

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО СОСУДИСТОГО СПАЗМА ПРИ НЕТРАВМАТИЧЕСКОМ СУБАРАХНОИДАЛЬНОМ КРОВОИЗЛИЯНИИ У КРЫС

А.В. Природов<sup>1</sup>, Г.П. Титова<sup>1</sup>, С.С. Дыдыкин<sup>2</sup>, Е.Ю. Бахарев<sup>1</sup>, О.О. Кочеткова<sup>1</sup>, И.А. Усов<sup>2</sup>, В.В. Крылов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, <sup>2</sup> Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

**Цель.** Разработка методики воспроизведения сосудистого спазма при нетравматических субарахноидальных кровоизлияниях *in vivo* на модели лабораторной белой крысы для оценки морфологических изменений сосудов головного мозга крысы в динамике. Сравнение спазмогенного эффекта венозной и артериальной аутокрови.

**Материалы и методы.** Исследование было выполнено на 18 беспородных белых крысах массой 180–220 г. Всем животным осуществляли двукратное введение венозной и артериальной аутокрови в затылочную цистерну. Оценку неврологического статуса животных проводили ежедневно в течение всего эксперимента. Для морфологического исследования мозг забирали на 3-и, 4-е, 5-е, 6-е и 7-е сутки. Оценку микропрепаратов проводили на уровне верхней трети базиллярной артерии. Микропрепараты окрашивали с применением специализированных гистохимических окрасок (по Грамм-Вейгерту, по Лие). Описание микропрепаратов проводили на светооптическом микроскопе Leica DM 1000 при увеличении 400–1000 раз, микрофото съемку выполняли на цифровой камере Leica EC 3.

**Результаты.** Были выявлены прямые качественные признаки сосудистого спазма в виде уменьшения диаметра просвета базиллярной артерии, утолщения стенки сосуда, сморщивания внутренней эластической мембраны, гиперконтрактурных изменений гладкомышечных клеток. Сосудистый спазм выявлялся с 4-х суток от введения крови, с максимальной выраженностью на 5-е сутки и признаками разрешения на 6–7-е сутки. В головном мозге на уровне моста выявлены нарушения капиллярного кровотока, которые могут являться прямым признаком ишемии вследствие перенесенного спазма. Разницы между спазмогенным эффектом венозной и артериальной крови выявлено не было.

**Заключение.** Предложенная модель введения аутокрови в затылочную цистерну крысы является адекватной для дальнейшего изучения сосудистого спазма, методов его профилактики и лечения при нетравматических субарахноидальных кровоизлияниях.

**Ключевые слова:** нетравматическое субарахноидальное кровоизлияние, сосудистый спазм, экспериментальная биологическая модель, белая крыса.

**Objective.** To study the morphological changes in basilar artery and brain tissues during experimental non-traumatic subarachnoid haemorrhage using laboratory white rat as well as to compare the spasmogenic effect of venous and arterial autologous blood.

**Materials and methods.** The study was performed using 18 laboratory white rat weighing 180–220 g. Venous and arterial autologous blood was injected in cisterna magna twice. Neurological assessment of the animals was performed daily. Brain for morphological study was taken out at the 3rd, 4th, 5th, 6th and 7th day. Microscopy assessment was performed at the level of the upper third of the basilar artery using special histochemical stains (by Gram-Weigert, by Lie). Slide description was performed at the light microscope Leica DM 1000 with an increase of 400–1000 times, photomicrography was performed using digital camera Leica EC 3.

**Results.** The direct qualitative evidences of cerebral vasospasm (reduction in luminal diameter of the basilar artery, thickening of the vessel wall, internal elastic membrane wrinkling, hypercontractive changes of smooth muscle cells) were identified. Vasospasm was detected on the 4th day, with maximum expression at day 5 and regression by 6–7 day. The direct indicators of brain ischemia in the form of capillary blood flow violations were identified at the pons level. There was no difference in spasmogenic effect comparing venous and arterial blood.

**Conclusion.** The suggested model of autologous blood injection in cisterna magna of the rat is adequate and appropriate for further study of the cerebral vasospasm after nontraumatic subarachnoid haemorrhage as well as for investigation of the methods for cerebral vasospasm prevention and treatment.

**Key words:** nontraumatic subarachnoid haemorrhage, cerebral vasospasm, *in vivo* rat model.

Проблема церебрального сосудистого спазма (СС) вследствие нетравматического субарахноидального кровоизлияния (САК) из разорвавшейся артериальной аневризмы (АА) сосудов головного мозга остается одной из наиболее сложных в нейрохирургии. Несмотря на прицельное изучение СС, уже более 30 лет пока нет достоверно эффективных способов его профилактики и лечения.

Одной из сложностей в изучении СС является его воспроизведение в эксперименте на животных. Для того чтобы лучше разобраться в механизмах развития спазма, а также апробировать различные способы его профилактики и лечения, часто используют живую экспериментальную модель.

Наиболее распространенными животными для моделирования СС являются обезьяны, соба-

ки и крысы. Перспективными являются модели небольших лабораторных животных, в частности крыс [7, 10, 11, 17–19]. Это связано с рядом причин. Во-первых, характер наблюдаемых изменений у крыс при современных методах оценки в целом схож с таковыми у человека. Во-вторых, широкая доступность и неприхотливость в содержании этих животных позволяют проводить исследования на больших по количеству группах с меньшими экономическими затратами. Модель введения крови в затылочную цистерну крысы является одной из оптимальных для изучения СС при нетравматическом САК [3].

Целью работы явилась разработка методики воспроизведения сосудистого спазма при нетравматических САК *in vivo* на модели лабораторной белой крысы для оценки морфологических изменений сосудов головного мозга крысы в динамике. Сравнение спазмогенного эффекта венозной и артериальной аутокрови.

## Материалы и методы

Эксперимент проведен на 18 беспородных белых крысах массой 180–220 г. В ходе работы изучали влияние венозной и артериальной крови на выраженность и динамику изменений в верхней трети базилярной артерии. Введение крови проводили двухкратно с интервалом 24 ч, при помощи микрокатетера. Установку микрокатетера выполняли за 3 сут до введения крови (чтобы исключить влияние самой манипуляции на эксперимент, позволить животному восстановиться после операционной травмы, исключить тромбоз катетера в раннем послеоперационном периоде). Венозную аутокровь получали путем пункции хвостовой вены. Артериальную кровь получали путем пункции бедренной артерии.

Одно животное было использовано для верификации САК: через 30 минут после введения крови головной мозг был изъят для макроскопической оценки базальных цистерн.

Все животные были разделены на следующие группы:

1-я группа (контроль 1 — 1 особь) — мозг забирали у интактного животного.

2-я группа (контроль 2 — 2 особи) — мозг забирали через 3 сут от установки катетера в затылочную цистерну.

3-я группа (двухкратное введение венозной аутокрови — 5 особей) — на 1-й и 2-й день эксперимента (с интервалом 24 ч) животному вводили 0,25 и 0,2 мл свежей аутокрови соответственно. Мозг для морфологического исследования забирали на 3-й, 4-й, 5-й, 6-й и 7-й день после первого введения крови.

4-я группа (двукратное введение артериальной аутокрови — 5 особей) — на 1-й и 2-й день эксперимента (с интервалом 24 ч) животному вводили 0,25 и 0,2 мл свежей аутокрови соответственно. Мозг для морфологического исследования забирали на 3-й, 4-й, 5-й, 6-й и 7-й день после первого введения крови.

4 животных были исключены из эксперимента: у одного животного после первого введения крови мы наблюдали тромбоз катетера, у одного животного катетер мигрировал в мягкие ткани, 2 животных (по одному из групп с введением артериальной и венозной крови) умерли в период 12–24 ч после повторного введения крови. У последних при вскрытии видимых повреждений мозга выявлено не было. Гистологическое исследование этих препаратов не проводили.

У одного животного после повторной пункции бедренной артерии через сутки наблюдали образование обширной подкожной гематомы. При пункции хвостовой вены осложнений не наблюдали ни в одном случае.

### 1. Анестезия

Обезболивание животных осуществляли по следующей методике:

Крысу помещали в замкнутую емкость, на дне которой уложена гигроскопичная вата, пропитанная диэтиловым эфиром. Через 1–2 мин крыса засыпала. После этого выполняли премедикацию для потенцирования основного наркоза: внутримышечно в область бедра инсулиновым шприцем вводили следующие препараты: дроперидол — 0,3 мг/кг массы тела (0,03 мл 0,25% раствора), димедрол 1,2 мг/кг массы тела (0,03 мл 1% раствора), атропин — 0,012 мг/кг массы тела (0,03 мл 0,1% раствора). Через 15 мин после премедикации в область бедра другой лапки крысы вводили следующие препараты: «золетил 100» — 24 мг/кг массы тела (0,06 мл раствора), ксилазин — 3,2 мг/кг массы тела (0,04 мл 2% раствора). Как правило, крыса засыпала в течение 5–15 мин. Оценку глубины анестезии проводили по выраженности корнеального рефлекса. При необходимости через 20 мин добавляли 0,02–0,04 мл «золетил 100».

### 2. Техника операции

**Установка катетера в затылочную цистерну.** Животное фиксировали на операционном столе и брили область операции. После обработки кожи растворами антисептиков выполняли срединный разрез от области затылочного возвышения до остистого отростка VI-VII шейного позвонков. Мышцы шеи для снижения кровоточивости и потенцирования наркоза инфильтрировали комбинированным местным анестетиком «Ультракаин ДС 1:200000» (артикаина гидрохлорид 40 мг/мл + эпинефрина гидрохлорид 6 мг/мл) в разведении с физиологическим раствором 1:5. Далее мышцы в месте их прикрепления к черепу отсекали и скелетировали чешую затылочной кости, атлантооципитальную мембрану и дугу I шейного позвонка. Электрическим бором выполняли трепанацию затылочной кости на 2–3 мм кнаружи от средней линии. Через трепанационное окно в затылочную цистерну устанавливали микрокатетер, используемый для эндоваскулярных вмешательств (MagicSTD 1,2 F; Balt Extrusion), который фиксировали к кости узло-

вым швом (рис. 1). Для верификации правильного положения катетера аспирировали 0,02-0,04 мл цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). После этого рану послойно ушивали и перевязывали микрокатетер (рис. 2). При необходимости компенсации кровопотери подкожно вводили смесь 5% раствора глюкозы и 0,9% раствора хлорида натрия объемом до 5-10 мл.

**Техника пункции хвостовой вены.** После наложения венозного жгута и обработки кожи растворами антисептиков методом диафаноскопии определяли расположение хвостовой вены (рис. 3). Далее выполняли ее пункцию предварительно гепаринизированным катетером для периферических внутривенных вливаний (диаметр иглы — 25G) с забором

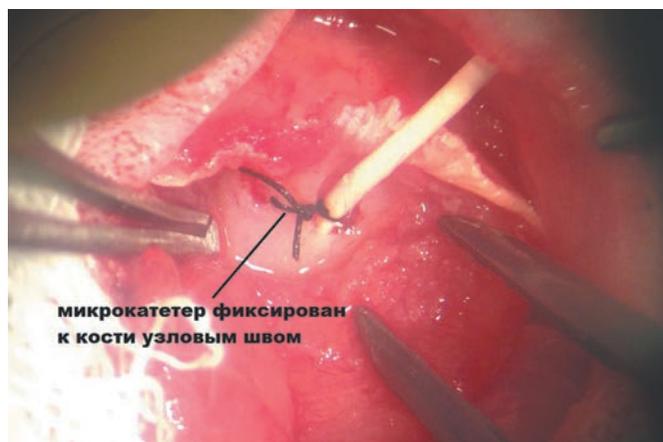


Рис. 1. Операция установки катетера в затылочную цистерну крысы. Вид раны после установки катетера. Мышцы разведены, микрокатетер фиксирован к кости узловым швом (нить — шелк 6/0 USP) через дополнительное фрезевое отверстие (увеличение 8х).

Fig 1. The placement of catheter into cisterna magna of white rat. The wound appearance after insertion of the catheter. The muscles are pulled aside, the microcatheter is attached to the bone by interrupted suture using silk 6/0 USP via additional burr hole (zoom 8x).

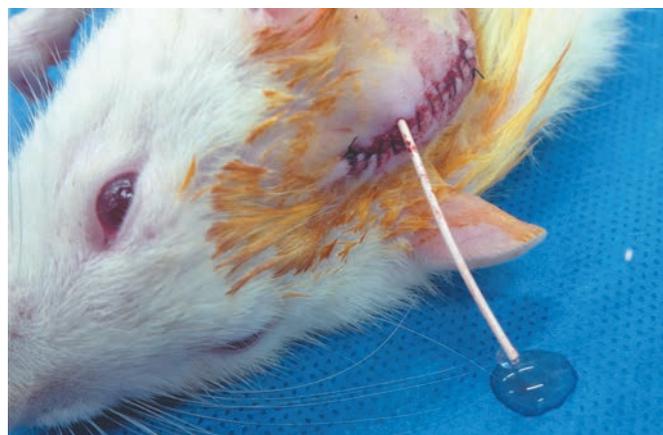


Рис. 2. Операция установки катетера в затылочную цистерну крысы. Вид раны после ушивания. Отмечается пассивное истечение ЦСЖ.

Fig. 2. The placement of catheter into cisterna magna of white rat. The wound appearance after suturing. The passive outflow of cerebrospinal fluid (CSF) is registered.

0,35-0,45 мл свежей крови. После манипуляции место пункции для профилактики кровотечения на 1 ч туго заклеивали медицинским пластырем.

**Техника пункции бедренной артерии.** На внутренней поверхности бедра сбрасывали шерсть и обрабатывали растворами антисептиков область операции. После этого в проекции бедренного сосудисто-нервного пучка выполняли разрез кожи 1—1,5 см, выделяли от паравазальных тканей бедренную артерию (рис. 4). Далее выполняли пункцию предварительно гепаринизированным катетером для периферических внутривенных инъекций (диаметр иглы — 25G) с эвакуацией — 0,35—0,45 мл крови. После гемостаза рану послойно ушивали.

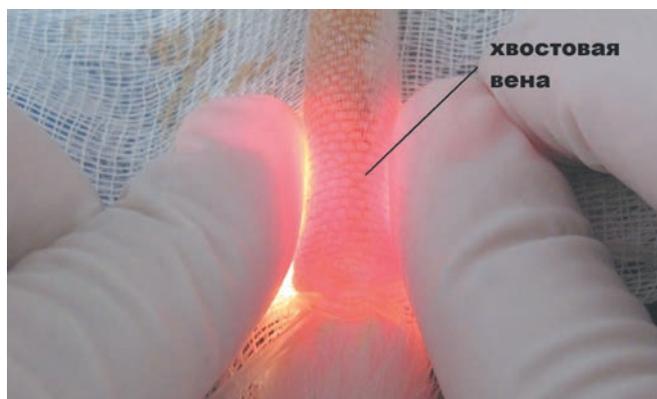


Рис. 3. Операция забора крови из хвостовой вены крысы. Определение места пункции. Ассистент фиксирует хвост животного. При помощи диафаноскопии под кожей контурирует вена.

Fig. 3. The blood sampling from tail vein of rat. The determination of puncture site. The rat's tail is fixed by assistant. The tail vein contours under the skin with the help of diaphanoscopy.



Рис. 4. Операция забора крови из бедренной артерии крысы. Этап пункции бедренной артерии. Исходное положение иглы. Сосуд фиксирован при помощи проведенного ранее турникета.

Fig. 4. The blood sampling from femoral artery of rat. The puncture of femoral artery. The initial position of the needle. The artery is fixed using previously inserted tourniquet.

**Введение крови в затылочную цистерну.** Сразу после забора крови животное укладывали на брюшко с приподнятым на 20-30 градусов хвостовым концом. В асептических условиях срезали перевязанную часть катетера и в течение 5 мин аспирировали 0,1-0,15 мл ЦСЖ. После этого в затылочную цистерну в течение 10 мин вводили 0,25 (0,2) мл крови и снова перевязывали катетер. Для того чтобы большая часть крови скапливалась в области базальных цистерн, животное оставляли на 20 мин с опущенным головным концом.

### 3. Оценка неврологического статуса

Оценку неврологического статуса проводили 1 раз в сутки по модифицированной методике, предложенной J.V. Bederson с соавт. (1986) [5] по 4-балльной шкале:

0 баллов — отсутствие неврологических нарушений.

1 балл — крыса малоподвижна, вяло реагирует на прикосновение. Очаговая неврологическая симптоматика отсутствует.

2 балла — имеется изолированный парез одной конечности (при приподнимании животного за хвост активность движений в одной из конечностей снижена).

3 балла — имеется односторонний гемипарез (при подталкивании животного в бок оно заваливается на пораженную сторону).

4 балла — имеется односторонняя гемиплегия (животное не может активно передвигаться, при движении вперед отмечается выраженное отклонение в пораженную сторону — движение по кругу).

### 4. Морфологическое исследование.

Перед изъятием головного мозга животное усыпляли смесью препаратов «золетил 100» (0,4 мл), ксилазина гидрохлорид (0,3 мл 2% р-ра) и рокурония бромида (0,1 мл 1% р-ра). По имевшемуся разрезу рану вскрывали. После визуализации дистального конца катетера и верификации его положения выполняли декапитацию на уровне III-IV шейного позвонков, вскрывали черепную коробку и, по возможности не травмируя твердую и мягкую мозговую оболочки, извлекали препарат головного мозга вместе с верхнешейным отделом спинного мозга. Далее препарат помещали на 24 ч в 5% р-р формалина и заливали в парафин. Для морфологического исследования использовали срезы на уровне верхней трети базиллярной артерии.

Окраску парафиновых срезов осуществляли следующими способами:

- Обзорная: гематоксилином и эозином,
- Для оценки состояния эластических волокон стенки артерии: по Грамм-Вейгерту (определение морфологического типа стенки базиллярной артерии),
- Для оценки состояния сократительного аппарата гладкомышечных клеток (миофибрилл): по Lie [16].

Описание микропрепаратов проводили на светооптическом микроскопе Leica DM 1000 при увеличении 400-1000 раз, микрофотосъемку выполняли на цифровой камере Leica EC 3.

### Результаты

**Верификация САК.** Для верификации САК через 30 мин после введения аутокрови у животного был изъят мозг (рис. 5) По сравнению с контролем отмечается выраженное распространение крови в базальных цистернах мозга.

**Неврологический статус.** В нашем исследовании мы не наблюдали неврологической симптоматики в виде пареза или паралича конечностей (2 балла и более по шкале J.V. Bederson). У всех животных в течение первых суток от введения крови мы наблюдали нарушение в неврологическом статусе в 1 балл при оценке по шкале J.V. Bederson. У двух животных (одно животное из группы с введением артериальной крови и одно животное из группы с введением венозной крови) неврологический статус в 1 балл наблюдали также на 2-е сутки от повторного введения крови. На 3-и сутки от введения крови неврологические нарушения у всех животных отсутствовали (0 баллов).

У всех животных после операции установки катетера мы наблюдали аналогичные изменения в неврологическом статусе (1 балл по шкале Bederson) в течение первых суток после установки микрокатетера.

#### Морфологическое исследование.

*1-я контрольная группа, 2-я контрольная группа.*

При морфологическом исследовании животного из 1-й контрольной группы (интактное животное) и животных из 2-й контрольной группы 2 (через 3 сут после установки микрокатетера в затылочную цистерну) существенных разли-

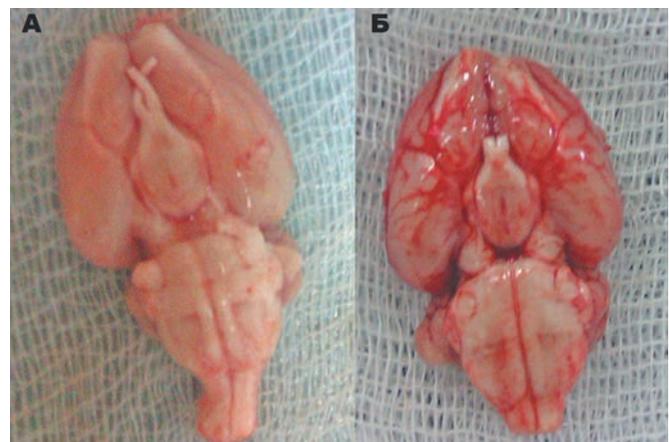


Рис. 5. Верификация САК: А — мозг интактного животного; Б — мозг изъят через 30 мин после введения 0,25 мл аутокрови в затылочную цистерну.

Fig. 5. The verification of SAH: A — the brain of intact animal; B — the brain is taken out in 30 minutes after injection of 0,25 ml of autologous blood into cisterna magna.

чий в строении сосудистой стенки базилярной артерии и прилегающей мозговой ткани мы не наблюдали.

Нормальное строение сосудистой стенки основной артерии у крыс можно охарактеризовать следующим образом: на поперечных срезах артерия имеет широкий округлый просвет, четко прослеживающуюся истонченную интиму с выступающими в просвет овальной или округлой формы ядрами эндотелиоцитов с неразличимой цитоплазмой. Внутренняя эластическая мембрана (ВЭМ) сосуда умеренно и равномерно складчатая, с неглубокими складками и широкими межскладочными промежутками. Внутренний мышечный слой представлен несколькими слоями гладкомышечных клеток (ГМК) с овально-удлиненной формой ядер и слабо базофильной однородной цитоплазмой. При окраске на эластик по Грамм-Вейгерту базилярную артерию можно отнести к сосудам мышечно-эластического типа (что определяет потенциальную возможность артерии отвечать на САК сосудистым спазмом за счет наличия нескольких слоев ГМК)

*3-я и 4-я группы.*

Достоверных различий в морфологических изменениях и их динамике при введении венозной и артериальной крови мы не выявили.

При исследовании верхней трети базилярной артерии у крыс после двукратного введения аутокрови в затылочную цистерну нами были выявлены следующие изменения по сравнению с контрольными группами:

3-и сутки — существенных морфологических изменений по сравнению с контролем мы не наблюдали;

4-е сутки — морфологически прослеживались признаки умеренного сужения просвета сосуда без значительного утолщения стенки основной артерии и изменений ВЭМ. При окрасках по Lie и MSB выявлялись признаки гиперконтрактурных изменений ГМК;

5-е сутки — по сравнению с контрольными препаратами мы отмечали утолщение стенки сосуда, подчеркнутую извитость эластической мембраны с углублением ее складок, сужением межскладочных промежутков, сближением эндотелиоцитов с выступающими в просвет ядрами, ориентированными по верхушкам складок ВЭМ. При гистохимической реакции (окраска по Lie) в цитоплазме ГМК появлялись признаки дистрофических изменений от очаговой до распространенной гидропической дистрофии цитоплазмы в виде перинуклеарной и внутриклеточной вакуолизации, а также признаки внутриклеточной фуксинофилии цитоплазмы, указывающие на гиперконтрактурные изменения сократительных миофибрилл;

6-е и 7-е сутки — морфологически еще отмечалось умеренное сужение просвета сосуда с распространенными дистрофическими изменениями цитоплазмы ГМК, как проявления остаточных признаков нарушения сократительной способности миоцитов при разрешении спазма.

Динамика изменений базилярной артерии представлена на рис. 6—9.

Помимо этого, при гистологическом изучении вещества головного мозга на микропрепаратах (верхние отделы моста) на 5—7-е сутки нами были выявлены признаки снижения капиллярного кровотока, спадения просвета мелких сосудов, периваскулярного отека (рис. 10). В отдельных нейронах были выявлены признаки перинуклеарного отека с гидропической дистрофией цитоплазмы, что может являться косвенными признаками ишемии.

Таким образом, выявленные нами изменения демонстрируют развитие у животных после пов-

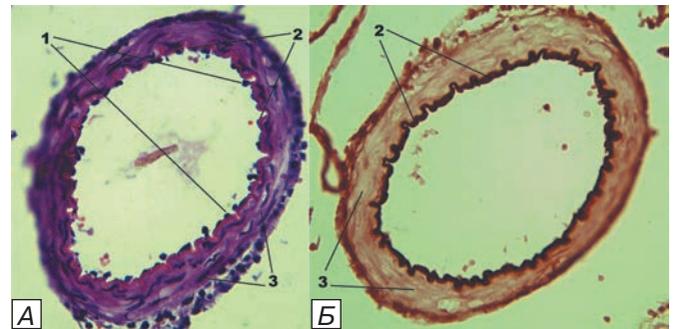


Рис 6. Верхняя треть основной артерии. Контроль. а — окраска гематоксилином и эозином, б — окраска по Грамм-Вейгерту. 1 — ядра эндотелиоцитов, 2 — ВЭМ, 3 — ГМК. Соответствует нормальному строению верхней трети основной артерии крысы. Увеличение x400.

Fig 6. The upper third of basilar artery. The control animal. А — hematoxylin and eosin stain, Б — Gram-Weigert stain. 1 — nuclei of endotheliocytes, 2 — internal elastic membrane, 3 — smooth muscle cells. The structure is corresponding to normal upper third of rat's basilar artery. Zoom x400.

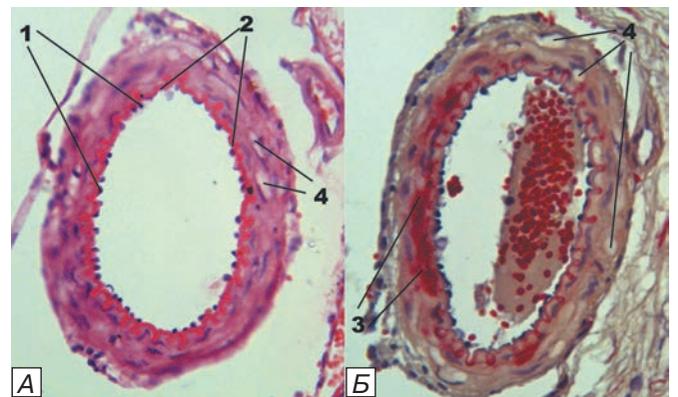


Рис. 7. Верхняя треть основной артерии. 4-е сутки после двукратного введения крови. а — окраска гематоксилином и эозином, б — окраска по Lie. 1 — ядра эндотелиоцитов, 2 — ВЭМ, 3 — фуксинофилия цитоплазмы ГМК, 4 — признаки вакуолизации цитоплазмы ГМК. Отмечается утолщение стенки сосуда, признаки гиперконтрактурных изменений ГМК. Увеличение x400.

Fig. 7. The upper third of basilar artery on the 4th day after double blood injection. А — hematoxylin and eosin stain, Б — Lie stain. 1 — nuclei of endotheliocytes, 2 — internal elastic membrane, 3 — acidophilic cytoplasm of smooth muscle cells, 4 — the signs of cytoplasm vacuolization of smooth muscle cells. The thickening of vessel's wall and hypercontractive changes of smooth muscle cells are seen. Zoom x400.

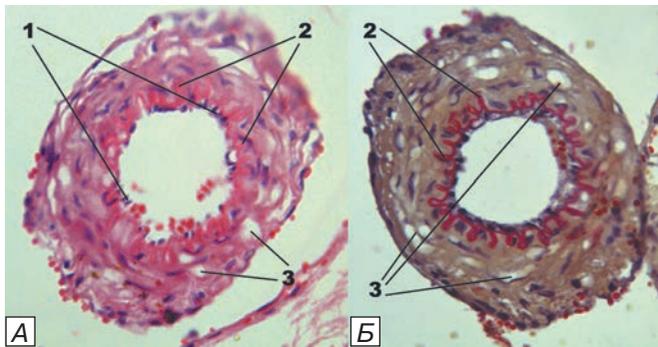


Рис. 8. Верхняя треть основной артерии. 5-е сутки после двукратного введения крови. а — окраска гематоксилином и эозином, б — окраска по Lie. 1 — ядра эндотелиоцитов, 2 — ВЭМ, 3 — вакуолизация цитоплазмы ГМК. Отмечается резкое сужение просвета сосуда, значительное утолщение стенки артерии, сближение ядер эндотелиоцитов. ВЭМ имеет выражено извитые контуры, в цитоплазме ГМК — распространенная гидролическая дистрофия. Увеличение  $\times 400$ .  
Fig. 8. The upper third of basilar artery on the 5th day after double blood injection. A — hematoxylin and eosin stain, Б — Lie stain. 1 — nuclei of endotheliocytes, 2 — internal elastic membrane, 3 — cytoplasm vacuolization of smooth muscle cells. The following changes are detected: severe narrowing of artery lumen, significant thickening of arterial wall, approximation of endotheliocytes nuclei. The internal elastic membrane has the severe tortuous contours; the generalized hydropic degeneration is detected in cytoplasm of smooth muscle cells. Zoom  $\times 400$ .

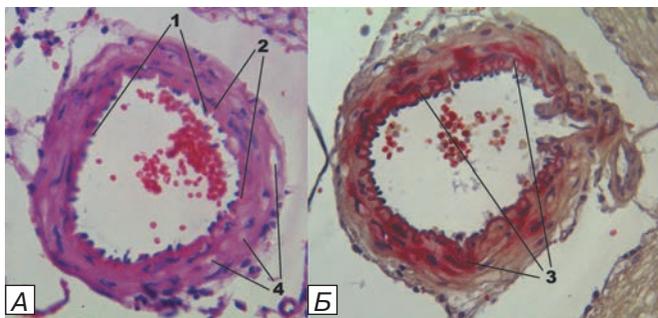


Рис 9. Верхняя треть основной артерии. 7-е сутки после двукратного введения крови. а — окраска гематоксилином и эозином, б — окраска по Lie. 1 — т. intima, 2 — ВЭМ, 3 — фуксинофилия цитоплазмы ГМК, 4 — вакуолизация цитоплазмы ГМК. Толщина стенки артерии и контуры ВЭМ возвращаются к исходной. В цитоплазме ГМК преобладают дистрофические изменения в виде вакуолизации и фуксинофилии. Увеличение  $\times 400$ .  
Fig. 9. The upper third of basilar artery on the 7th day after double blood injection. A — hematoxylin and eosin stain, Б — Lie stain. 1 — t. intima, 2 — internal elastic membrane, 3 — acidophilic cytoplasm of smooth muscle cells, 4 — cytoplasm vacuolization of smooth muscle cells. The thickness of arterial wall and contours of internal elastic membrane are getting back to initial condition. The degenerative changes in terms of vacuolization and acidophilia are predominated in cytoplasm of smooth muscle cells. Zoom  $\times 400$ .

торного введения крови морфологических признаков сосудистого спазма с началом его развития на 4-е сутки, максимально выраженными изменениями на 5-е сутки и признаками разрешения на 6-7-е сутки.

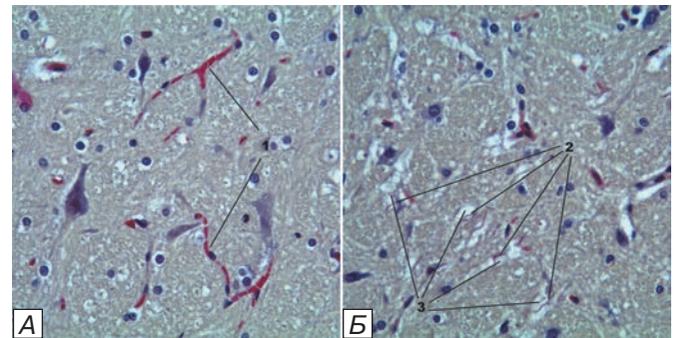


Рис. 10. Верхние отделы мозга крысы. а — 3-и сутки после введения крови, б — 7-е сутки после введения крови. 1 — полнокровные капилляры с сохраненным током крови, 2 — полное спадение просвета капилляров, 3 — зоны выраженного периваскулярного отека. Окраска по Lie, увеличение  $\times 1000$ .  
Fig. 10. The upper parts of rat's pons. А — the 3d day after blood injection. Б — the 7th day after blood injection. 1 — the full blooded capillaries with continued blood stream, 2 — full collapse of capillaries lumen, 3 — the areas of severe perivascular edema. Lie stain, zoom  $\times 1000$ .

## Обсуждение

### Методика воспроизведения кровоизлияния.

Мы использовали методику двукратного введения крови в затылочную цистерну крысы, которая в различных модификациях используется в экспериментах по моделированию СС [7, 10, 11, 17, 18, 21, 25]. По мнению ряда авторов, однократного введения крови у крысы недостаточно для того, чтобы получить СС при САК [12, 19, 24]. Ранее нам также не удалось воспроизвести СС при однократном введении крови в затылочную цистерну. Именно поэтому мы остановились на методике двукратного введения.

В литературе встречаются упоминания о различных способах забора крови у крысы — пункция аксиллярной [6, 23], бедренной [7, 17, 18], хвостовой артерий [7], бедренной [10] и хвостовой вен [4]. В нашей работе для забора артериальной крови мы использовали бедренную артерию, а для забора венозной — хвостовую вену. Безусловно, перкутанный забор крови из хвостового сосудисто-нервного пучка является наиболее предпочтительным, т.к. является технически простым и наименее травматичным для животного. Но несмотря на то что в ряде работ описан забор артериальной крови из хвостовой артерии [7], по нашему опыту, эта манипуляция является сложной ввиду крайне малого диаметра артерии и требует применения очень тонких игл, которые, даже несмотря на предварительную гепаринизацию, часто тромбируются.

В наших условиях мы столкнулись с вариантным ходом хвостовой вены, ввиду этого мы применили методику диафаноскопии для определения ее положения при пункции. Это позволило значительно снизить инвазивность процедуры и сократить время ее выполнения. В литературе мы не встретили указаний на применении диафаноскопии у крыс при пункции хвостовой вены.

*Оценка неврологического статуса*

В нашей работе мы не наблюдали очаговой неврологической симптоматики ни в одном случае. Данные литературы по этому вопросу разнятся: часть авторов указывает, что при использовании данной модели они наблюдали очаговую неврологическую симптоматику в виде гемипареза [7]. Большая же часть авторов [9, 13, 15, 19] сходится во мнении, что очаговая неврологическая симптоматика при моделировании СС в экспериментах как на крысах, так и на других биологических моделях практически не воспроизводится. Так, детальный анализ неврологических проявлений у крыс (с применением нейрофизиологических методов, в том числе с оценкой более 10 рефлексов), проведенный А.Ф. Germano и соавт. [9], не выявил достоверных изменений при САК. Считается, что резистентность мозга к ишемическим повреждениям [15, 24] и наличие обширного коллатерального кровотока [14] у крыс значительно выше таковой у человека, что снижает вероятность развития обширных инфарктов вследствие СС.

По нашему мнению, регресс имевшейся обшемозговой симптоматики (1 балл по шкале J.V. Bederson) в первые 24 ч от манипуляции, несоответствие сроков ее появления с морфологическими проявлениями спазма (5–7-е сутки после введения крови), а также наличие аналогичных нарушений у крыс после операции установки микрокатетера в затылочную цистерну еще до введения крови не позволяют расценивать их в качестве возможных проявлений СС. Изменения в неврологическом статусе в течение первых суток после введения крови, возможно, являются следствием перенесенного наркоза.

*Результаты морфологического исследования*

Строение интракраниальных сосудов у крыс и человека имеет много общего. Ранее при изучении с помощью электронной микроскопии сосудов головного мозга крыс и человека в норме нами продемонстрирована схожесть их морфологического строения, в особенности интимы, внутренней эластической мембраны, и медиа [1]. Были выявлены прямые качественные признаки перенесенного СС в виде характерных изменений интимы, ВЭМ, гладкомышечных клеток у крыс.

При сравнении патологических изменений при СС у крыс и человека выявляется много общего (в первую очередь — наличие гиперконтрактурных и дистрофических изменений ГМК, сморщивание и утолщение ВЭМ, изменения эндотелия). Морфологические изменения при СС у человека имеют значительно более выраженный характер (наличие некрозов и отслойки эндотелиальных клеток, пристеночный тромбоз вплоть до полной облитерации просвета сосуда) [1, 2, 22]. Получить в эксперименте на животных настолько выраженные изменения на любых биологических моделях, включая приматов, крайне сложно [8, 19].

Аналогичные морфологические изменения различной степени выраженности были продемонстрированы в ряде других работ на крысах. Так, Т. Meguro и соавт. (2001) [18] при помощи электронной микроскопии наблюдали вакуолизацию цитоплазмы, слушивание эндотелия и выраженное утолщение и сморщивание внутренней эластической мембраны с максимальной выраженностью на 7-е сутки. В нашей работе мы получили сходные изменения ВЭМ. Учитывая, что для оценки изменений базилярной артерии мы использовали световую микроскопию, возможности которой не позволяют наблюдать ультраструктурные изменения эндотелия, можно говорить о схожести полученных данных. Аналогичные результаты представили I. Gules и соавт. (2002) [11].

Есть данные о максимальной выраженности изменений сосудов к 7-м суткам [11, 18]. Отмечено, что в этих работах интервал между введениями крови составлял 48 ч, что, по нашему мнению, и привело к отличию в сроках развития спазма в эксперименте. В нашей работе, как и в большей части других работ с интервалом между введениями крови в 24 ч, максимум изменений наблюдали на 5-е сутки [10, 17, 25].

Имеются отдельные указания на наличие изменений ткани мозга при моделировании САК у крыс. Ряд авторов наблюдали ишемические изменения нейронов в области обонятельного мозга и гиппокампа [10, 20]. J.R. Dusick и соавт. (2011) определяли зоны ишемии в стволе при применении специальных гистохимических реакций (окрашивание с трифенилтетразолием) [7]. Нами были выявлены признаки нарушения капиллярного кровотока в ткани мозга крысы, что является прямым признаком ишемии мозга на микроциркуляторном уровне. В данных литературы мы не встретили указаний на подобные изменения.

В большей части работ по моделированию СС у крыс значительную роль отводят количественной оценке спазма с измерением площади просвета и толщины стенки различных интракраниальных сосудов, в то время как детальное описание качественных морфологических изменений сосудистой стенки не всегда является подробным [4, 10, 17, 21]. Мы считаем, что в первую очередь необходимо отмечать качественные характеристики, т.к. количественное измерение площади просвета зависит от таких факторов, как угол прохождения среза, геометрическая конфигурация просвета сосуда в момент среза. Для наглядности эти факторы можно проиллюстрировать следующим примером (рис. 11).

Несмотря на то что на препарате Б отсутствуют качественные признаки сосудистого спазма (изменения ВЭМ, утолщение стенки артерии, вакуолизации цитоплазмы ГМК) наглядно видно, что площадь просвета артерии много меньше, чем на контрольном препарате. Прижизненная геометрия (сплющивание сосуда) могла быть изменена практически на любом этапе эксперимента (при заборе препарата ГМ, его фиксации в формалине, заливке парафином или при нарезке парафиновых срезов микротомом).

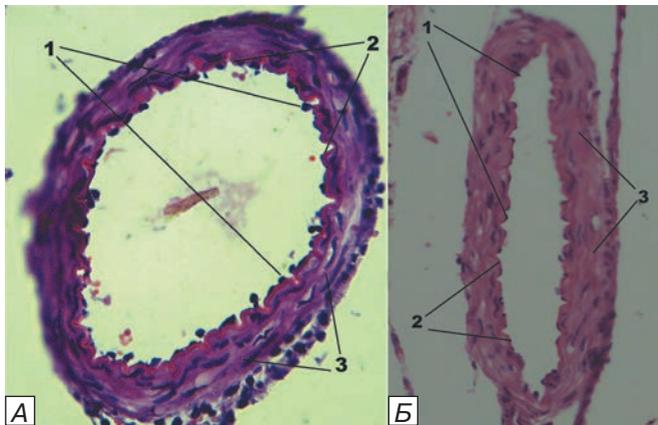


Рис. 11. а — срез верхней трети базиллярной артерии, контроль; б — срез верхней трети базиллярной артерии, 3-и сутки после введения артериальной крови. 1 — ядра эндотелиоцитов, 2 — ВЭМ, 3 — ГМК. Соответствуют нормальному строению верхней трети основной артерии крысы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 400$ .

Fig. 11. A — the slice at the level of upper third of basilar artery, control animal. Б — the slice at the level of upper third of basilar artery, the 3th day after arterial blood injection. 1 — nuclei of endotheliocytes, 2 — internal elastic membrane, 3 — smooth muscle cells. The observed findings are corresponding to normal structure of upper third of rat's basilar artery. Hematoxylin and eosin stain, zoom  $\times 400$ .

Достоверной разницы между введением венозной и артериальной аутокрови мы не наблюдали. В большей части опубликованных работ по моделированию СС в качестве спазмогенного агента использована артериальная кровь [7, 10, 11, 17, 18, 21], но имеются данные об использовании венозной крови [4, 26]. Исследований, посвященных сравнению спазмогенного эффекта венозной и артериальной крови, в литературе мы не встретили.

Таким образом, учитывая, что спазмогенный эффект венозной и артериальной крови не отличаются, а манипуляция по забору артериальной крови из бедренной артерии является намного более травматичной для животного, чаще сопровождается локальными осложнениями и технически выполнение ее сложнее, чем забор крови из хвостовой вены, мы считаем приемлемым использование венозной крови в дальнейших исследованиях.

## Заключение

В проведенном исследовании нам удалось отработать методику воспроизведения СС на модели двухкратного введения аутокрови в затылочную цистерну крысы, оценить спазмогенный эффект венозной и артериальной крови, уточнить морфологические проявления сосудистого спазма и динамику его развития у крыс. Предложенная нами модель двухкратного введения венозной аутокрови в затылочную цистерну крысы является адекватной для дальнейшего изучения СС, методов его профилактики и лечения при нетравматических САК.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

*Крылов Владимир Викторович* — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель клиники неотложной нейрохирургии НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, зав. кафедрой нейрохирургии и нейрореанимации МГМСУ им. А.И. Евдокимова

*Природов Александр Владиславович* — канд.мед. наук, зав. нейрохирургическим отделением НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, e-mail: aprirodov@yandex.ru

*Титова Галина Павловна* — д-р мед.наук, проф., зав. лабораторией электронной микроскопии НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

*Дыдыкин Сергей Сергеевич* — д-р мед.наук, проф., зав. каф. оперативной хирургии и топографической анатомии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

*Бахарев Евгений Юрьевич* — клинический ординатор 1 года обучения НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

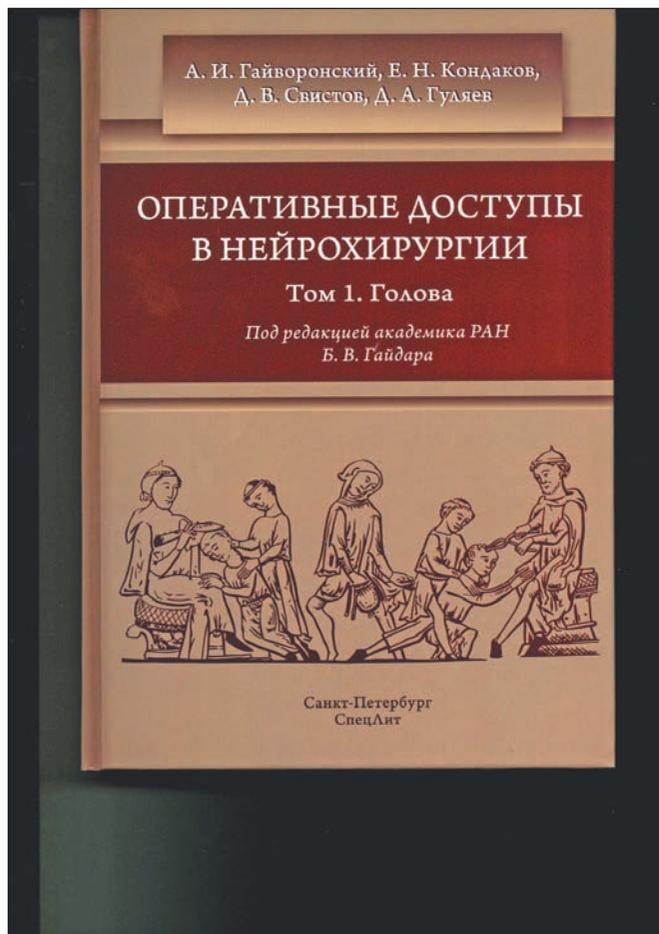
*Кочеткова Ольга Олеговна* — клинический ординатор 1 года обучения НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

*Усов Игорь Александрович* — студент 5 курса л/ф Первого МГМУ им. И.М Сеченова

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Krylov V.V., Gusev S.A., Gusev A.S., Titova G.P. The cerebral angiospasm because of subarachnoid hemorrhage. Moscow; 2001: 208 pp (in Russian).
- Krylov V.V. (ed). Surgery of cerebral aneurysms. Moscow; Novoe vremya; 2011; 1: 432 pp (in Russian).
- Aladag M.A., Turkoz Y., Sahna E., Parlakpinar H., Gul M.: The attenuation of vasospasm by using a SOD mimetic after experimental subarachnoid haemorrhage in rats. ActaNeurochir., 145: 673–677, 2003.
- Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M., Nishimura M.C., Davis R.L., Bartkowski H.: Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke 17:472–476, 1986.
- Delgado T.J., Brismar J., Svengaard N.A.: Subarachnoid hemorrhage in the rat: Angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. Stroke 16:595–602, 1985.
- Dusick J.R., Evans B.C., Laiwalla A., Krahl S., Gonzalez N.R.: A minimally-invasive rat model of subarachnoid hemorrhage and delayed ischemic injury. SurgNeuroInt 2:99, 2011.
- Findlay J.M., Weir B.K., Kanamaru K., Espinosa F: Arterial wall changes in cerebral vasospasm. Neurosurgery 25:736–746, 1989.
- Germano A.F., Dixon C.E., d'Avella D., Hayes R.L., Tomasello F: Behavioral deficits following experimental subarachnoid hemorrhage in the rat. J Neurotrauma 1994, 11:345–353.
- Gresir E., Raabe A., Jaiimsin A., Dias S., Raab P., Seifert V., Vatter H.: Histological evidence of delayed ischemic brain tissue damage in the rat double-hemorrhage model. J Neur. Scien. 293 (2010) 18–22.
- Gules I., Satoh M., Clower B., Nanda A., Zhang J.: Comparison of three rat models of cerebral vasospasm. Am J Physiol Heart CircPhysiol 283:H2551–H2559, 2002.
- Jackowski A., Crockard A., Burnstock G., Russell R.R., Kristek F. The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid haemorrhage in the rat. J Cereb Blood Flow Metab, 1990;10:835–49.
- Jeon H., Ai J., Sabri M., Tariq A., Shang X., Chen G., Macdonald R.L., Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage. BMC Neurosci. 10:103, 2009.
- Kader A., Krauss W.E., Onesti S.T., Elliott J.P., Solomon R.A.: Chronic cerebral blood flow changes following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. Stroke21:577–581, 1990.

14. Kaoutzanis M., Yokota M., Sabilia R., Peterson J.W.: Neurologic evaluation in a canine model of single and double subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Methods* 50:301–307, 1993.
15. Lie J.T., Holley K.F., Kampa W.R. et al. - «Proc. Mayo Clin.», 1971, v. 46, p. 319.
16. Lee J.Y., Huang D.L., Keep R., Sagher O.: Characterization of an improved double hemorrhage rat model for the study of delayed cerebral vasospasm. *J Neurosci Methods* 168(2):358–366. 2008.
17. Meguro T., Clower B.R., Carpenter R., Parent A.D., Zhang J.H. Improved rat model for cerebral vasospasm studies. *Neurol Res Oct* 2001;23(7):761–6.
18. Megyesi J.F., Vollrath B., Cook D.A., Findlay J. M. In Vivo Animal Models of Cerebral Vasospasm: A Review. *Neurosurgery*. 46(2):257, February 2000.:
19. Prunell G.F., Svendgaard N.A., Alkass K., Mathiesen T.: Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain. *J Neurosurg* 102: 1046–1054, 2005.
20. Raslan F., Albert-Weienberger C., Westermaier T., Saker S., Kleinschnitz C., Lee J.Y.: A modified double injection model of cisterna magna for the study of delayed cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in rats. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 4:23, 2012.
21. Smith R.R., Clower B.R., Grotendorst G.M., Yabuno N., Cruse J.M.: Arterial wall changes in early human vasospasm, *Neurosurgery*. 1985 Feb;16(2):171-6.
22. Suzuki H., Kanamaru K., Tsunoda H., Inada H., Kuroki M., Sun H. et al. Hemeoxygenase-1 gene induction as an intrinsic regulation against delayed cerebral vasospasm in rats. *J Clin Invest* 1999;104:59–66.
23. Swift D.M., Solomon R.A.: Subarachnoid hemorrhage fails to produce vasculopathy or chronic blood flow changes in rats, *Stroke*. 1988 Jul;19(7):878-82.
24. Vatter H., Weidauer S., Konzalla J., Dettmann E., Zimmermann M., Raabe A. et al. Time course in the development of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage: clinical and neuroradiological assessment of the rat double hemorrhage model. *Neurosurgery Jun* 2006;58(6):1190–7.
25. Widenka D.C., Medele R.J., Stummer W., Bise K., Steiger H.J. Inducible nitric oxide synthase: a possible key factor in the pathogenesis of chronic vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1999;90:1098–104.



## КНИЖНЫЕ НОВИНКИ

Оперативные доступы в нейрохирургии: руководство для врачей, в 2 т. / А.И. Гайворонский, Е.Н. Кондаков, Д.В. Свистов, Д.А. Гуляев [и др.]: под ред. Академика РАН Б.В. Гайдара. — Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. — т. 1: Голова. — 239 с. ил.

ISBN 978-5-299-00636-0

Руководство посвящено технике выполнения различных доступов к структурам черепа и головного мозга с использованием современных хирургических технологий, технике закрытия операционной раны. В отдельной главе описана хирургическая анатомия головы. Особое внимание уделено аппаратному оснащению нейрохирургической операционной и методике применения современных гемостатиков и имплантатов при операциях на голове.

Руководство предназначено для врачей, обучающихся по специальности «Нейрохирургия», и практикующих нейрохирургов.

ООО «Издательство СпецЛит»,  
тел. (812) 495-36-09, (812) 495-36-12,  
<http://www.speclit.spb.ru>