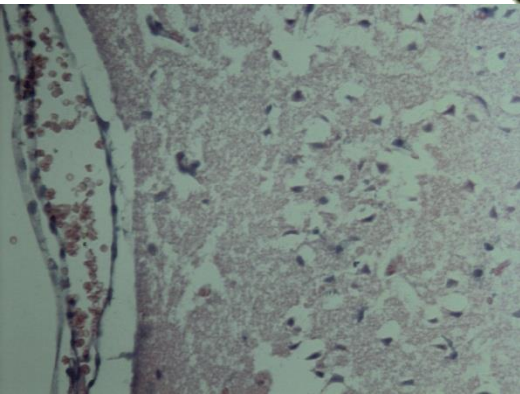
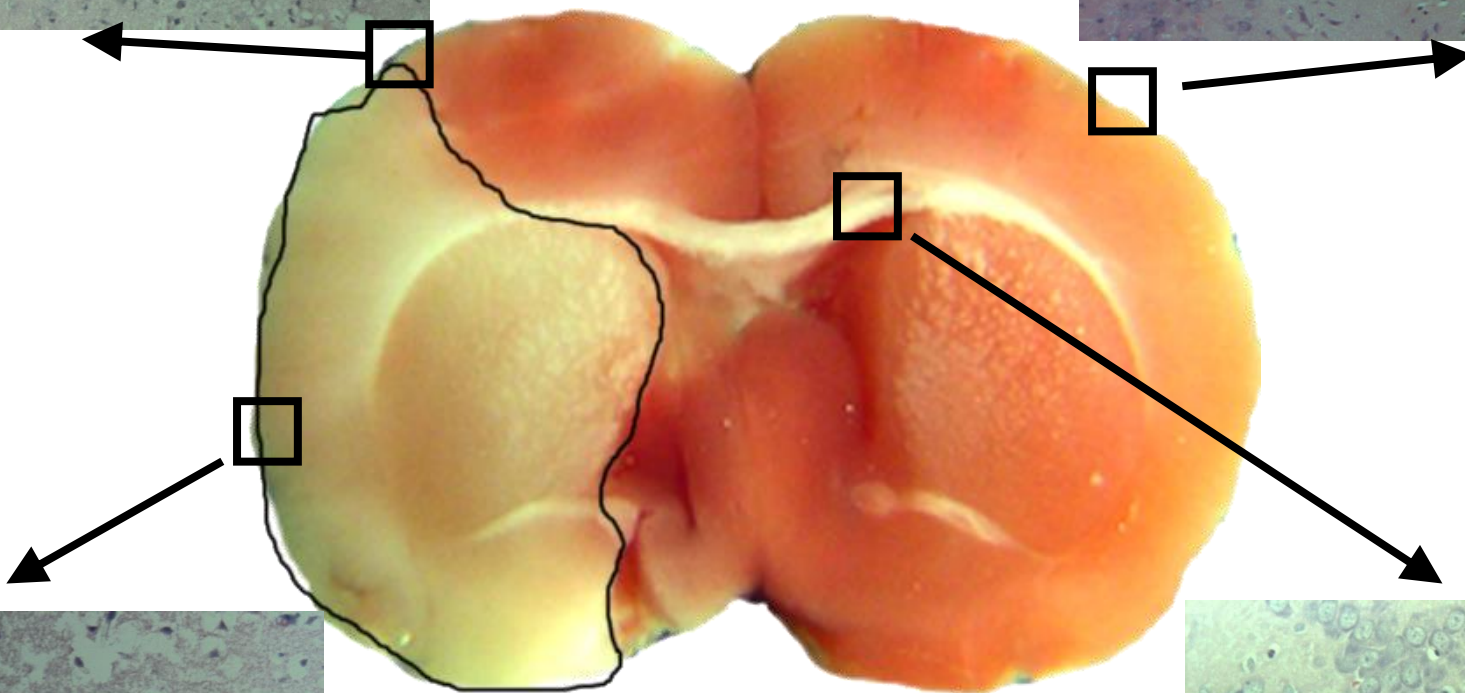
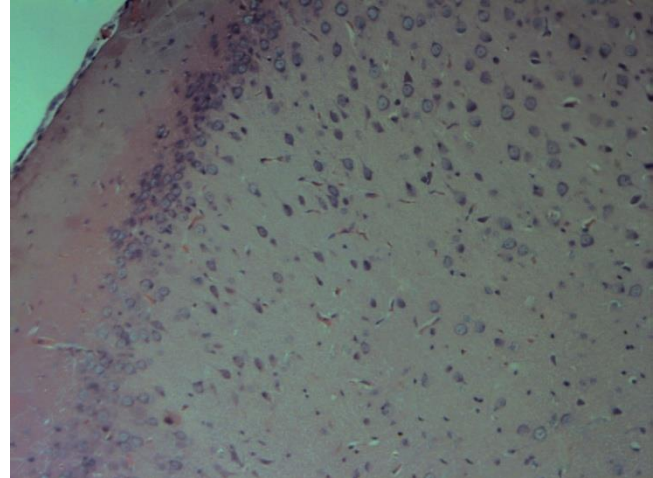
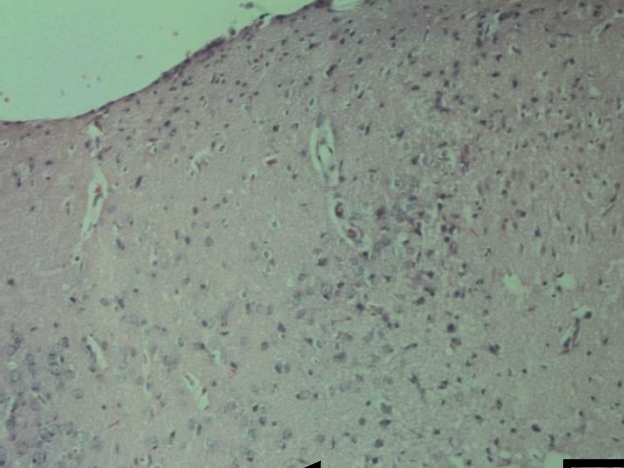
Исследования проводили при подаче стимула (щелчки) интенсивностью 30, 50, 70 dB, отдельно на правое, левое и на оба уха.

Оценивались следующие показатели:

- Общий вид графика;
- Интервалы;
- Амплитуда;
- Соотношение амплитуд;
- Латентность (расстояние от щелчка до пика).

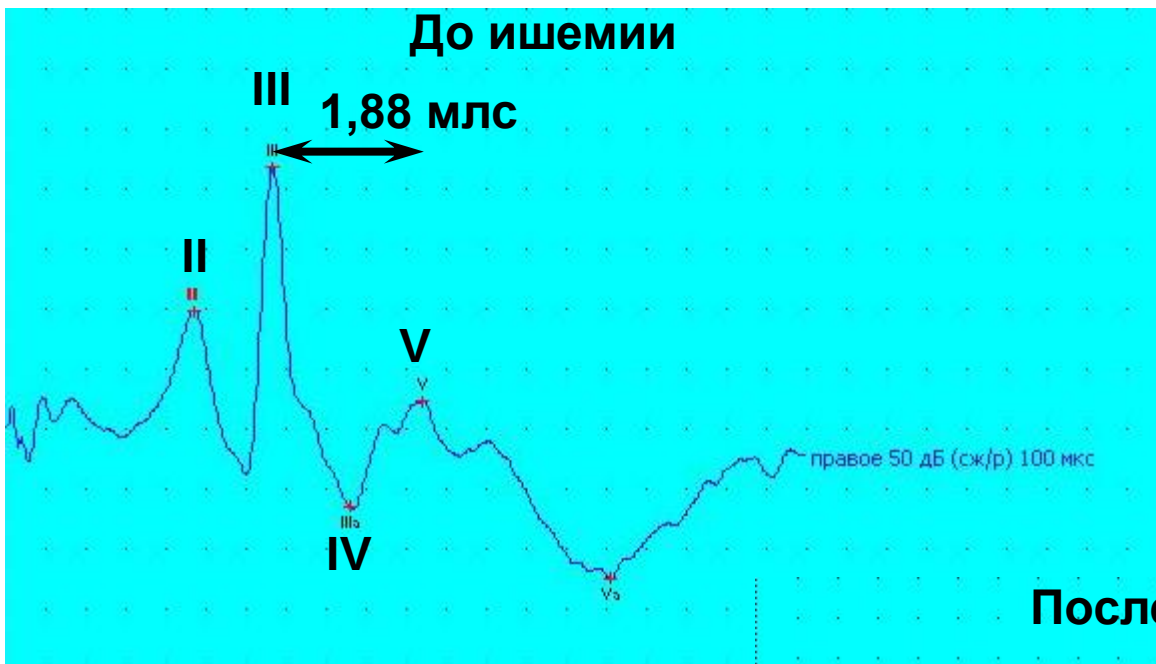


4



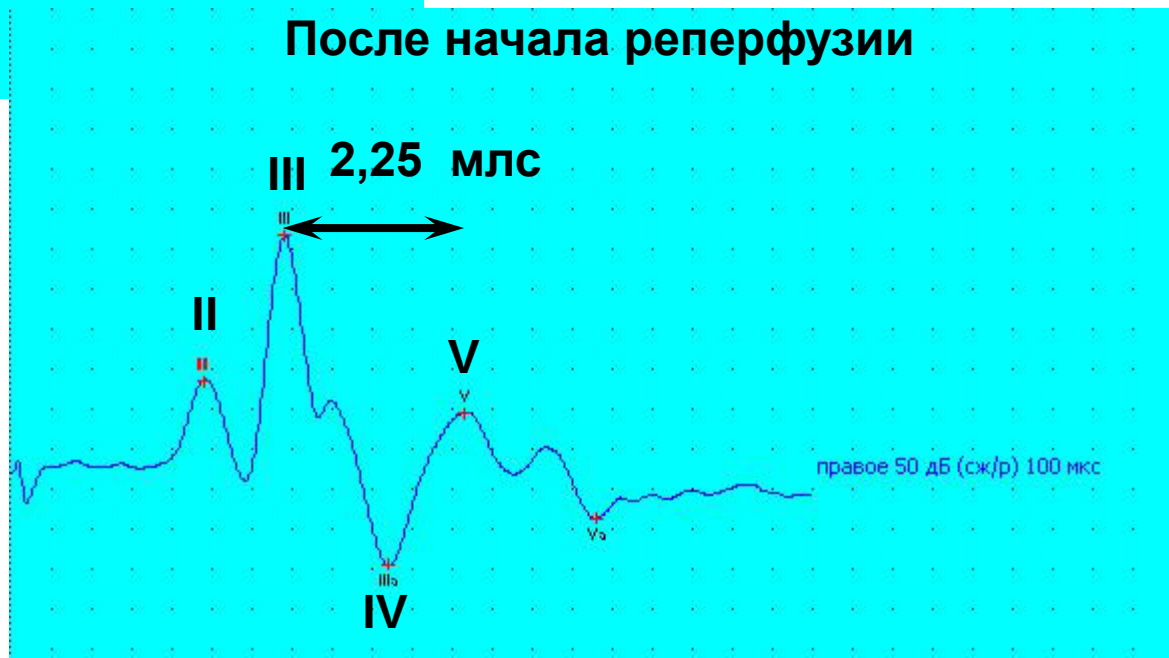
4

При ишемии в бассейне ЛСМА при стимуляции правого уха увеличивается интервал III – V



Интенсивность стимуляции: 50 dB

Данный показатель отражает асимметрию в проведении афферентного импульса от стволовых структур к подкорковым ядрам головного мозга.





Research

Characteristics of cerebral ischemia in major rat stroke models of middle cerebral artery ligation through craniectomy

Alexey Shmonin^{1,2}, Elena Melnikova², Michael Galagudza^{1,3*}, and Timur Vlasov^{1,3}

Background The refinement of experimental stroke models is important for further development of neuroprotective interventions.

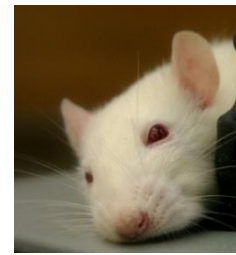
Aims and/or hypothesis Our goal was to study the reproducibility of outcomes obtained in five rat models of middle cerebral artery (MCA) ligation in order to identify the optimal model for the preclinical studies.

Introduction

Stroke is a major health problem in the industrialized countries. In the United States, over 795 000 people experience either new or recurrent stroke annually, which accounts for 16.7% of cardiovascular mortality (1). This statistics implies an urgent need

Целью настоящей работы являлось сравнить модификации моделей фокальной ишемии, вызванной перевязкой СМА.

Модели ишемии мозга связанные с окклюзией СМА и сонных артерий



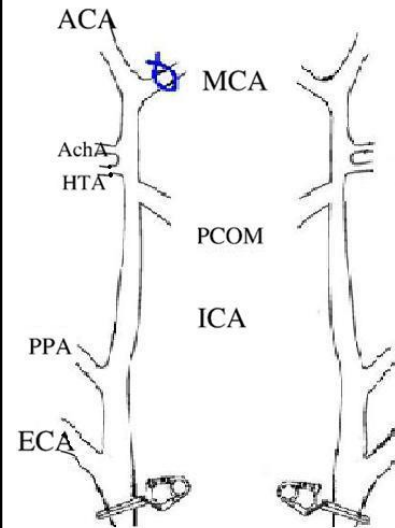
**Пережатие
ЛСМА на 40
минут**



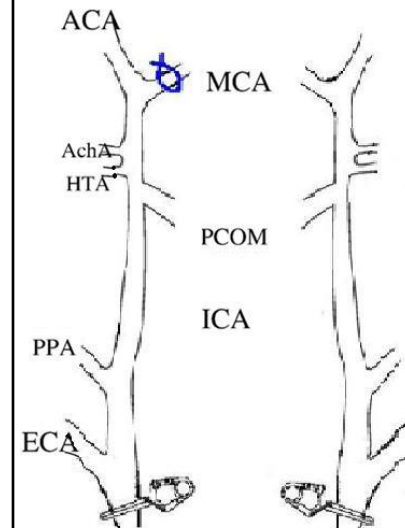
**Перевязка
ЛСМА без
реперфузии**



**Перевязка
ЛСМА и
ЛОСА без
реперфузии**



**Перевязка
ЛСМА и обеих
ОСА без
реперфузии**



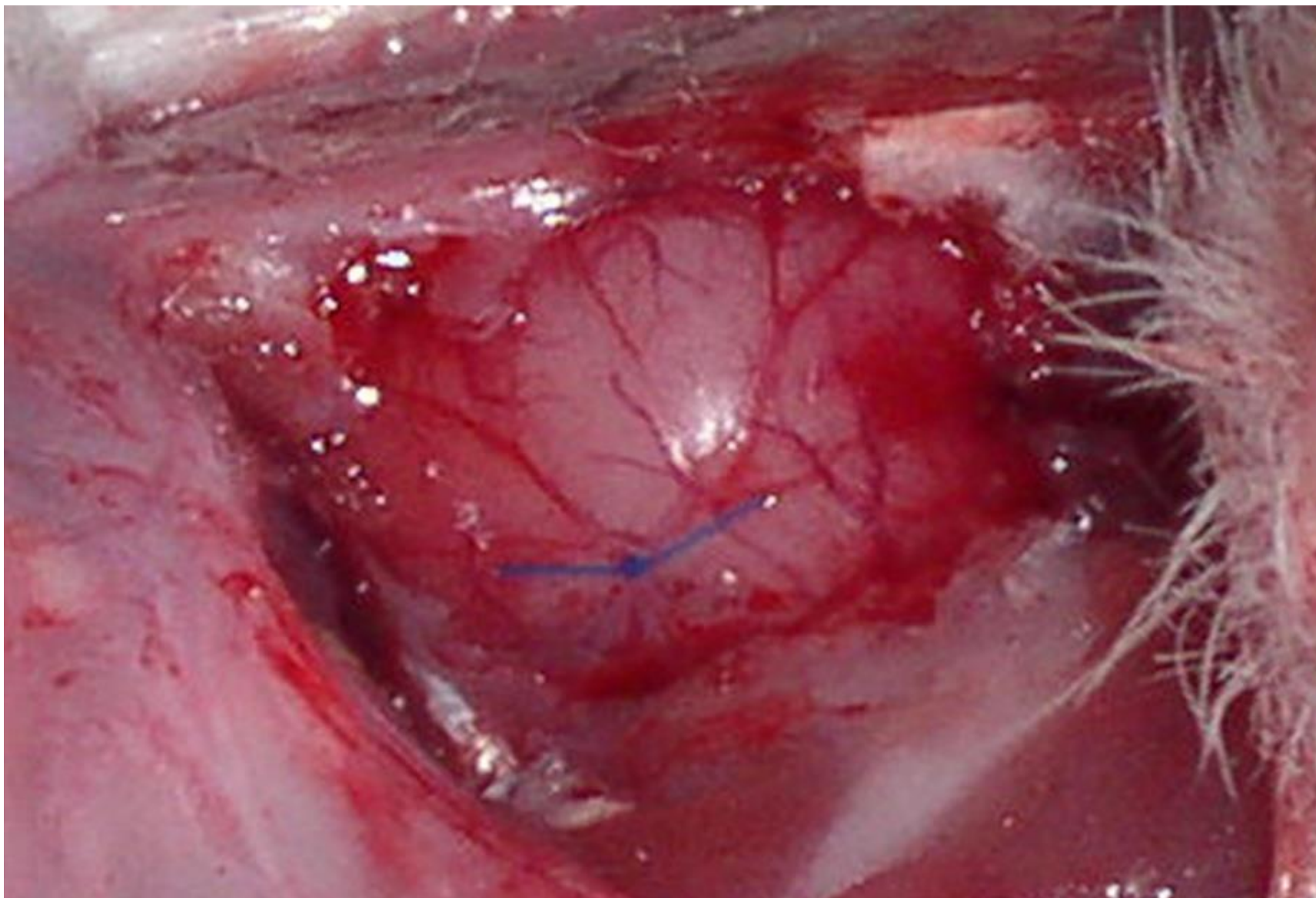
**Перевязка
ЛСМА и
окклюзия обеих
ОСА на 40
минут**

Zhao H. 2006

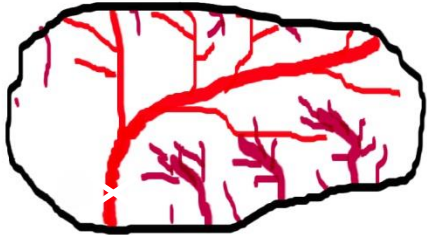
5

Вид через трепанационное отверстие.

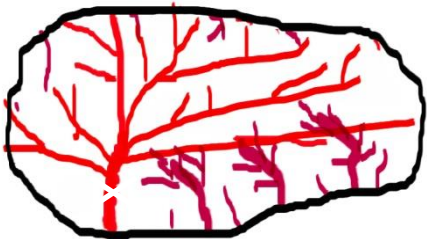
Корковая ветвь левой средней мозговой артерии перевязана



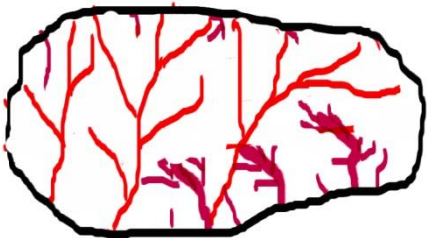
Анатомические варианты ЛСМА (вид через трепанационное окно)



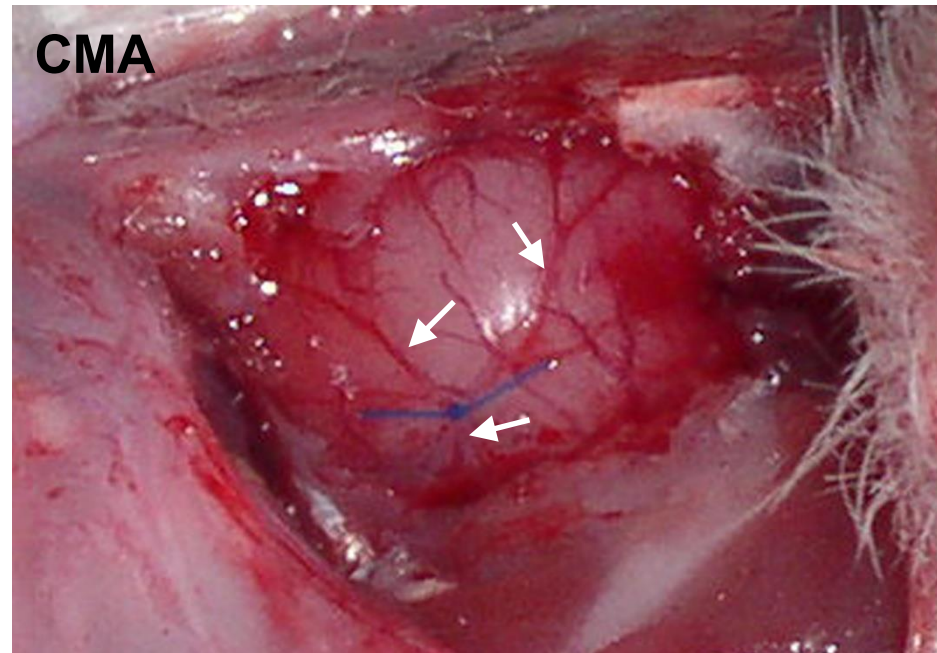
Магистральный
тип (61%)



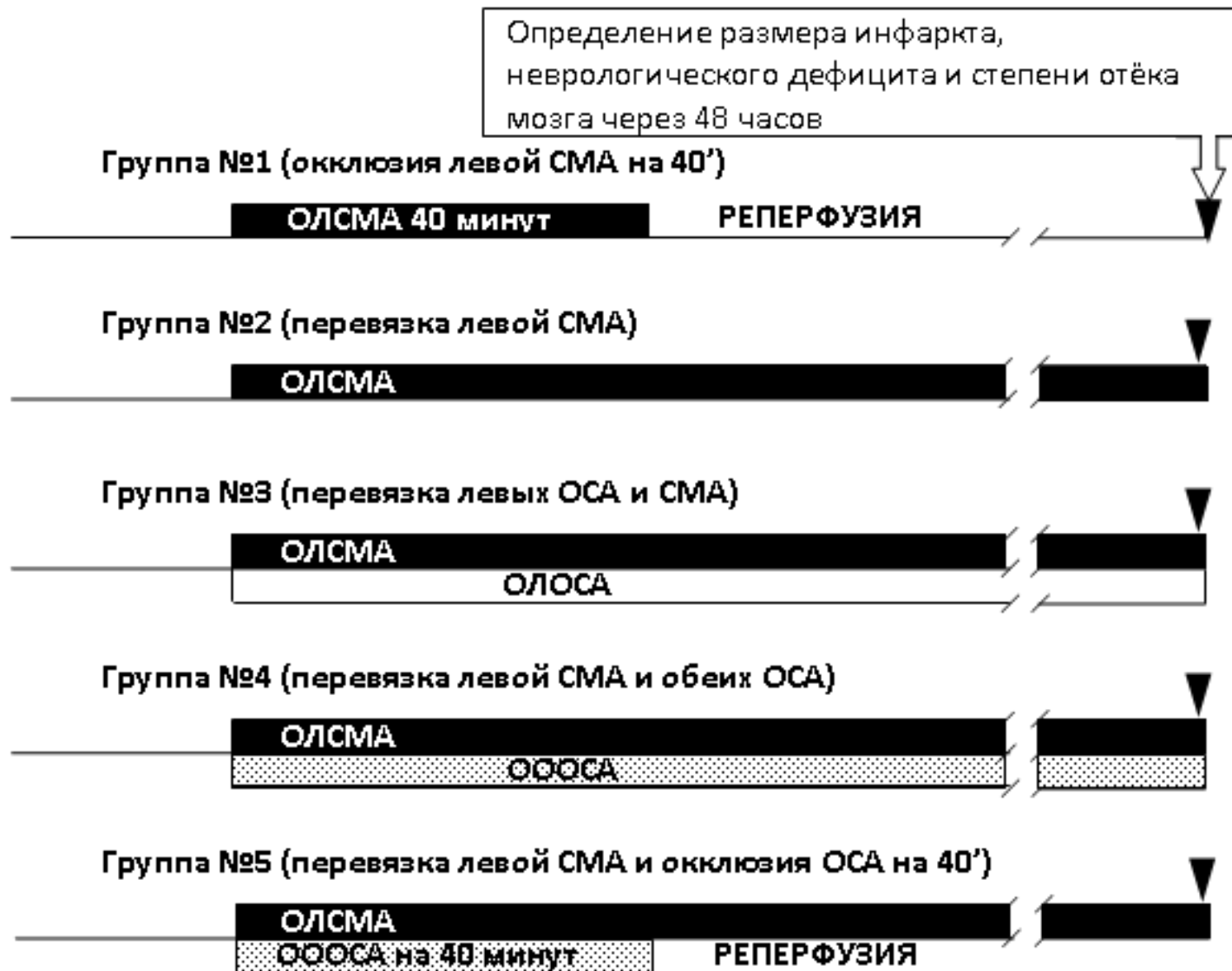
Смешанный
тип (33%)



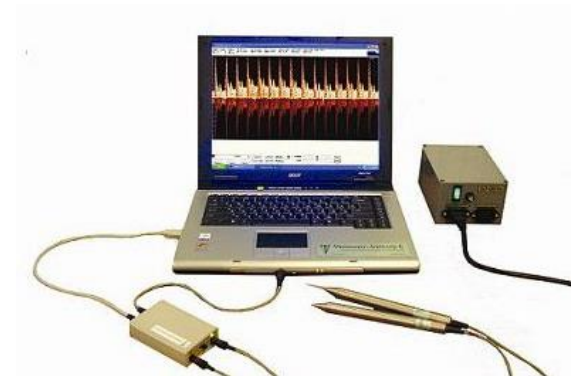
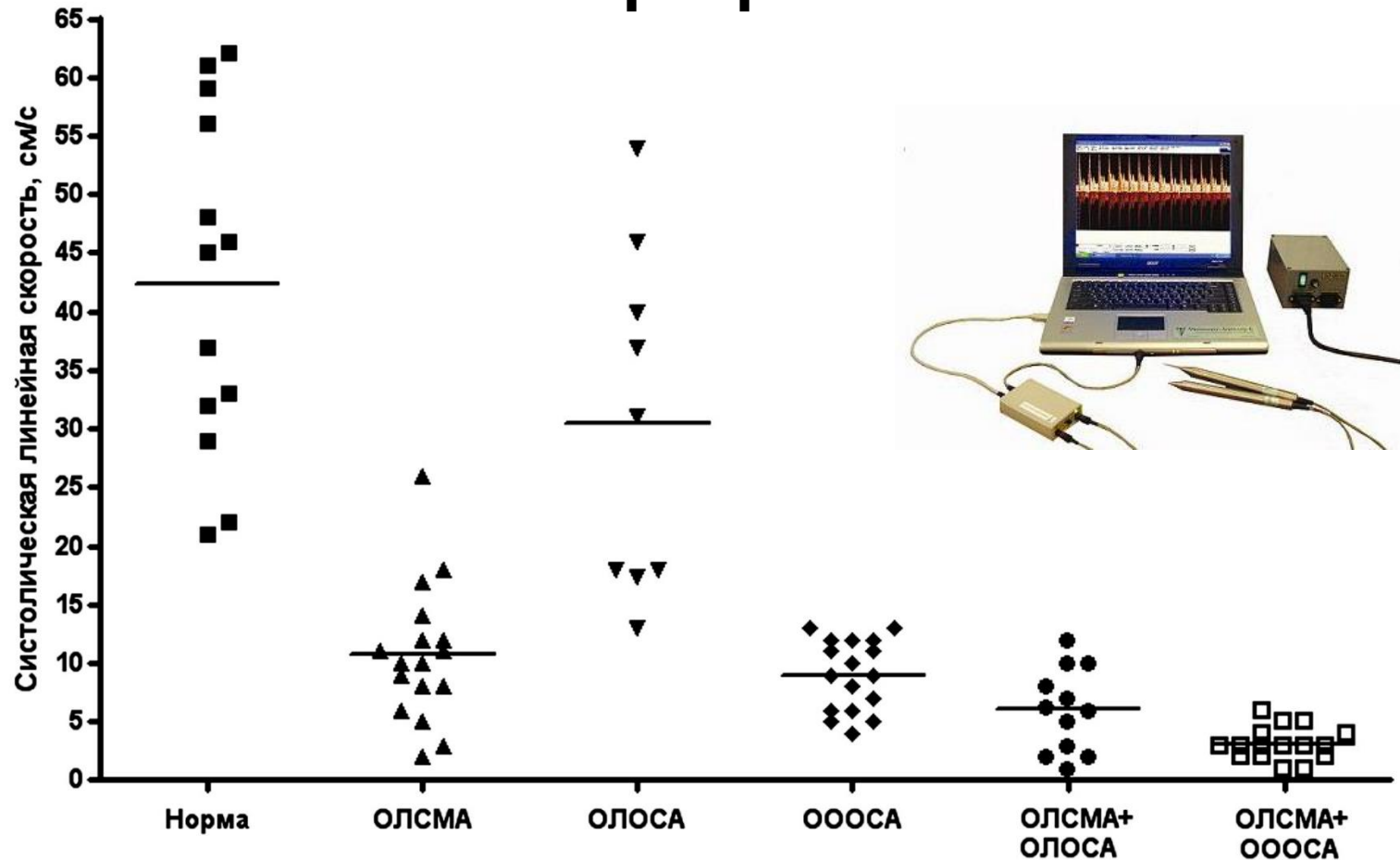
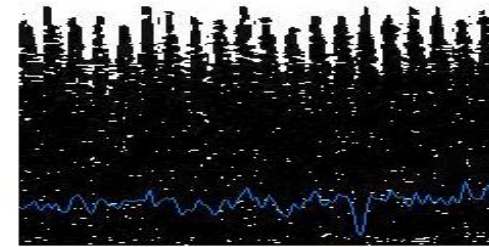
Рассыпной
тип (6%)



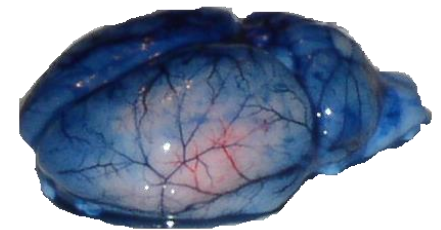
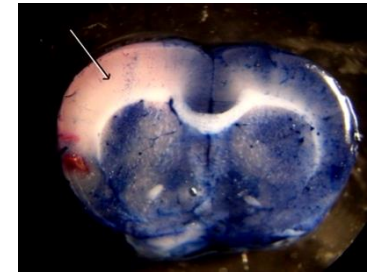
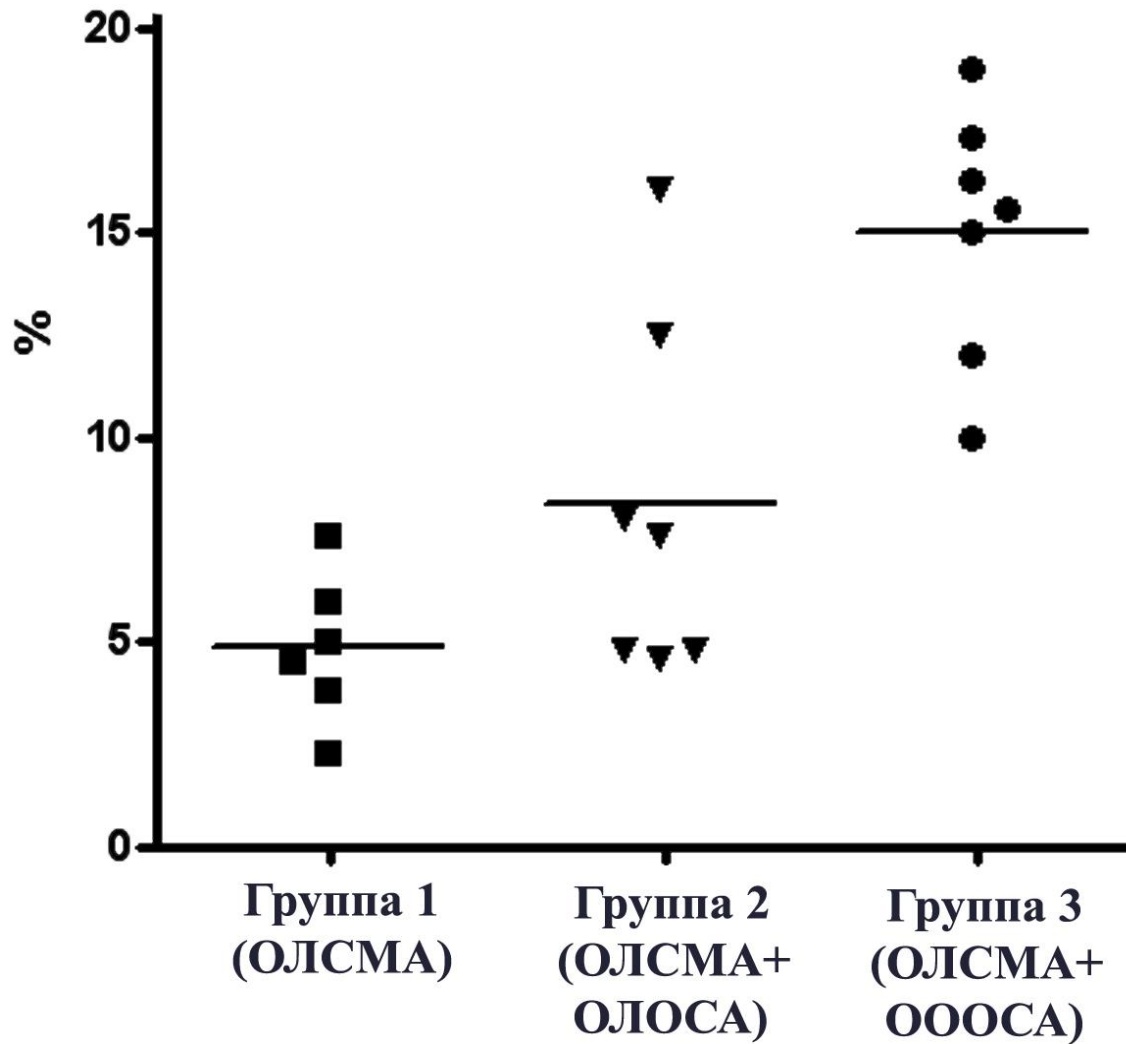
Дизайн исследования



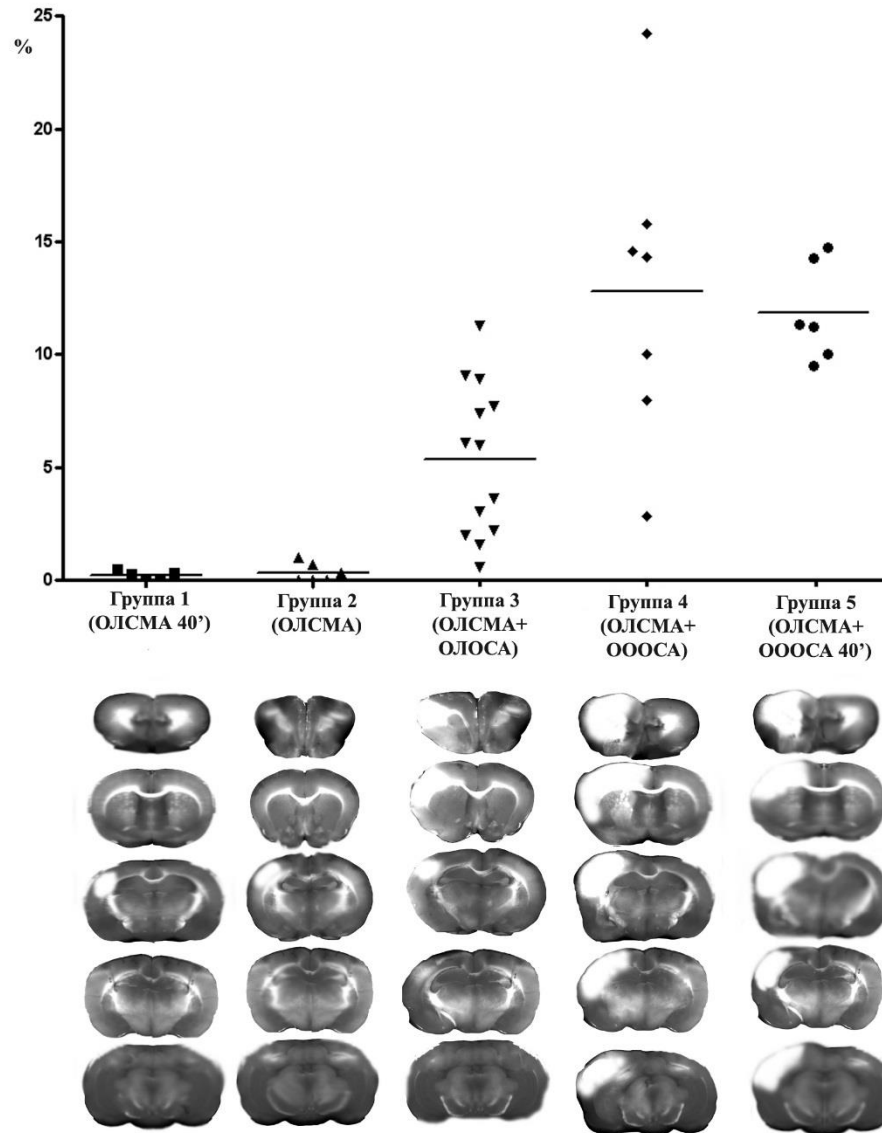
Систолическая линейная скорость в бассейне левой СМА после окклюзии основных артерий.



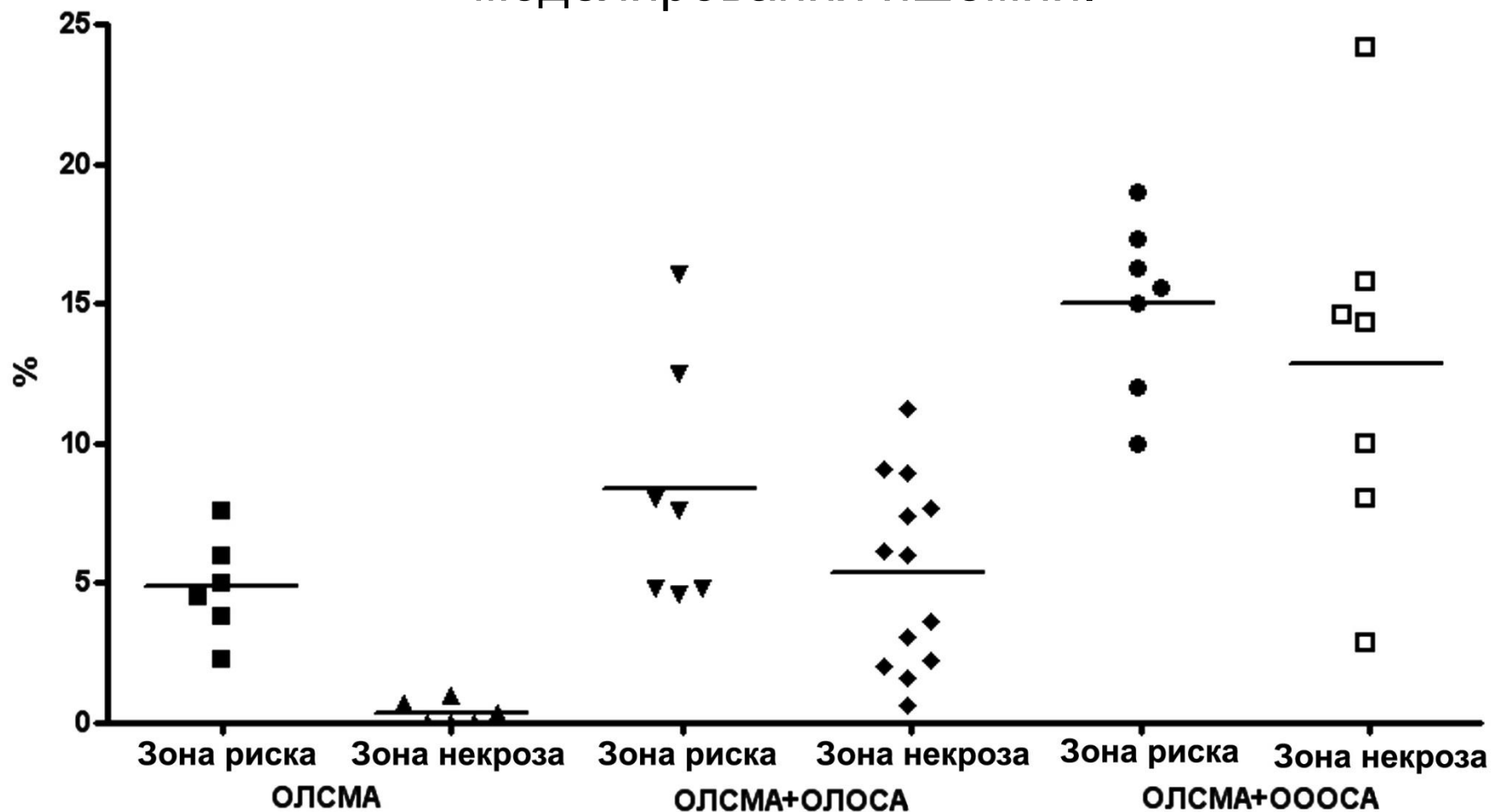
Оценка размера зоны нарушения перфузии («зона риска») во всех группах первого этапа.



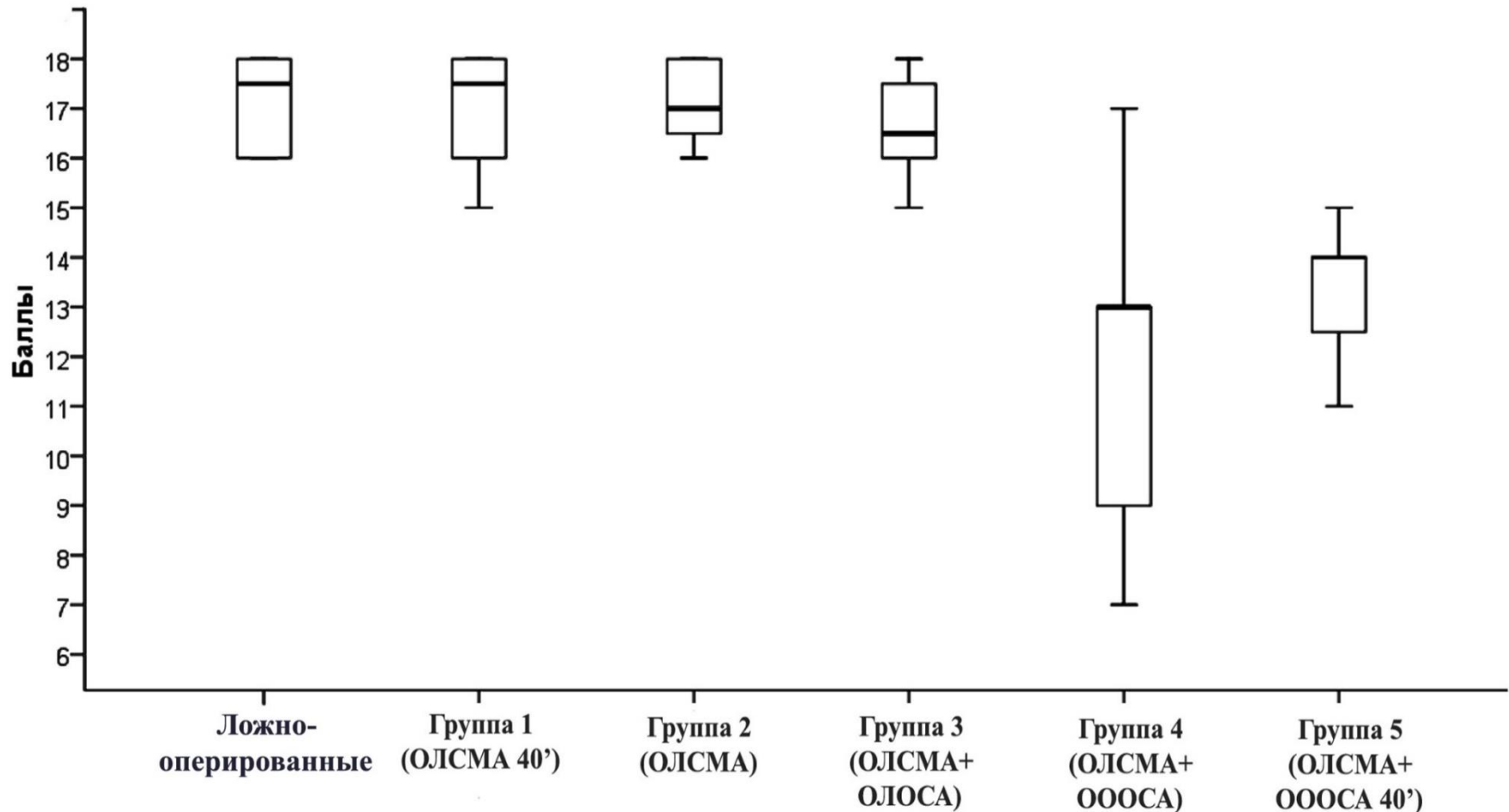
Размер инфаркта во всех группах второго этапа
через 48 часов после моделирования ишемии.



Оценка размера зоны нарушения перфузии («зона риска») во всех группах третьего этапа и сравнение размером некроза через 48 часов после моделирования ишемии.



Оценка неврологического дефицита по шкале Гарсия во всех группах второго этапа через 48 часов после моделирования ишемии.





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 нарушения перфузии с применением окраски синим Эванса.

2. Из всех 5-ти 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.

Экспериментальные исследования

Что нужно менять?

Консенсус



Адекватная доза

- Доказательства того, что препарат достигает мишени
- Соблюдение терапевтического окна
- Использование хорошо изученной адекватной модели инсульта
- слепые рандомизированные исследования с формулировкой критериев включения/исключения, с достаточной выборкой и адекватным числом оценок
- Одновременная оценка морфологических и функциональных исходов в остром и в отдаленном периодах
- Отсроченная оценка (недели-месяцы)



консенсус

- Эффективность должна быть исследована вначале на молодых здоровых животных-самцах с использованием перманентной ишемии
- Вначале исследования проводятся в отношении ствола и белого вещества, далее в отношении серого
- Проявившие эффективность препараты проверяют дополнительно в сериях с самками, пожилыми животными, животными с коморбидными состояниями (гипертензия, диабет, гиперхолестеринемия)
- Использование diffusion/perfusion MRI и сывороточных маркеров повреждения
- Проверка взаимодействия с наиболее часто используемыми препаратами базовой терапии
- Создание мультицентровых консорциумов



Шмонин А.А.



Мельникова Е.В.



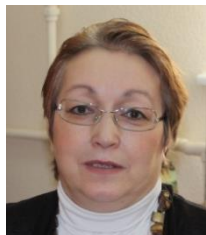
Власов Т.Д.



Мальцева М.Н.



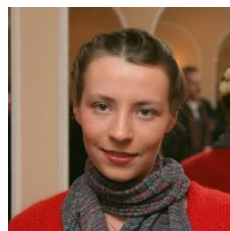
Федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова



Вербицкая Е.В.



Дайнеко А.С.



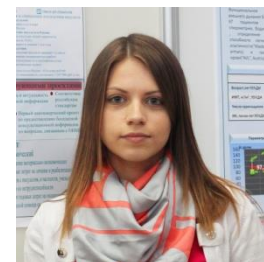
Просвирнина М.С.



Симаненкова А.В.



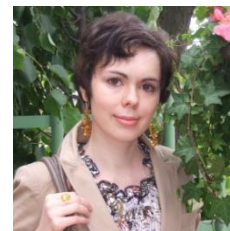
Пономарев Г.В.



Бондарева Е.А.



Первый СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова



Соловьева Л.Н.



Институт экспериментальной
медицины ФМИЦ



Спасибо за внимание

Контакты для связи: langendorff@gmail.com

Шмонин Алексей Андреевич