

## ПРОФИЛАКТИКА ЦЕРЕБРАЛЬНОГО СОСУДИСТОГО СПАЗМА ПРИ СУБАРАХНОИДАЛЬНЫХ КРОВОИЗЛИЯНИЯХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

А.В. Природов<sup>1</sup>, Г.П. Титова<sup>1</sup>, С.С. Дыдыкин<sup>2</sup>, С.С. Маркин<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>1,3</sup>

<sup>1</sup>НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского,

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,

<sup>3</sup>Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова

**Цель.** Оценить эффективность и безопасность применения фибринолитиков (рекомбинантная стафилокиназа, рекомбинантный человеческий тканевой активатор плазминогена) для профилактики сосудистого спазма (СС) на крысиной модели.

**Материалы и методы.** Эксперимент проведен на 81 белой крысе. Для моделирования СС использовали методику двукратного введения крови в затылочную цистерну крысы. Животные были разделены на 4 группы: 25 особям осуществляли интратекальное введение фортеплазы (рекомбинантная стафилокиназа); 15 особям осуществляли интратекальное введение альтеплазы (рекомбинантный человеческий тканевой активатор плазминогена), 30 особей, которым осуществляли только дренирование ЦСЖ, составили контрольную группу, 11 животным выполняли установку микрокатетера в затылочную цистерну животного (из дальнейшего анализа группа была исключена в связи с неэффективностью санации ЦСЖ). Морфологическое исследование интракраниальных сосудов (верхняя треть базиллярной артерии) и вещества головного мозга на уровне среза проводили на 5-е сутки эксперимента с использованием специализированных гистохимических реакций.

**Результаты.** На основании проделанной работы была предложена шкала морфологической оценки СС базиллярной артерии крысы, выявлены признаки микроциркуляторных нарушений, характерных для СС. В основной морфологический анализ вошли 25 животных (9 из 1-й группы, 4 из 2-й группы, 12 из 3-й группы). В контрольной группе развитие выраженного СС было отмечено в 4 (33,3%) наблюдениях, умеренного — в 6 (50%), слабого — в 2 (16,7%). В группах с интратекальным введением фибринолитиков выраженного СС не наблюдали. Среди животных, которым вводили фортеплазу, умеренный спазм отмечен у 6 (66,7%) и слабый у 3 (33,3%) животных. У особей, получавших альтеплазу, умеренный и слабый спазм встречался с одинаковой частотой. Формирования внутричерепных геморрагических осложнений отмечено не было.

**Заключение.** Интратекальное введение фибринолитиков является эффективной и безопасной методикой, снижающей выраженность СС на модели двукратного введения крови в затылочную цистерну крысы.

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

**Introduction.** The Blood and its degradation products are considered to be the main cause of cerebral angiospasm (CA) due to non-traumatic subarachnoid haemorrhage (SAH). Intrathecal fibrinolytic therapy is one of the most effective methods for clearing the basal cisterns from the blood.

**Objective.** To study the effectiveness and safety of intrathecal fibrinolytic therapy (recombinant staphylokinase, recombinant human plasminogen activator) for CA prevention using double haemorrhage model.

**Materials and methods.** The study was performed on 81 laboratory white rat. The double haemorrhage model was used for reproduction of CA. All animals were divided into 4 groups: 25 were treated with recombinant staphylokinase (fortepase) — group 1, 15 were treated with recombinant plasminogen activator (alteplase) — group 2, 30 animals were included in control group (cerebrospinal fluid drainage only) — group 3, cisternal microcatheter was introduced to 11 animals (group was excluded from further analysis because of CSF drainage inefficiency). Rat brain for morphological study was taken at 5th day. Microscopy assessment was done at the level of the upper third of the basilar artery using special histochemical stains.

**Results.** The morphological scale of CA severity was performed and the specific microcirculatory changes of brain tissues were identified. We included 25 animals (nine from group 1, four from group 2, twelve from group 3) in the main morphological analysis. Mild CA was observed in 4 cases (33,3%), moderate — in six cases (50%), severe — in 4 cases (33,3%) among animals of control group. Severe CA was absent in fibrinolytic groups. Moderate CA was observed in 6 cases (66,7%), mild — in 3 cases (33,3%) in forteplase group. Both mild and moderate CA was observed in 50% of cases in alteplase group. Intracranial haemorrhage was not observed in any group.

**Conclusion.** The proposed intrathecal fibrinolytic therapy is effective and safe method to reduce the severity of CA in rat double haemorrhage model.

**Key words:** Nontraumatic subarachnoid haemorrhage, cerebral vasospasm, in vivo rat model, fibrinolysis

## Введение

Проблема профилактики и лечения церебрального сосудистого спазма (СС) при разрывах аневризм сосудов головного мозга в остром периоде кровоизлияния является одной из наиболее актуальных проблем современной сосудистой нейрохирургии во всем мире [2, 28, 41, 47, 49, 51]. До настоящего времени нет ни одной эффективной методики борьбы с этим грозным осложнением.

Ключевым фактором, приводящим к развитию СС, являются кровь и продукты ее распада, попавшие в субарахноидальное пространство после разрыва артериальной аневризмы (АА) [1, 2, 28, 41]. Таким образом, патогенетически обоснованным является наиболее ранняя санация базальных цистерн от сгустков крови. Методика интраоперационного механического удаления сгустков показала свою эффективность в качестве меры по профилактике СС [30, 31, 35]. Однако такая санация базальных цистерн в остром периоде субарахноидального кровоизлияния (САК) является крайне сложной технически и сопряжена с дополнительной травматизацией интракраниальных сосудов, и в особенности мелких перфорирующих артерий [30, 35]. Кроме того, невозможно полностью механически удалить сгустки крови из всех цистерн мозга при массивном кровоизлиянии (III-IV тип по классификации Fisher).

Ввиду этого перспективными являются методы непрямой санации базальных цистерн, в частности, применение фибринолитических препаратов в сочетании с ранним хирургическим лечением (в первые 24–72 ч). Ряд работ демонстрирует эффективность различных способов санации ликворных пространств от сгустков крови с использованием фибринолитиков на экспериментальных моделях [6, 12–14, 31, 33, 39, 40, 42, 45] и в клинической практике [15, 22–24, 34, 36, 38, 46, 47]. Несмотря на это единого мнения об эффективности фибринолитических препаратов при профилактике и лечении СС нет.

## Цель работы

Разработать методику и оценить эффективность применения фибринолитиков (рекомбинантной стафилокиназы, рекомбинантного человеческого тканевого активатора плазминогена) для профилактики СС на крысиной модели.

## Материалы и методы

Эксперимент был проведен на 81 лабораторной белой крысе массой  $200 \pm 20$  г. Все протоколы исследования были разработаны с соблюдением правовых норм при работе с лабораторными животными. Для воспроизведения СС у крыс использовали методику двукратного введения человеческой крови в затылочную цистерну животных.

*Все животные были разделены на следующие группы:*

1-я группа ( $n=25$ ) — двукратное введение человеческой крови, интратекальное введение фортеплазе (рекомбинантная стафилокиназа) (*Фортелизин, ООО «Супраген», Россия*), с последующей санацией цереброспинальной жидкости (ЦСЖ).

2-я группа ( $n=15$ ) — двукратное введение человеческой крови, интратекальное введение альтеплазы (рекомбинантный тканевой активатор плазминогена — РТПА) (Актилизе, Берингер Ингельхайм Фарма ГмБХ и Ко. КГ, Германия), с последующей санацией ликворных пространств.

3-я группа, контроль ( $n=30$ ) — двукратное введение человеческой крови с последующей санацией ликворных пространств без использования фибринолитика.

4-я группа ( $n=11$ ) — двукратное введение человеческой крови с последующей санацией ликворных пространств при помощи установки микрокатетера в затылочную цистерну. Набор животных был досрочно прекращен в связи с неэффективной санацией ЦСЖ. Из дальнейшего анализа группа была исключена.

## Методика экспериментальной модели СС.

### 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: 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). Через 15 мин после премедикации в область бедра другой лапки крысы вводили: «золетил 100» — 24 мг/кг массы тела (0,06 мл раствора), ксилазин — 3,2 мг/кг массы тела (0,04 мл 2% раствора). 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 вмешательства

#### 1-е сутки. Пункционное введение человеческой крови в затылочную цистерну.

После бритья затылочной области и обработки кожи растворами антисептиков животное укладывали на операционном столике так, чтобы голова была наклонена и согнута под углом 70–80°. На коже проводили разметку костных ориентиров (рис. 1).

Катетером для периферических внутривенных инъекций (диаметр иглы — 25G) прокалывали кожу по средней линии на 3–4 мм ниже выйной линии. Далее, спускаясь иглой по поверхности

затылочной кости, выполняли пункцию затылочной цистерны животного и в течение 5 мин выводили 0,1 мл ЦСЖ (рис. 2).

После выведения ЦСЖ в течение 5 мин осуществляли введение 0,1 мл свежей человеческой крови (рис. 3).

Крысу оставляли на 20 мин с опущенным головным концом стола.

### 2-е сутки. Введение человеческой крови в затылочную цистерну с ушиванием атлантоокципитальной мембраны.

Животное фиксировали на операционном столике. 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 «Ульттракаин ДС 1:200000»



Рис. 1. Положение животного на столе. Отмечены остистый отросток VII шейного позвонка и выйная линия.  
Fig. 1. The position of animal on the table. The spinous process of CVII vertebra and nuchal line are marked.



Рис. 2. Выполнена пункция затылочной цистерны. Получена чистая прозрачная ЦСЖ.  
Fig. 2. The puncture of occipital cistern was performed with the receiving of clean transparent CSF.

(артикаина гидрохлорид 40 мг/мл + эpineфрина 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, атлантоокципитальную мембрану и дугу I шейного позвонка. Часть затылочных мышц иссекали с целью формирования полости для дренирования ЦСЖ. С целью опорожнения ликворных пространств затылочную цистерну предварительно вскрывали, после чего под контролем зрения в нее пункционно вводили 0,05 мл свежей человеческой крови. Критерием правильного введения служила моментальная окраска затылочной мембраны в сине-фиолетовый цвет. Обязательным этапом являлось ушивание затылочной мембраны. Если этого не выполняли, то большая часть крови сразу выходила через сформированный дефект затылочной мембраны в окружающие ткани. Кожу герметично ушивали. Животное оставляли на 20 мин с опущенным головным концом на 20-30°. При необходимости компенсации кровопотери подкожно вводили смесь 5% раствора глюкозы и 0,9% раствора хлорида натрия объемом до 5-10 мл.

### 3-и сутки. Интратекальное введение фибринолитика с последующим формированием подкожного кармана для дренирования ЦСЖ.

Животное фиксировали на операционном столе. По старому разрезу рану вскрывали, выполняли пункционное введение 0,05 мл раствора (концентрация фибринолитиков составляла 1 мг/мл для альтеплазы и фортелизина) в затылочную цистерну с ушиванием. Животное оставляли с опущенным головным концом на 30 мин, после чего кисетный шов снимали, широко рассекали атланто-окципитальную мембрану, визуализировали имеющуюся лизированную кровь и сгустки (рис. 4), ушивали кожу. При необходимости компенсации кровопотери подкожно вводили смесь 5% раствора глюкозы и 0,9% раствора хлорида натрия объемом до 5-10 мл.

Через 1, 6 и 24 ч после ушивания выполняли пункционное выведение ЦСЖ из подкожного кармана.

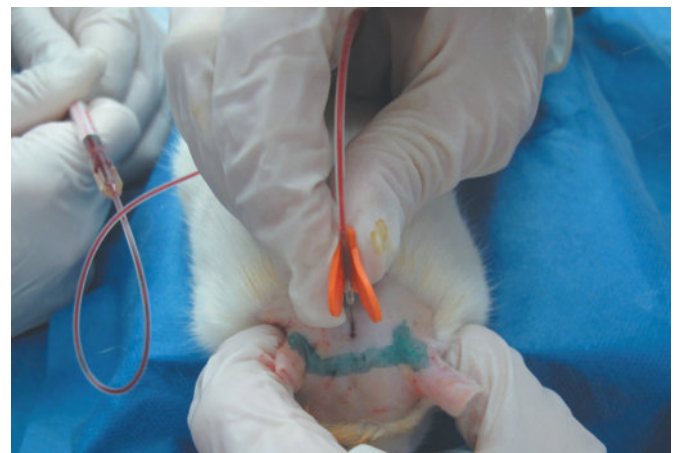


Рис. 3. Введение крови в затылочную цистерну.  
Fig. 3. The insertion of blood into occipital cistern. Rat was put on the table with the lowered top of the table for 20 minutes

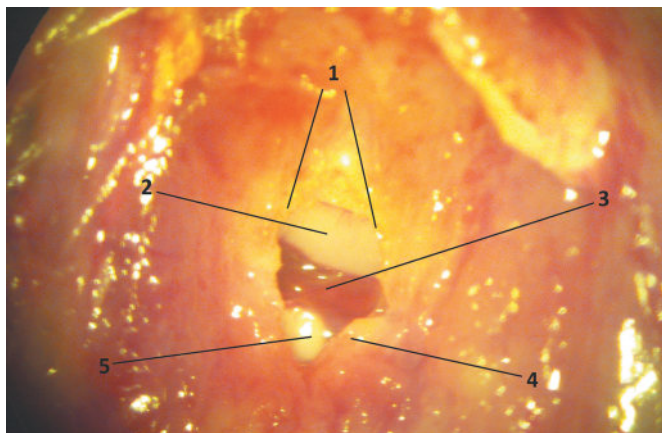


Рис. 4. Этап вскрытия затылочной цистерны. 1 — край трепанированной затылочной кости; 2 — мозжечок; 3 — сгусток крови в цистерне; 4 — край вскрытой атланта-затылочной мембраны; 5 — спинной мозг.

Fig. 4. Opening of the occipital cistern. 1 — border of trepanation of occipital bone; 2 — cerebellar; 3 — blood clot in the cistern; 4 — the margin of opened atlantooccipital membrane; 5 — spinal cord.

**5-е сутки.** Мозг животного забирали для морфологического исследования.

**Методика установки микрокатетера в затылочную цистерну.**

Установку выполняли по описанной нами ранее методике на 2-е сутки эксперимента [4]. Из 11 животных 2 умерли на 3-и сутки эксперимента. У оставшихся 9 крыс пассивный отток ЦСЖ через сутки после установки функционировал только у одного животного. В 8 случаях катетер не функционировал по следующим причинам: миграция катетера — в 1 случае, обширный фибринозно-спаечный процесс в субарахноидальном пространстве — в 2 случаях, тромбоз катетера — в 5 случаях. В связи с этим от дальнейшего использования предложенной методики было решено отказаться.

**3. Оценка неврологического статуса**

Оценку неврологического статуса животных проводили 1 раз в сутки по 4-балльной шкале:

0 баллов — отсутствие неврологических нарушений

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

2 балла — крыса малоподвижна, вяло реагирует на прикосновение, могут быть очаговые неврологические симптомы (парезы в конечностях, неловкость при передвижении по клетке)

3 балла — крыса не может передвигаться по клетке из-за угнетения бодрствования или очагового неврологического дефицита, реакция на болевой раздражитель сохранена.

4 балла — спонтанная двигательная активность отсутствует, реакции на болевой раздражитель нет

**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 вскрытия затылочной мембраны и макроскопической оценки нижележащих структур выполняли деканитацию на уровне III-IV шейного позвонков, вскрывали черепную коробку и, по возможности не травмируя твердую и паутинную мозговую оболочки, извлекали препарат головного мозга вместе с верхнешейным отделом спинного мозга. Препарат помещали на 24 ч в 5% р-р формалина и заливали в парафин. Для морфологического исследования использовали срезы на уровне верхней трети базилярной артерии.

Окраску парафиновых срезов осуществляли следующими способами:

- Обзорная: гематоксилином и эозином,
- Для оценки состояния сократительного аппарата гладкомышечных клеток (миофибрилл): по Lie [26].

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

**Результаты**

**Морфологическое исследование.** В ходе проведенной работы была разработана морфологическая шкала оценки степени выраженности церебрального ангиоспазма у крыс:

- 1) Отсутствие спазма (рис. 5 А);
- 2) Слабый спазм — ядра эндотелиоцитов (ЯЭ) практически не выступают в просвет сосуда, складчатость внутренней эластической мембраны (ВЭМ) слабо выражена, отмечаются минимальные изменения гладкомышечных клеток (ГМК), отсутствует сужение просвета сосуда, но имеется некоторое утолщение его сосуда (рис. 5 Б);
- 3) Умеренный — часть ЯЭ (менее 50%) выступают в просвет сосуда, выражена складчатость ВЭМ, присутствуют гиперконтрактурные изменения ГМК (гидропическая дистрофия, гипертрофия), утолщение стенки сосуда и сужение его просвета (рис. 5 В);
- 4) Выраженный — большая часть ЯЭ выступает в просвет сосуда, резко выражены складчатость ВЭМ, сужение просвета сосуда с утолщением стенки, гиперконтрактурные изменения ГМК (рис. 5 Г).

Помимо морфологического определения спазма основной артерии был проведен анализ вещества гистологических изменений ствольных структур головного мозга на уровне среза. При сосудистом спазме в веществе головного мозга нами были выявлены нарушения в системе микроциркуляторного русла в виде наличия функционирующих и нефункционирующих капилляров. **Функционирующим** мы считали капилляр, в про-

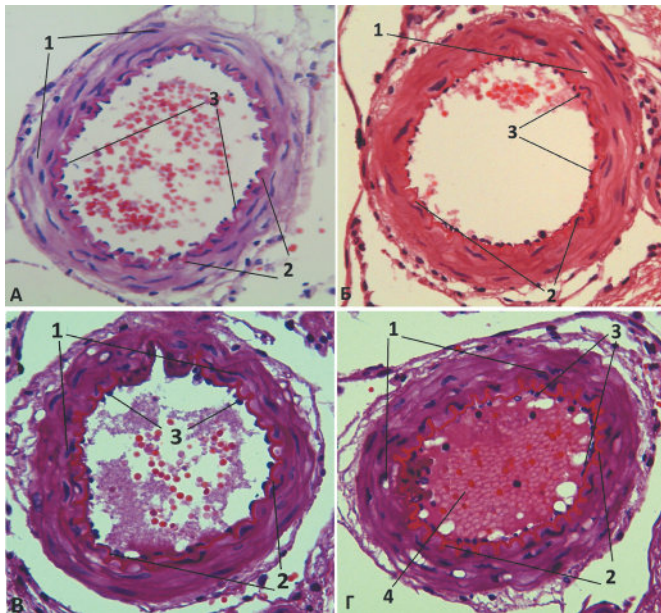


Рис. 5. А — интактный сосуд<sup>1</sup>, Б — слабовыраженный спазм, В — умеренный спазм, Г — выраженный спазм. 1 — слой ГМК, 2 — ВЭМ, 3 — ядра эндотелиоцитов, 4 — явления эритростаза. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400

Fig. 5. А — intact vessel, Б — mild vasospasm, В — moderate vasospasm, Г — severe vasospasm. 1 — layer of smooth muscle cells, 2 — internal elastic membrane, 3 — nuclei of endotheliocytes, 4 — events of erythrosthesis. Hematoxylin and eosin stain, zoom x400

свете которого присутствовали свободно лежащие форменные элементы крови или их агрегаты при отсутствии или различной степени выраженности периваскулярного и перичеллюлярного отека. **Нефункционарующим** мы считали капилляр с полностью спавшимся просветом, без форменных элементов и выраженным периваскулярным и перичеллюлярным отеком (рис. 6).

В ходе анализа выявлена взаимосвязь между степенью спазма основной артерии и выраженностью микроциркуляторных нарушений. В препаратах со слабым спазмом определялись минимальные микроциркуляторные нарушения (единичные нефункционирующие капилляры). В препаратах с умеренно выраженным спазмом нефункционирующие капилляры составляли менее 50% от общего числа капилляров в срезе. При выраженном спазме количество нефункционирующих капилляров составляло более 50%.

В морфологический анализ были включены тринадцать животных, которым проводили интратекальный фибринолиз (9 животных из группы I и 4 животных из группы II) и 12 животных из контрольной группы (группа III) (табл. 1).

В контрольной группе выраженный спазм ОА обнаружен у 4 животных, умеренный — у 6 и слабый только у 2 особей. СС в контрольной

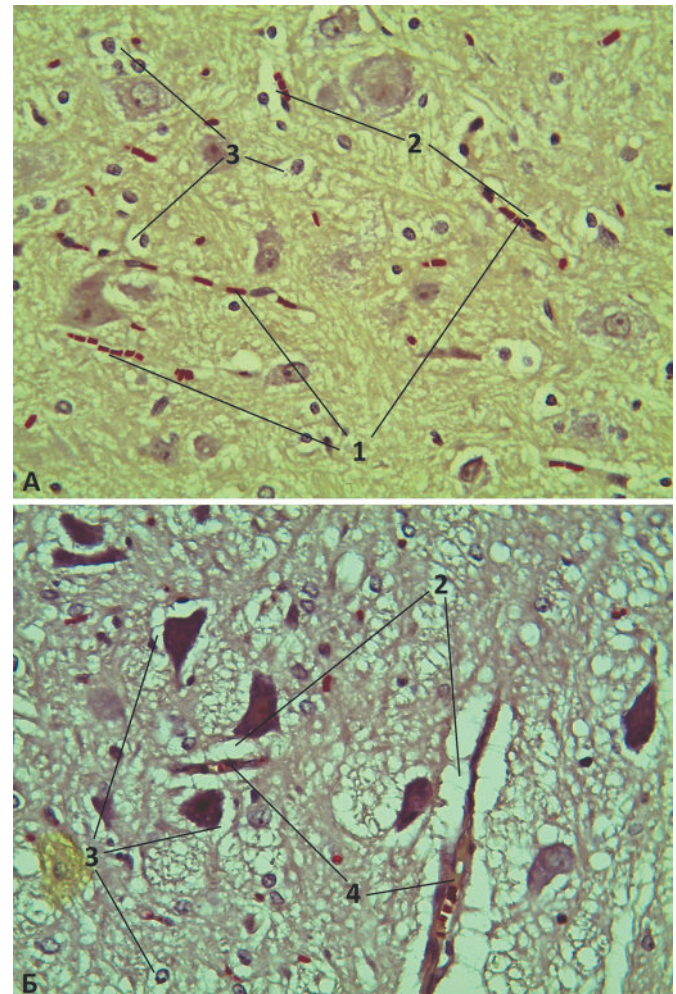


Рис. 6. А — умеренно выраженные микроциркуляторные нарушения, Б — микроциркуляторные нарушения при выраженном спазме. 1 — функционирующие капилляры, 2 — периваскулярный отек, 3 — перичеллюлярный отек, 4 — нефункционирующие капилляры. Окраска по Lie, увеличение x1000

Fig. 6. А — moderate expressed microcirculatory abnormalities, Б — microcirculatory abnormalities against the severe vasospasm. 1 — patent capillaries, 2 — perivascular edema, 3 — pericellular edema, 4 — non-patent capillaries. Stain by Lie, zoom x1000

группе проявлялся не только структурными изменениями стенок артерии, но внутрисосудистыми гемореологическими изменениями (эритроцитарные и тромбоцитарные агрегаты, эритростаз). Выявлена корреляция между степенью спазма ОА и выраженностью микроциркуляторных нарушений. Так, при слабом и умеренном спазме преобладали функционирующие капилляры при наличии периваскулярного и перичеллюлярного отека. Выраженный спазм ОА сопровождался выключением из кровотока более 50% капилляров с отеком головного мозга и его начальными ишемическими повреждениями.

<sup>1</sup> Природов А.В., Титова Г.П., Дыдыкин С.С., Маркин С.С. Бахарев Е.Ю., Кочеткова О.О., Усов И.А.: Модель церебрального сосудистого спазма у крыс с использованием человеческой крови, Нейрохирургия №4 2015, с. 54-59

Таблица 1 / Table 1

Степень выраженности спазма основной артерии в различных исследуемых группах / The degree of basilar artery spasm severity in various examined groups of animals

Группа \ Выраженность спазма	Выраженный	Умеренный	Слабовыраженный	Всего
I	-	6 (66,7%)	3 (33,3%)	9
II	-	2 (50%)	2 (50%)	4
III	4 (33,3%)	6 (50%)	2 (16,7%)	12

В группах I и II выраженный спазм ОА отсутствовал, умеренный сохранялся у 8 (6 из группы I и 2 из группы II), а слабый — у 5 животных (3 из группы I и 2 из группы II). При этом примерно в половине наблюдений прослеживались микроциркуляторные нарушения в виде неравномерного полнокровия капилляров при четких признаках снижения периваскулярного и перипеллюлярного отека вещества мозга.

Таким образом, на экспериментальной модели сосудистого спазма морфологически был выявлен положительный эффект влияния интратекального введения фибринолитиков, заключающийся в отсутствии прогрессирования спазма, гемореологических, микроциркуляторных нарушений и отека вещества ствольных отделов головного мозга.

**Неврологический статус животных, вошедших в основной морфологический анализ.** У 7 животных из группы I, 4 животных из группы II и 9 животных из группы III выявлены нарушения в неврологическом статусе до 2 баллов на 3-и сутки эксперимента с последующим регрессом симптоматики до 1 балла к 5-м суткам эксперимента. У остальных животных неврологическая симптоматика в 1 балл полностью регрессировала к 5-м суткам эксперимента. Имеющаяся неврологическая симптоматика была расценена как следствие перенесенного комбинированного нар-

коза. Разницы в неврологическом статусе между группами отмечено не было.

**Животные, выбывшие из основного морфологического анализа.** В группе I летальность на различных этапах эксперимента составила 9 животных, в группе II — 6 животных, в группе III — 11 животных. Морфологическое исследование головного мозга удалось выполнить у 5 животных из группы I, 4 животных из группы II и 7 животных из группы III. У остальных животных в силу выраженных аутолизных изменений мозговой ткани морфологическое исследование не выполняли. Структура летальности представлена в табл. 2.

3 животных из группы I, 2 животных из группы II и 3 животных из группы III были исключены из дальнейшего эксперимента ввиду отсутствия сгустков крови в затылочной цистерне при ее вскрытии на 3-и сутки.

У одного животного из группы I, 2 животных из группы II и 2 животных из группы III наблюдали выраженное усиление кровотоковости в ране после вскрытия затылочной мембраны на 3-и сутки эксперимента, что привело к попаданию большого объема свежей крови в цистерну. Эти животные из дальнейшего анализа результатов были исключены.

При морфологическом исследовании у 3 животных из группы I, одного животного из груп-

Таблица 2 / Table 2

Структура летальности / The structure of lethality

Группа \ Причина смерти	Гнойный менингит	Дислокационные изменения	Внемозговые причины	Причина не установлена	Всего
I	2	1	2	4	9
II	2	1	1	2	6
III	2	2	3	4	11

Таблица 3 / Table 3

Причины исключения животных из дальнейшего исследования из разных групп / The reasons for animals' exclusion from the study in various examined groups

Группа	Умерло	Отсутствие крови на 3-и сутки	Кровоточивость мягких тканей на 3 сутки	Гнойный менингит	Вошедшие в основной морфологический анализ	Всего
I	9 (36%)	3 (12%)	1 (4%)	3 (12%)	9 (36%)	25
II	6 (40%)	2 (13,3%)	2 (13,3%)	1 (6,7%)	4 (26,7%)	15
III	11 (36,6%)	3 (10%)	2 (6,7%)	2 (6,7%)	12 (40%)	30

пы II и 2 животных из группы III был выявлен гнойный менингит. Из дальнейшего исследования они были так же исключены.

Обобщенные данные исключения препаратов из основного морфологического анализа представлены в табл. 3.

## Обсуждение

В 80-х годах прошлого века была продемонстрирована эффективность микрохирургического удаление сгустков крови из базальных цистерн в первые сутки после разрыва АА в качестве меры профилактики симптомного СС [18, 30, 31, 35]. Несмотря на это сами авторы указывали, что расширенная диссекция субарахноидальных пространств в остром периоде кровоизлияния не всегда безопасно выполняема в условиях нарастающего отека головного мозга. Таким образом, стали разрабатываться методики непрямого санации ликворных пространств, в частности с применением фибринолитических препаратов. В 1988 г. Findlay и соавт. одними из первых продемонстрировали эффективность интратекального применения РТПА для профилактики СС в эксперименте [12].

В последующем была показана эффективность интратекального применения фибринолитиков для профилактики СС у обезьян [13, 14, 42], собак [6, 33], кроликов [21], мышей [40], кошек [45].

Для моделирования СС использовались различные способы воспроизведения кровоизлияния, такие как одно- или двукратное введение крови в субарахноидальное пространство, хирургическая имплантация сгустка крови в область интракраниальных сосудов, эндovasкулярная перфорация сосуда [48]. В качестве фибринолитического препарата в большинстве экспериментальных работ использовали РТПА и урокиназу [6, 13, 14, 19, 21, 33, 40, 42, 45]. Для оценки выраженности спазма в большинстве исследований использовали ангиографию и морфологическое исследование [12–14, 19, 21, 33, 39], в отдельных исследованиях измеряли показатели перфузии головного мозга [40, 42]. Несмотря на такое большое количество экспериментальных работ, четких преимуществ и недостатков различных животных моделей, способов моделирования СС, обоснования выбора фибринолитика, способов оценки терапии в литературе мы не встретили.

Работы Findlay и соавт. (1991), Ohman и соавт. (1991), Zabramski и соавт. (1991) одними из первых продемонстрировали эффективность интратекального применения РТПА для профилактики симптомного СС у больных в остром периоде субарахноидального кровоизлияния [15, 34, 46]. Sasaki и соавт. (1994) на серии из 53 пациентов с аневризматическим САК показали эффективность введения РТПА: выраженный ангиографический и симптомный спазм отсутствовал у всех пациентов. [38]. Kodama и соавт. (2000) на серии из 217 пациентов с массивным субарахноидальным кровоизлиянием (Fisher III) продемонстрировали

эффективность инфузии урокиназы в сочетании с аскорбиновой кислотой, что позволило снизить встречаемость симптомного сосудистого спазма до 2,8% [24]. В работе Kinouchi и соавт. (2004) была продемонстрирована эффективность интратекального применения РТПА на серии из 70 пациентов [23]. Ramakrishna и соавт. (2010), сравнив эффект интравентрикулярного введения РТПА у 41 больного с результатами лечения 35 пациентов в контрольной группе, показали достоверное снижение симптомного спазма и гидроцефалии в лечебной группе [36].

Однако в ряде других исследований была показана малая эффективность применения интратекального фибринолиза для профилактики СС и улучшения исходов лечения [10, 11, 16, 19]. В литературе описаны следующие осложнения: внутрочерепные (повторные субарахноидальные, субдуральные, эпидуральные) кровоизлияния, судорожные припадки, менингиты (в связи с длительным цистернальным и вентрикулярным дренированием), усиление кровоточивости мягких тканей (при интраоперационном применении), нижняя параплегия [22–24, 36, 38, 47]. Так Ohman и соавт. (1991) описали случай внутрочерепного кровоизлияния и один случай формирования эпидуральной гематомы в группе из 30 пациентов [34]. Zabramski и соавт. (1991) отмечали локальное усиление кровоточивости из мягких тканей после введения РТПА и один случай формирования эпидуральной гематомы в группе из 15 пациентов [46]. Findlay и соавт. (1991) описали случай формирования эпидуральной гематомы в раннем послеоперационном периоде в группе из 13 пациентов [15]. Исследование Hdnngi и соавт. (2009) было досрочно прекращено в связи возникновением 2 случаев параплегии неясного генеза в группе из 9 пациентов, получавших урокиназу [51].

Таким образом, несмотря на большое количество работ, показывающих эффективность введения фибринолитиков для профилактики СС, интратекальный фибринолиз при САК сегодня не является доказанно эффективным способом улучшения исходов лечения и не рекомендован для рутинного использования в европейских и американских протоколах по ведению больных с САК [28, 50, 52]. Данных о применении рекомбинантной стафилокиназы для профилактики сосудистого спазма в литературе нами встречено не было.

При выборе экспериментальной модели в данной работе мы руководствовались собственными данными и данными литературы. К преимуществам моделирования СС у крыс можно отнести схожесть морфологических изменений сосудов головного мозга у крыс с изменениями, происходящими при СС у человека, и нетребовательность животных к содержанию, что позволяет проводить крупные экспериментальные работы на большом количестве животных [1, 3–5, 48].

Одной из наиболее распространенных методик моделирования СС является двукратное введение крови в затылочную цистерну крысы через мик-

рокатетер или пункционно [17, 43, 48]. По данным литературы, однократное введение крови не всегда приводит к формированию СС, что обуславливает необходимость ее повторного введения [25, 29, 48].

Ранее нами был использован метод дренирования затылочной цистерны микрокатетером с последующим двукратным введением крови [4]. Однако одним из основных недостатков данной методики являлась сложность пассивной санации цистерны через установленный дренажный катетер. Вероятно, это связано с его крайне малым внутренним диаметром и относительно небольшим объемом затылочной цистерны, что создавало условия для тромбоза катетера и сложности точного контроля объема дренированной ЦСЖ. В связи с этим мы предложили методику формирования подкожного кармана для санации ЦСЖ, при использовании которой можно пункционно выводить ЦСЖ через необходимые промежутки времени.

Летальность животных, по данным различных авторов, при двукратном введении крови в затылочную цистерну крысы может достигать до 50% (Gursier и соавт. — 25-43%, Lee и соавт. — до 40%, Vatter и соавт. — 47%) [17, 25, 43]. В рамках проведенной нами работы летальность не превышала 40%.

В данной работе оценивали эффективность альтеплазы (РТПА) и фортеплазы (рекомбинантная стафилокиназа). Оба фибринолитика являются селективными фибринолитическими препаратами 3-го поколения, т.е. препаратами, которые имеют высокое сродство к фибрину, образовавшемуся в тромбе, и низкое влияние на системные показатели гемостаза [8, 9, 27, 44].

Альтеплаза — один из наиболее широко применяемых в клинической практике фибринолитиков, который обширно используется для тромболитической терапии при инфаркте миокарда, ишемическом инсульте и тромбоэмболии легочной артерии. В США альтеплаза — единственный фибринолитический препарат, сертифицированный для тромболитической терапии при остром инфаркте миокарда и ишемическом инсульте [20, 32].

Фортеплаза — препарат из группы рекомбинантной стафилокиназы. По данным ряда авторов, фибринолитическая избирательная активность стафилокиназы выше, чем у большинства известных фибринолитических препаратов, в том числе альтеплазы [9, 27, 44].

Большинство известных тромболитических препаратов обладает видовой фибрино- и фибриногенолитической специфичностью [9, 27, 44]. Подобная видовая специфичность определяется различным сродством фибринолитиков к плазминогену и фибрину. Избирательная фибринолитическая активность определяется сродством к комплексу плазминоген-фибрин, находящемуся непосредственно в тромбе. Достоверно известно, что активность фибринолитической системы крысы в кровотоке под действием РТПА (альтеплаза) возрастает [6, 37] и резистентна к действию пре-

паратов рекомбинантной стафилокиназы (фортеплазы) [27, 44]. Ранее мы продемонстрировали спазмогенный эффект человеческой крови у крыс [5]. Таким образом, при использовании человеческой крови для моделирования СС в сгустке крови находятся именно человеческие фибрин и плазминоген, что создает условия для функционирования рекомбинантной стафилокиназы в эксперименте.

На основании выполненной работы нами была предложена шкала морфологической оценки выраженности СС у крыс. Аналогичных шкал для оценки выраженности СС в литературе мы не встретили.

В ходе морфологического анализа выявлено, что СС различной степени выраженности встречался у всех животных после двукратного введения крови в субарахноидальное пространство. По нашим данным, у крыс при двукратном введении крови в затылочную цистерну формируется СС с преимущественным формированием умеренного (50%) и выраженного (33%) сосудистого спазма. При использовании интратекальной фибринолитической терапии нами был получен положительный эффект в виде увеличения доли препаратов со слабовыраженным спазмом до 30—50% и отсутствия выраженного спазма. Таким образом, можно говорить об эффективности фибринолитической терапии как меры профилактики сосудистого спазма при САК.

При изучении вещества головного мозга у крыс была выявлена зависимость между степенью нарушений микроциркуляции и выраженностью спазма ОА. Помимо этого, при сравнении препаратов контрольной группы и препаратов лечебных групп было отмечено уменьшение выраженности периваскулярного отека вещества головного мозга после проведения интратекального фибринолиза. Мы считаем, что эти данные требуют дальнейшего изучения и могут являться целью отдельной работы.

## Заключение

Данная работа демонстрирует снижение степени выраженности сосудистого спазма у крыс при интратекальном применении альтеплазы и фортеплазы, что свидетельствует о потенциальной эффективности фибринолитической терапии для профилактики сосудистого спазма при нетравматических субарахноидальных кровоизлияниях.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

*В.В. Крылов* — академик РАН, д.м.н., проф., заведующий научным отделением неотложной нейрохирургии НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, заведующий кафедрой нейрохирургии и нейрореанимации МГМСУ им. А.И. Евдокимова; директор клинического медицинского центра МГМСУ им. А.И. Евдокимова, главный нейрохирург Министерства здравоохранения РФ



*А.В. Природов* — к.м.н., заведующий нейрохирургическим отделением НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

*Г.П. Титова* — д.м.н., проф., заведующая научной лабораторией электронной микроскопии

*С.С. Дыдыкин* — д.м.н., проф., заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

*С.С. Маркин* — д.м.н., профессор кафедры клинической фармакологии и фармакотерапии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

*Е.Ю. Бахарев* — врач-нейрохирург НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

*О.О. Кочеткова* — врач-нейрохирург НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

*И.А. Усов* — клинический ординатор отделения нейрохирургии НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Крылов В.В., Гусев С.А., Титова Г.П., Гусев А.С. Сосудистый спазм при субарахноидальном кровоизлиянии / Москва., 2001 г., 208 с
2. Хирургия аневризм головного мозга. В 3-х томах. Под редакцией Крылова В.В., Москва, 2011, Том 1.
3. Природов А.В., Бахарев Е.Ю.: Экспериментальные модели изучения сосудистого спазма при нетравматическом субарахноидальном кровоизлиянии *in vivo*, Нейрохирургия №3, 2014
4. Природов А.В., Титова Г.П., Дыдыкин С.С., Бахарев Е.Ю., Кочеткова О.О., Усов И.А., Крылов В.В.: Моделирование церебрального сосудистого спазма при нетравматическом субарахноидальном кровоизлиянии *in vivo*, Нейрохирургия №1 2015
5. Природов А.В., Титова Г.П., Дыдыкин С.С., Маркин С.С., Бахарев Е.Ю., Кочеткова О.О., Усов И.А.: Модель церебрального сосудистого спазма у крыс с использованием человеческой крови, Нейрохирургия №4 2015, с. 54-59.
6. Chung W.Y., Lee L.S. (1993) The effect of tissue plasminogen activator (t-PA) on cerebral vasospasm in canine subarachnoid hemorrhage. *ChungHwaiHsuehTsaChih* 52:298-306.
7. Cleland P.G., Macfarlane J.T., Baird D.R., Greenwood B.M. Fibrin degradation products in the cerebrospinal fluid of patients with pneumococcal meningitis. *J NeurolNeurosurg Psychiatry*. 1979 Sep;42(9):843-6.
8. Clifton G.D. Antithrombotic therapy after intracoronary stent placement. *Am J Health Syst Pharm*. 1997 Feb 15;54(4):437-40
9. Collen D., Lijnen H.R. New approaches to thrombolytic therapy. *Arteriosclerosis*. 1984 Nov-Dec;4(6):579-85.
10. Eicker S.O., Beseoglu K., Etmann N. et al. The effect of intraventricular thrombolysis in combination with low-frequency head motion after severe subarachnoid hemorrhage: interim analysis of safety, clot clearance rate and delayed cerebral ischemia. *ActaNeurochir Suppl*. 2012;114:323-8.
11. Etmann N., Beseoglu K., Eicker S.O. et al. Prospective, randomized, open-label phase II trial on concomitant intraventricular fibrinolysis and low-frequency rotation after severe subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2013 Aug;44(8):2162-8.
12. Findlay J.M., Weir B.K., Steinke D. et al. Effect of intrathecal thrombolytic therapy on subarachnoid clot and chronic vasospasm in a primate model of SAH. *J Neurosurg*. 1988 Nov;69(5):723-35.
13. Findlay J.M., Weir B.K., Gordon P., et al. Safety and efficacy of intrathecal thrombolytic therapy in a primate model of cerebral vasospasm. *Neurosurgery*. 1989 Apr;24(4):491-8.
14. Findlay J.M., Weir B.K., Kanamaru K. et al. The effect of timing of intrathecal fibrinolytic therapy on cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1990 Feb;26(2):201-6.
15. Findlay J.M., Weir B.K., Kassell N.F. et al. Intracisternal recombinant tissue plasminogen activator after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1991 Aug;75(2):181-8.
16. Findlay J.M., Kassell N.F., Weir B.K. et al. A randomized trial of intraoperative, intracisternal tissue plasminogen activator for the prevention of vasospasm, *Neurosurgery*. 1995 Jul;37(1):168-76
17. Gьresir E., Raabe A., Jaiimsin A. et al. Histological evidence of delayed ischemic brain tissue damage in the rat double-hemorrhage model. *J Neur. Scien*. 293 (2010) 18-22
18. Handa Y., Weir B.K.A., Nosko M. et al: The effect of timing of clot removal on chronic vasospasm in a primate model. *J Neurosurg* 67:558-564, 1987.
19. Hariton G.B., Findlay J.M., Weir B.K. et al. (1993). Comparison of intrathecal administration of urokinase and tissue plasminogen activator on subarachnoid clot and chronic vasospasm in a primate model. *Neurosurgery* 33:691-6.
20. Jauch E.C. et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association; *Stroke*. 2013 Mar;44(3):870-947
21. Kawada S., Kinugasa K., Meguro T. et al. (1999) Experimental study of intracisternal administration of tissue-type plasminogen activator followed by cerebrospinal fluid drainage in the ultra-early stage of subarachnoid haemorrhage. *ActaNeurochir* 141:1331-8.
22. Keyrouz S.G., Diring M.N.; Clinical review: Prevention and therapy of vasospasm in subarachnoid hemorrhage; *Crit Care*. 2007;11(4):220.
23. Kinouchi H., Ogasawara K., Shimizu H. et al. Prevention of symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage by intraoperative cisternal fibrinolysis using tissue-type plasminogen activator combined with continuous cisternal drainage. *Neurologia Medico-chirurgica* 2004, 44:569-575
24. Kodama N., Sasaki T., Kawakami M. et al. Cisternal irrigation therapy with urokinase and ascorbic acid for prevention of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Outcome in 217 patients; *Surg Neurol*. 2000 Feb;53(2):110-7.
25. 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.
26. Lie J.T., Holley K.F., Kampa W.R. et al.: New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia.; «Proc. Mayo Clin.», 1971, v. 46, p. 319. +
27. Lijnen H.R., De Cock F., Matsuo O. & Collen D. Comparative fibrinolytic and fibrinogenolytic properties of staphylokinase and streptokinase in plasma of different species *in vitro*. *Fibrinolysis* 6, 33-37 (1992) .
28. Macdonald R.L., Jaja B., Cusimano M.D. et al. SAHIT Collaboration: SAHIT Investigators--on the outcome of some subarachnoid hemorrhage clinical trials; *Transl Stroke Res*. 2013 Jun;4(3):286-96
29. Meguro T., Clower B.R., Carpenter R. et al. Improved rat model for cerebral vasospasm studies. *Neurol Res Oct* 2001;23(7):761-6
30. Mizukami M., Kawase T., Usami T., Tazawa T. Prevention of vasospasm by early operation with removal of subarachnoid blood. *Neurosurgery*. 1982 Mar;10(3):301-7.
31. Nosko M., Weir B.K., Lunt A. et al. Effect of clot removal at 24 hours on chronic vasospasm after SAH in the primate model. *J Neurosurg*. 1987 Mar;66(3):416-22.
32. O'Gara P.T., Kushner F.G., Ascheim D.D. et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am CollCardiol*. 2013; 61: e78-140.
33. Ohkuma H., Parney I., Megyesi J. et al. Antisense preproendothelin-oligoDNA therapy for vasospasm in a canine model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1999 Jun;90(6):1105-14.
34. Ohman J., Servo A., Heiskanen O. Effect of intrathecal fibrinolytic therapy on clot lysis and vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1991 Aug;75(2):197-201.
35. Ohta H., Ito Z., Yasui N. et al. Extensive Evacuation of subarachnoid clot for prevention of vasospasm effective or not? *ActaNeurochir* 63:111-116, 1982.

36. Ramakrishna R., Sekhar L.N., Ramanathan D. et al. Intraventricular tissue plasminogen activator for the prevention of vasospasm and hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 2010;67: 110-117.
37. Rijken D.C., Emeis J.J. Clearance of the heavy and light polypeptide chains of human tissue-type plasminogen activator in rats. *Biochem J.* 1986 Sep 15;238(3):643-6.
38. Sasaki T., Ohta T., Kikuchi H. et al. A phase II clinical trial of recombinant human tissue-type plasminogen activator against cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage; *Neurosurgery.* 1994 Oct;35(4):597-604.
39. Seifert V., Eisert W.G., Stolke D., Goetz C. Efficacy of single intracisternal bolus injection of recombinant tissue plasminogen activator to prevent delayed cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 1989 Oct;25(4):590-8.
40. Siler D.A., Gonzalez J.A., Wang R.K. et al. Intracisternal administration of tissue plasminogen activator improves cerebrospinal fluid flow and cortical perfusion after subarachnoid hemorrhage in mice. *Transl Stroke Res.* 2014 Apr;5(2):227-37. doi: 10.1007/s12975-014-0329-y. Epub 2014 Feb 14.
41. Smith R.R., Clower B.R., Grotendorst G.M. et al. Arterial wall changes in early human vasospasm, *Neurosurgery.* 1985 Feb;16(2):171-6.
42. Suzuki H., Kanamaru K., Kuroki M. et al. Effects of unilateral intrathecal administrations of low dose tissue-type plasminogen activator on clot lysis, vasospasm and brain phospholipid hydroperoxidation in a primate model of bilateral subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res.* 1998 Oct;20(7):625-31.
43. Vatter H., Weidauer S., Konczalla J. 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.
44. Verstraete M. Third-Generation Thrombolytic Drugs. // *The American Journal of Medicine.* 2000;109:52-58.
45. Yamamoto Y., Clower B.R., Haining J.L., Smith R.R. Effect of tissue plasminogen activator on intimal platelet accumulation in cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage in cats. *Stroke.* 1991 Jun;22(6):780-4.
46. Zabramski J.M., Spetzler R.F., Lee K.S. et al. Phase I trial of tissue plasminogen activator for the prevention of vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 1991 Aug;75(2):189-96.
47. Zhang Y.P., Shields L.B., Yao T.L. et al. Intrathecal treatment of cerebral vasospasm; *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013 Nov;22(8):1201-11.
48. Zoerle T., Ilodigwe D., Wan H. et al. Pharmacologic reduction of angiographic vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage: systematic review, *Acta Neurochir Suppl.* 2013;115:247-51.
49. Andreenko G.V., Lyutova L.V., Shimonaeva E.E. Changes of the fibrinolytic system of animals induced by injection of tissue plasminogen activator. *Thromb Res.* 1982 Aug 1;27(3):279-88.
50. Connolly E.S. Jr et al.. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/american Stroke Association; *Stroke.* 2012 Jun;43(6): 1711-37.
51. Hänggi D., Eicker S., Beseoglu K. et al. A multimodal concept in patients after severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a controlled single centre prospective randomized multimodal phase I/II trial on cerebral vasospasm; *Cent EurNeurosurg.* 2009 May;70(2):61-7.
52. Steiner T., Juvola S., Unterberg A. et al. European Stroke Organization: European Stroke Organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage; *Cerebrovasc Dis.* 2013;35(2):93-112. doi: 10.1159/000346087. Epub 2013 Feb 7