

УДК 615.214.2; 616.831-005-092.4

МЕТОДЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОСТРЫХ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРОВ

И.Н. Тюренок¹, Д.В. Куркин¹, А.А. Литвинов¹, Е.А. Логвинова¹,
Е.И. Морковин¹, Д.А. Бакулин¹, Е.В. Волотова^{1*}

Резюме. Успех разработки новых лекарственных препаратов в значительной степени зависит от методологии доклинических исследований. Для поиска средств с церебропротекторным действием существует множество экспериментальных моделей, различающихся в основном этиологическим фактором и сложностью воспроизведения. В данном обзоре описаны и охарактеризованы наиболее распространённые модели воспроизведения нарушений мозгового кровообращения, кратко представлены процедуры моделирования и опыт использования некоторых моделей в собственной исследовательской практике.

Ключевые слова: нарушение мозгового кровообращения, экспериментальные модели, окклюзия средней мозговой артерии, фототромбоз, эндотелин-1, крысы.

ACUTE STROKE MODELS USED IN PRECLINICAL RESEARCH

I.N. Tyurenkov¹, D.V. Kurkin¹, A.A. Litvinov¹, E.A. Logvinova¹, E.I. Morkovin¹, D.A. Bakulin¹, E.V. Volotova^{1*}

Abstract. The success of developing new drugs largely depends on the methodology of preclinical research. For developing cerebroprotective drugs, there are many experimental models with different complexity. In this review the most used stroke models are described and characterized, model procedures briefly described, own research experience in utilizing some model methods in establishing efficacy of drugs is also described.

Keywords: stroke, experimental models, middle cerebral artery occlusion, photothrombosis, endothelin-1, rats.

1 – ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

1 – Volgograd State Medical University, Ministry of Healthcare, 1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, 400131, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: strannik986@mail.ru
Тел.: 8 (937) 533 49 99

ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания имеют высокий удельный вес в структуре заболеваемости, временной нетрудоспособности, первичной инвалидизации и смертности. Вследствие этого остается по-прежнему актуальным поиск новых средств для лечения нарушений мозгового кровообращения (НМК) [1]. Успех поиска и разработки новых лекарственных препаратов для лечения любых заболеваний зависит от методологии доклинических исследований. Выбор методов моделирования НМК, объектов и валидных показателей, отражающих течение патологического процесса до и после проводимой терапии, является важнейшей задачей экспериментальной медицины.

Наиболее часто моделирование НМК проводится на грызунах, главным образом крысах, мышах и песчанках; меньше (по этическим и материальным причинам) используются кошки, со-

баки, свиньи и приматы. Подробные протоколы исследований и моделей, а также отзывы о преимуществах и недостатках их использования описаны достаточно подробно во многих работах [2–5]. Однако сравнительное, комплексное описание данных методов в рамках одной публикации встречается редко. Модели глобальной ишемии, приводящие к снижению кровообращения во всем объеме головного мозга, в первую очередь, воспроизводят церебральную ишемию, возникающую вследствие остановки сердца, выраженной гипотензии или реже хирургических процедур, нарушающих кровотоки. Однако максимально близко клиническую ситуацию, связанную с развитием острого ишемического инсульта, воспроизводят модели фокальных поражений мозговой ткани, чаще обусловленные окклюзией просвета среднемозговой артерии (СМА). Окклюзия сосуда, как правило, достигается за счет использования мелких нитей, сгустка крови или протромботического

препарата [2, 3, 5]. Транзиторная окклюзия сосуда позволяет воспроизводить эффекты спонтанной реперфузии или успешного тромболизиса.

На сегодняшний момент нет идеальной модели инсульта. Основными причинами этого, на которые следует обратить внимание исследователей при моделировании НМК, являются гетерогенность данной патологии и наличие сопутствующих заболеваний. Гетерогенность инсульта отражает широкое разнообразие его клинических проявлений, которые зависят не только от причины, локализации, размера повреждения, функционального состояния субъекта. Большинство животных, включая грызунов, демонстрируют столь же высокую степень разнообразия строения мозговой сосудистой сети (строение виллизиева круга, средней мозговой артерии, коллатералей, образованных от слияния трех пар: задних, средних и передних мозговых артерий, и т.д.), как и человек [6], что при моделировании НМК создаёт определенные трудности для получения однородных качественных и количественных показателей. Даже инбредные штаммы грызунов, такие как мыши C57BL/6 [7, 8] и разные штаммы крыс или песчанок [6], характеризуются большой степенью неоднородности анатомии церебрального сосудистого русла, что при моделировании инсульта влияет на их чувствительность к инсульту, тяжесть его течения, исход, выраженность неврологических нарушений и действие фармакологических веществ [9].

Предварительное создание коморбидного фона у животного при воспроизведении фокальной ишемии

приближает состояние к реальным условиям возникновения и течения острого НМК. Наличие гипертензии, гипергликемии и диабета всегда должно учитываться в случае моделирования специфических НМК, однако более глобальные последствия влияния метаболического синдрома и атеросклероза остаются неясными в отношении моделей НМК у животных [6]. Так, например, широко описано в литературе использование спонтанно гипертензивных крыс (СГК) в качестве модели с высоким риском возникновения инсульта [10, 11]. Их применение позволяет создать близкий к реальной клинической ситуации патофизиологический фон возникновения и течения инсульта, обусловленного артериальной гипертензией.

В данном обзоре описаны и охарактеризованы наиболее распространённые модели воспроизведения нарушений мозгового кровообращения, кратко описаны процедуры моделирования, представлен опыт использования некоторых моделей в собственной исследовательской практике для оценки эффективности разрабатываемых лекарственных средств.

МЕТОДЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Классификации моделей ОНМК и животных, используемых в качестве субъектов исследования на этих моделях, широко представлены в литературе [12–14]. Одна из последних представлена на рисунке 1.



Рисунок 1. Классификация моделей для создания НМК [15]

Выбор модели очень важен и существенно влияет на получаемые результаты, и, как уже говорилось выше, ни одна модель не может в полной мере воссоздать клиническую картину заболевания и процессы, происходящие при инсульте у человека, вследствие гетерогенности и индивидуальности патогенетических факторов, приводящих к ОНМК. Достаточно большое количество исследований по воспроизведению НМК, в частности окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА), было проведено на крупных животных: кошках [16–18] и приматах [19, 20], однако величины объема инфаркта варьировались в очень широких пределах, а стоимость разведения и содержания таких животных, их размеры (дозирование наркотических и лечебных веществ, условия содержания и т.п.) и гуманистические соображения в современных условиях не позволяют использовать их в большинстве экспериментальных исследований. Лабораторная крыса является наиболее подходящим объектом для моделирования НМК вследствие относительно невысокой стоимости, малого размера и хорошей изученности анатомического строения головного мозга, физиологии кровообращения и патофизиологии его нарушений.

В данном обзоре мы будем касаться моделей, выполняемых на крысах.

МОДЕЛЬ ОККЛЮЗИИ СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ

В 1975 году Robinson и его коллеги [21] адаптировали методику прямой окклюзии проксимальной ветви средней мозговой артерии для крыс. В 1981 году группа исследователей под руководством А. Тамура [22] описала технику выполнения этой операции на крысах. Предложенная авторами модель достаточно сложна в исполнении, объем инфаркта мозга в результате был мал и не вызывал выраженной неврологической симптоматики, а возникающие симптомы психоневрологического дефицита исчезали в течение относительно короткого времени (5–8 суток) без фармакологического вмешательства. Более того, выполнение данной модели сопряжено с необходимостью обеспечения очень тщательного послеоперационного ухода и наблюдения за подопытными животными. В разные годы многими учеными предпринимались попытки увеличить объем инфаркта с помощью использования различных хирургических подходов или использования отдельных линий животных [23–26]. В настоящее время наибольшее распространение имеет техника прямой окклюзии центрального ствола среднемозговой артерии отдельно или в комбинации с постоянной / транзиторной односторонней / двусторонней окклюзией общих сонных артерий (ОСА) (в различных режимах) [27, 28]. В исследованиях А.А. Шмолина с соавторами [29] показано, что из

всех модификаций моделей перевязки СМА и ОСА для фармакологического скрининга наиболее приемлема модель 40-минутного пережатия ОСА и окклюзии левой СМА, поскольку именно эта комбинация позволяла получить наиболее однородные показатели повреждения головного мозга [29]. Основным достоинством данной техники воспроизведения фокальной ишемии головного мозга, по нашему мнению, является визуализация процесса, обеспечивающая приемлемую стандартизацию (экспериментатор видит сосуд и его окклюзию) и оперативный контроль выполнения окклюзии артерии, что практически невозможно осуществить при иных методах ОСМА. При совершении ошибки экспериментатором методика позволяет своевременно исключить животное из экспериментальной группы, в то время как при иных методах моделирования решение об исключении животного принимается спустя несколько часов на основании отсутствия у него признаков неврологического дефицита. Самыми существенными недостатками, по нашему мнению, являются методические трудности при выполнении хирургических манипуляций и необходимость отработки модели на большом количестве животных, поскольку степень анатомической разветвленности средней мозговой артерии удаётся определить только при её визуализации, а решение о проведении окклюзии принимается экспериментатором только после обеспечения оперативного доступа к сосуду. Так, если в трепанационном отверстии не визуализируется центральная ветвь сосуда, а обнаруживается 1–2 или более сосудов, дальнейшие манипуляции с этим животным не имеют смысла, поскольку это указывает на то, что средняя мозговая артерия очень сильно ветвится. Даже при окклюзии этих ветвей, расположенных в пределах оперативного окна, патология не будет валидной, так как неврологический дефицит будет легкой степени, а через 3–5 дней все нарушения компенсируются без фармакологического вмешательства. В своих экспериментах, как и в литературных источниках, мы обнаружили, что средняя мозговая артерия у разных животных имеет не только неодинаковое количество ветвей и анастомозов, но и различный уровень начала их ветвления [30]. Также методика требует повышенного внимания к стерильности инструментария и операционного поля, а большое число потенциально травматичных манипуляций обязывает к тщательному послеоперационному уходу и наблюдению за животными.

Воспроизведение методики

После выполнения подготовительных процедур (описаны ниже) осуществляется вентральный срединный разрез в области шеи с последующим разделением тупым методом грудино-подъязычной и грудино-сосцевидной мышц. Выделяют правую и левую ОСА и

подводят под них лигатуру, в результате чего они изолируются от окружающих тканей.

Крысу переворачивают на левую сторону. Осуществляют надрез длиной около 2 см между боковым углом щели правого глаза и наружным слуховым проходом. Нижележащая височная мышца выделяется; под ней визуализируется височный нерв, артерия и вена. Далее височная мышца осторожно рассекается и убирается для доступа к черепу. Выделяется скуловая дуга, и большая ее часть удаляется. Верхнее крыло нижнечелюстной кости и мышцы отводятся для обеспечения доступа к нижневисочной ямке.

С помощью бормашины в чешуйчатой кости производится небольшое отверстие (диаметром от 4 до 6 мм на глубину от 0,5 до 1,0 мм при постоянном контроле ее твердости), которое находится примерно 3 мм спереди и 1 мм сбоку от овального отверстия и нижнечелюстного нерва, в непосредственной близости от дуги роострума. Кость черепа и трепанационное отверстие периодически орошаются стерильным физиологическим раствором.

Твердая мозговая оболочка вскрывается крестообразным или круговым надрезом иглы 23-го размера. СМА пролегает от нижней части черепа в поперечном направлении к теменной стороне. Артерия, как правило, имеет несколько ветвей, которые в значительной степени различаются у разных животных. Среднюю мозговую артерию пересекает нижняя церебральная вена. Изогнутыми пинцетами Dumont захватывают СМА и приподнимают на 1 мм до положения чуть выше или ниже нижней церебральной вены; затем под СМА подводят стерильную капроновую лигатуру или пережигают с помощью электрокоагуляции, что требует определенного навыка, поскольку существует риск возникновения кровотечения из-за прилипания части сосуда или кровяного сгустка к жалю коагулятора, что при его отведении ведёт к разрыву сосуда выше или ниже места прижигания.

Вследствие анатомической изменчивости СМА обычно имеет несколько различных ветвей, что диктует необходимость проводить окклюзию максимально широкого участка артерии с последующей визуализацией результата операции. Для ограничения вариабельности инфаркта при этой модели инсульта только один основной ствол артерии должен быть коагулирован. Если основной ствол СМА не может быть идентифицирован, то животное должно быть исключено из эксперимента.

После окклюзии рана орошается теплым стерильным физиологическим раствором, который быстро собирается ватным аппликатором.

Трепанационное отверстие герметизируется с помощью специальных средств Tissumend (Veterinary Products Laboratories) или Nexaband (Closure Medical

Corporation). Топографию мышц восстанавливают и рану послойно ушивают стерильным шовным материалом.

Левую ОСА обратимо (через некоторое время в зависимости от конкретной методики, лигатура удаляется для последующей реперфузии) или необратимо окклюдировать, и после всех манипуляций рана ушивается стерильным шовным материалом.

Метод наркотизации и средства для наркоза и его доза, как правило, подбираются таким образом, чтобы его длительность не превышала 20 мин после завершения операции.

Далее осуществляется мониторинг неврологического и моторного дефицита. Крысы, которые не демонстрируют односторонний парез конечностей или другие симптомы неврологического дефицита, исключаются из дальнейшего исследования.

В случае применения модели временной окклюзии СМА, как правило с помощью микроклипс или временного наложения и стягивания лигатуры, ее используют совместно с временной (от 30 мин до 2 ч) окклюзией общих сонных артерий.

Описанные выше хирургические манипуляции обычно занимают от 20 до 25 мин.

МОДЕЛИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЭНДОТЕЛИНА-1

Эндоотелин-1 является соединением с выраженными вазоспастическими свойствами. Он оказывает быстрое и длительное вазоконстрикторное действие на гладкомышечные клетки сосудов и снижает локальный кровоток, вызывая ишемию тканей [31]. В основном используются две модели ишемии головного мозга с применением эндоотелина-1, они различаются по способу его доставки к месту её локализации: местная аппликация эндоотелином-1 выделенной СМА [21], внутримозговая инъекция по стереотаксическим координатам [32] или под оболочки головного мозга [33]. Аппликацию эндоотелином-1 можно проводить в различных областях мозга для воспроизведения повреждения конкретных зон [34, 35].

Моделирование ишемии головного мозга с использованием эндоотелина-1 удобно ввиду простоты выполнения методики. При этом размер инфаркта зависит от количества вводимого вазоконстриктора или площади и продолжительности аппликации. К недостаткам модели можно отнести высокую стоимость эндоотелина-1 и необходимость точного ограничения зоны его нанесения, поскольку затекание раствора вазоконстриктора под оболочки мозга при аппликации или неконтролируемое его распространение при субдуральном введении делает размер ишемии труднопредсказуемым.

Воспроизведение методики

Выполнение этой модели заключается в том, что наркотизированному животному после подготовительных работ производится операционный доступ к поверхности черепа по методике Tamura [22], как описано выше, и далее по стереотаксическим координатам проделывается трепанационное отверстие диаметром 3–4 мм, через которое визуализируется ветвь средней мозговой артерии. После визуализации сосуда вокруг него накладывают силиконовый ограничитель (силиконовое кольцо, в просвете которого и будет находиться вазоконстриктор) и шприцем Гамильтона производят подачу раствора эндотелина-1 на поверхность сосуда. Наблюдают сильно выраженную вазоконстрикцию. Возможна количественная оценка степени сужения сосуда путем регистрации уровня локального мозгового кровотока лазерным доплерографическим флуометром в том же трепанационном окне. После проведения всех манипуляций рану обрабатывают антисептическими средствами и ушивают стерильным шовным материалом.

При внутримозговых инъекциях эндотелином-1 или при его субдуральном введении хирургические манипуляции аналогичны описанным выше, разница состоит лишь в размере трепанационного отверстия, в данном случае оно приблизительно соответствует диаметру иглы шприца Гамильтона [31]. В этом случае сосуды не визуализируются и исследователь полагается только на стереотаксические координаты или данные доплерографии, отражающие падение мозгового кровотока. Так, направляющую канюлю 26-го размера размещают в зоне грушевидной коры головного мозга на 1 мм дорсальнее СМА (на 0,2 мм впереди и 5,9 мм латеральнее брегмы, 7,0 мм ниже твердой мозговой оболочки) и закрепляют акрилатным цементом. В ее просвет вставляется канюля-вставка 31-го размера для поддержания проходимости просвета. Животное помещается как минимум на неделю в клетку. Для создания вазоконстрикции через канюлю 31-го размера, которая вводится на 1 мм глубже конца направляющей, вводят эндотелин-1 (120 пмоль растворяют в 3 мкл физиологического раствора). Через 10 мин фиксируют снижение кровотока. Описанные выше хирургические манипуляции, как правило, занимают от 3 до 5 мин.

МОДЕЛИ ИНСУЛЬТА, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИНТРАЛЮМИНАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИЕЙ НИТИ

Модель внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) с помощью монофиламента широко используется для исследования острой фокальной ишемии головного мозга и его отека с момента первого её описания в 1986 году Koizumi [36], однако относительно высокая вариабельность размеров

инсульта является существенным недостатком этой модели. Качество воспроизведения ишемии головного мозга этим методом зависит от корректности введения монофиламента через общую сонную артерию до внутренней сонной артерии, а затем до места ее вхождения в виллизиев круг и отхождения от него средней мозговой артерии. Модель требует отработанного навыка у исследователя, а также наличия специального монофиламента, размер и эластические свойства которого и будут определять простоту его продвижения в сосуде и степень его обтурации. Специально для этой модели были разработаны различные виды монофиламентов, в том числе и имеющие разные размеры от 3-0 до 4-0 [36], покрытые кремнием, поли-L-лизинном и другими материалами или без покрытия, но с механически притупленным кончиком [37]. Наиболее часто используемым и оптимальным, по нашему мнению, является применение методики подготовки филамента путем притупления кончика нейлонового монофиламента 3-0, а затем его покрытия поли-L-лизинном [38]. Поли-L-лизин способствует адгезии клеток и белков к стеклянной и пластиковой поверхностям. Это вещество образует монослой, который, как полагают, меняет отрицательный заряд поверхности филамента на положительный, что притягивает анионные участки эндотелиальных клеток и вызывает «прилипание» филамента к поверхности эндотелия, препятствуя потоку крови вокруг филамента.

Таким образом, в настоящее время существует две категории монофиламентов (без покрытия и с покрытием), используемые в этой модели ОСМА. Непокрытые монофиламенты включают те, которые притупляются нагревом; монофиламенты с покрытием включают обработанные поли-L-лизинном, силиконовым полимером или каучуком.

Использование монофиламента без покрытия часто приводит к внутримозговым кровотечениям в результате перфорирования сосуда в полости черепа, что особенно часто происходит при сопутствующей эндотелиальной дисфункции, например, если методика воспроизводится на старых животных или животных с экспериментальным сахарным диабетом, и неполной окклюзии, так как отсутствие утолщения на конце филамента и процессов адгезии клеток на поверхности силикона делают возможным обтекание его кровью, что приводит к неполной окклюзии сосуда. Монофиламенты с поли-L-лизинным покрытием улучшают окклюзию, но также повышают риск кровотечения из-за их клейких концов, которые могут разорвать люминальную поверхность артерий при изъятии филамента из сосуда для реперфузии. Подробное описание, а также способы подготовки филаментов описаны в литературе [12, 38].

Данная модель является вариантом НМК, обусловленным закрытием просвета мозгового сосуда тромбом или прогрессирующей атеросклеротической бляшкой. Она этиологически и патогенетически наи-

более близка к клиническому варианту развития цереброваскулярной недостаточности, а ее воспроизведение позволяет получить достаточно однородные размеры инсульта. Более того, модель предполагает различные варианты развития, различающиеся в основном техникой исполнения, временем окклюзии и полнотой реперфузии, что также является важным ее преимуществом [39, 40].

Недостатком данной модели является возможность неполной окклюзии СМА, для чего необходим контроль мозгового кровотока после внутрисосудистой окклюзии в проекции средней мозговой артерии. Помимо этого, возможно развитие кровотечения, требующее исключения животного, а также непредсказуемой и замаскированной трансформации ишемического повреждения в его геморрагическую форму вследствие перфорации сосуда монофиламентом или разрыва сосуда после реперфузии. После завершения эксперимента и эвтаназии при заборе головного мозга с целью определения размеров инсульта необходимо исключить из выборки тех животных, у которых обнаруживаются признаки геморрагии.

Воспроизведение методики

После подготовительных работ животному производят средний разрез в вентральной области шеи; грудино-подъязычную и грудино-сосцевидную мышцу рассекают для открытия правой ОСА, под которую временно подводят и затягивают лигатуру. Визуализируют наружную, а внутреннюю сонную артерию изолируют и освобождают от окружающих тканей в непосредственной близости от основания черепа. Затылочную артерию (ответвление внешней сонной артерии) коагулируют для предотвращения чрезмерного кровотечения. Под наружную сонную артерию подводят две лигатуры; ту, которая дальше от бифуркации, необратимо затягивают. Терминальный остаток длиной около 0,5 см от бифуркации наружной и внутренней артерий освобождают от окружающих тканей и разрезают на его дистальном конце. Этот сосудистый сегмент затем слегка отодвигают и удерживают в прямом направлении по отношению к внутренней сонной артерии.

Внутреннюю сонную артерию изолируют и аккуратно отделяют от блуждающего нерва. Дальнейшее препарирование выявляет языкоглоточный нерв, расположенный вблизи основания крыловидной артерии; эту экстракраниальную ветвь внутренней сонной артерии, направленную кзади, выделяют и под нее подводят лигатуру. На этом этапе она является единственным оставшимся ответвлением ОСА. Некоторые исследователи ее не выделяют, поскольку ввиду небольшого ее диаметра монофиламент в нее не проникнет, а на процесс реперфузии она никак не повлияет. Внутреннюю сонную артерию временно окклюдировать мелким сосудистым зажимом. Далее внешнюю сонную

артерию перфорируют и через образовавшееся отверстие вводят монофиламент, который фиксируется второй лигатурой без тугого обжима. Микрососудистый зажим с внутренней сонной артерии удаляется, и монофиламент продвигается по сосуду на расстояние приблизительно 18–20 мм от бифуркации. На используемом монофилamente должна быть отметка, дальше которой окклюдер не должен продвигаться (не более чем на 20 мм далее бифуркации), так как это может привести к перфорации сосудов виллизиева круга. Помимо расстояния, на которое вводится окклюдер, большое значение имеют такие признаки проникновения его в полость черепа, как чувство сопротивления, толчок филамента назад, наблюдение небольшого искривления окклюдера или растяжение артерии. Все это указывает на то, что окклюдер прошел основание среднемозговой и достиг проксимального участка переднемозговой артерии, имеющей меньший диаметр. В этот момент интралюминальный филамент блокирует основание СМА и кровоток по ней. После истечения необходимого времени (в зависимости от протокола исследования) окклюдер аккуратно, медленно удаляют из сосуда, наружную сонную артерию необратимо перевязывают оставшейся лигатурой ниже места перфорации. Затем от лигатуры освобождают ствол общей сонной артерии, после чего наступает полная реперфузия.

Перед тем как нить проталкивают во внутреннюю сонную артерию, зажим должен быть отпущен для допуска крови в сосуд. Это предотвращает спазм сосуда, который мешает успешному введению филамента. Если сосуд спазмирован, филамент должен быть убран назад в остаток внешней сонной артерии; после того как кровь прильет в сосуд, совершается повторная попытка.

Описанные выше хирургические манипуляции, как правило, занимают от 10 до 15 мин.

ЭМБОЛИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ИНСУЛЬТА

Воспроизведение этих моделей связано с введением эмболических материалов, создающих механическое препятствие току крови в ОСА или СМА, которые могут представлять собой кровяные тромбы (аутологичные или гетерологичные сгустки крови); полиэтиленовые, латексные или керамические микросферы диаметром до 50 мкм; поливинилсилоксан (ПВС); вязкое силиконовое масло или поливинилацетат. Тромботическая ишемия головного мозга может вызываться фотохимическим облучением ОСА или СМА после введения светочувствительного красителя, который при облучении лазерным лучом приобретает выраженный окислительный потенциал, локально повреждает эндотелий и клетки крови, в результате чего и развивается тромбоз.

МОДЕЛЬ ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Данная экспериментальная модель инсульта позволяет приближенно к естественным условиям имитировать события, инициирующие окклюзию при инсульте у человека. Стоит отметить, что техника создания фототромбоза прогрессивно изменялась и совершенствовалась, так как были открыты вещества, которые демонстрируют мощные адгезивные свойства при облучении их светом или лазером с определенной длиной волны. Основным преимуществом этой модели является простота и необходимость проведения незначительных малотравматичных хирургических вмешательств в организм животного. Недостатками являются необходимость наличия сложного узкоспециализированного оборудования и расходных материалов, трудно контролируемый размер инсульта и развитие тяжелого системного оксидативного стресса, тяжесть развития которого спрогнозировать практически невозможно.

С помощью облучения аргоновым лазером с длиной волны 514,5 нм сонной артерии у крыс после инъекции бенгальского розового может быть вызвана последовательная степень стеноза в виде пристеночного, непрерывно эмболирующего тромба [41]. Аналогичная фотохимическая реакция, вызванная красителем эритрозинном В, была использована позже для создания кольцевой модели инсульта, в развитии которой с помощью кольцеобразного лазерного луча (514,5 нм, аргон) инициируется конгруэнтный очаг ишемии, связанный с окклюзией мелких сосудов [42]. Кольцо поражения физически изолирует и постепенно приводит к ишемии всех тканей внутри этой метаболической зоны, таким образом моделируя процессы, происходящие в зоне развивающейся пенумбры, а инфаркт мозга при этом формируется относительно медленно. В описанных выше моделях инсульта зона пенумбры меньше, некроз формируется намного быстрее. При этом если в первом случае повреждение тканей не останавливается, а, напротив, развивается, поскольку в очаге некроза и прилегающей к ней области сохраняется высокий окислительный потенциал, то во втором случае происходит обратный процесс, так как максимум повреждающего действия ишемии происходит в первые часы формирования зоны некроза и ишемической полутени. После прохождения этого периода наступает регресс ишемии за счет естественных защитных и компенсаторных механизмов. Таким образом, модели фотохимического тромбоза могут вызывать более тяжелые ишемические поражения, нежели те, которые основаны исключительно на хирургических техниках окклюзии мозговых сосудов.

НЕОКОРТИКАЛЬНЫЙ ИНСУЛЬТ

Этот, по сути, неинвазивный метод кортикального инсульта, воспроизводимый путем фототромботической окклюзии микрососудов, генерирует дискретную зону развивающегося инфаркта в любой заранее выбранной области неокортекса у крысы или мыши. Результаты гистологических, морфологических и реологических исследований, основанных на этой модели кортикальной микрососудистой окклюзии, со времени первоначального исследования были описаны в сотнях публикаций различных лабораторий [43–45]. Хотя этот метод вызывает тромботический инсульт, он не имеет прямой клинической аналогии, так как наблюдается окклюзия главным образом в небольших корковых сосудах (менее чем 40 мкм), а не в крупной артерии или ее ответвлении.

Воспроизведение методики

После первоначальной дооперационной подготовки голова животного иммобилизуется в металлическом корпусе со стереотаксическими координатами. Поверхность черепа скальпируется, и определяются координаты для лазерного облучения, которые ограничиваются непрозрачным материалом. Они прикрепляются к черепу временным цементом, в образовавшееся между пластинами окно для создания равномерной оптической плотности наносится минеральное масло. Таким образом, зона и степень воздействия лазерного луча становится сопоставимой у всех животных в группе. Трепанации черепа в этой модели не требуется, однако предпочтительно использовать молодых животных возрастом от 5 до 7 месяцев.

Далее аликвоту 10 (12,5) мг/мл раствора бенгальского розового (эритрозина В) инфузируют с интервалом 1,5 (1,0) мин в дозе 1 мл/кг массы крысы через бедренную, хвостовую (предпочтительнее) или яремную вену. После 30 с инфузии эритрозина В можно начинать облучение лазером при интенсивности 200 мВт см². В настоящее время наиболее эффективные, хотя и дорогие, лазеры работают при длине волны 532 нм или имеют настраиваемую мощность. Всего лишь 3 минут облучения достаточно для получения полного коркового поражения. Преимуществом использования лазера с длиной волны, близкой к максимуму поглощения красителя, является то, что при рекомендованной интенсивности никакое внешнее охлаждение облучаемой поверхности черепа не требуется. В отличие от этого облучение даже оптически отфильтрованной дуговой лампой требует охлаждения.

Альтернативной описанному выше способу является кольцевая модель, в которой вместо сплошного используется кольцеобразный лазерный луч, который фотохимически создает кольцевое корко-

вое поражение внутри его пространства. Как предполагается, именно таким образом происходит развитие пенумбры. Кольцевой луч получается путём введения 514,5 нм аргонового лазерного луча в оптическое волокно, расположенное кольцом на черепе крысы [42]. Развивающийся вазогенный отек, радиально распространяющийся от ишемического очага, очевидно, и является ведущей причиной развития поражения, так как окислительный потенциал эритрозина В, облученного лазером, расходуется достаточно быстро и зона, в которой развивается оксидативный стресс, относительно небольшая. Именно в этом и есть основное различие описанных выше двух подходов к моделированию неокортикального инсульта.

ФОТОТРОМБОЗ СМА, ВЫЗВАННЫЙ ФОТОХИМИЧЕСКИ ИНТРАВАСКУЛЯРНО *IN SITU*

После проведения подготовки животных и стандартных хирургических манипуляций по методике, описанной выше, осуществляется доступ к ветви средней мозговой артерии. Далее вызывается фототромботическая окклюзия дистальной СМА лазером MicroGreen или Laserglow LCS-532 мощностью 15 мВт в сочетании с эритрозином В или бенгальским розовым, вводимым системно в дозе 25 или 20 мг/кг соответственно за 15 мин до начала облучения. Окклюзия наступает в среднем через 2 мин после начала облучения.

Альтернативно окклюзию СМА можно вызвать при помощи специальной смеси, чувствительной к активатору фактора плазминогена тромба при проведении фоточувствительной реакции [46].

ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОЕ СУЖЕНИЕ ВНУТРЕННЕГО ПРОСВЕТА ОБЩЕЙ СОННОЙ АРТЕРИИ

Сужение просвета общей сонной артерии, возникающее от фототромботического тромбоцитарного стеноза, было первоначально разработано посредством облучения аргоновым лазером с длиной волны 514,5 нм при средней интенсивности 55 Вт/см² общей сонной артерии крыс после инъекции бенгальского розового в дозе 40 мг/кг. Вскоре был найден способ усилить возникающий стеноз (до 50–70%) путем облучения тканей лазерным излучением с параметрами 22 Вт/см², 562 нм на пике поглощения бенгальского розового. Впоследствии использовалось облучение аргоном при длине волны 514,5 нм и интенсивности 50 Вт/см² в сочетании с эритрозином В в дозе 37 мг/кг. Эта модель вызывает значимый гемодинамический дефицит и микрофокальную ишемию.

Воспроизведение методики заключается в осуществлении оперативного доступа к общей сонной артерии и установке на нее датчика регистрации скорости кровотока и лазерного луча.

Во всех методиках, основанных на фототромботической реакции, настройка и фокусировка лазерного луча на сосуд животного производится только до введения фоточувствительного агента.

Разные виды животных имеют разную чувствительность к фототромботической реакции. Так, в исследованиях B.D. Watson [46] было показано, что для окклюзии общей сонной артерии мыши диаметром 400 мкм требуется аргоновый лазер мощностью 165 мВт с длиной волны 514 нм со сфокусированной интенсивностью около 130 Вт/см², что сопоставимо с интенсивностью, необходимой для окклюзии общей сонной артерии крыс. Было также установлено, что морские свинки гораздо более чувствительны к фототромбозу, чем крысы и мыши, и требуют только 50 мВт аргонового 514 нм облучения для окклюзии 2 мм общей сонной артерии при интенсивности 1,7 Вт/см² в течение 1 мин.

ОБЩИЕ МАНИПУЛЯЦИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ОПЕРАЦИЙ ПО МОДЕЛИРОВАНИЮ ОСТРЫХ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Отбор животных

Экспериментальных животных необходимо отбирать таким образом, чтобы их возраст и масса тела были максимально однородны, взвешивать животных необходимо непосредственно перед каждой операцией. Следует учитывать, что чем старше крыса, тем более плотная у неё сеть кровеносных сосудов и толще кости черепа.

Хирургический инструмент

Для проведения хирургических манипуляций на мелких лабораторных животных удобно использовать инструментарий и шовный материал для проведения офтальмологических операций у человека. Шовный материал должен быть нерассасывающимся.

Анестезия

Для проведения ингаляционного наркоза животных помещают в камеру для анестезии, наиболее часто используемая газовая смесь для введения животных в наркоз представляет собой 3–4% изофлуран в смеси 30% кислорода (O₂) и 70% закиси азота (N₂O).

Для неингаляционной системной анестезии чаще используют внутрибрюшинные, реже внутримышечные инъекции.

шечные, внутривенные (редко) и подкожные (редко) инъекции этаминала натрия (от 30 до 40 мг/кг, в/б), хлоралгидрата (от 300 до 450 мг/кг, в/б), кетамина (80 мг/кг, в/б) в комбинации с ксилазолом (10 мг/кг, в/б), а также золетила (10 мг/кг, в/б) в комбинации с ксилазолом (5 мг/кг, в/б). Для местной анестезии с целью предотвращения развития синокаротидного рефлекса и профилактики состояния острой боли в послеоперационном периоде используют растворы анестетиков (лидокаин 2%, новокаин 0,5%, бупивакаин 0,5%), которые наносят непосредственно на нервные волокна и/или на операционное поле в небольшом количестве (от 100 до 200 мкл) [47, 48].

При изучении соединений с церебропротективной активностью особое внимание следует уделить выбору средств, способа и длительности наркоза, поскольку у большинства веществ, используемых для общей анестезии, имеется отчетливое церебропротективное действие. Предпочтение следует отдавать управляемому наркозу, т.е. когда экспериментатор может экстренно вывести животное из наркоза.

Обработка операционного поля

При необходимости удаления шерстяного покрова (с головы, шеи, спины и т.д.) допускается его сбривание или, что более предпочтительно, использование депиляционного крема. Обработка операционного поля (до и после операции) и окружающей его области осуществляется растворами спирта (70%), хлоргексидина (0,05%), бетадина (0,5%) или йода (2%). Изоляция оперативного поля достигается использованием сетчатых (трубчатых) бинтов (животное помещается в бинт, а на месте операционного поля он разрезается).

Для защиты раны от инфекции распыляют аэрозоль фуразолидона, допускается применение антибактериальных средств в виде порошков или растворов, которые наносятся на рану и на послеоперационный шов. В наших исследованиях для профилактики инфицирования ран мы используем глазную мазь с тетрациклином или левомицетином, порошок банеоцин, растворы хлоргексидина, фурацилина, бриллиантового зеленого, йода.

Защита глаз животного

Для предотвращения сухости глаз животного во время проведения операции на них помещают глазной гель. Веки животного во время операции должны быть плотно закрыты для предотвращения повреждения зрения из-за яркого света.

Мониторинг жизненно важных параметров

В большинстве исследований по моделированию ишемии головного мозга необходимо осуществлять мониторинг системных параметров животного, таких

как АД, ЧСС, глубина и частота дыхательных актов, температура тела.

При проведении экспериментов не допускается возникновение кровотечений объемом более 200 мкл. Животные с подобными кровотечениями должны быть исключены из дальнейших исследований.

Оценка качества воспроизведения модели (первичная)

Количественная оценка скорости мозгового кровотока на всех этапах воспроизведения модели его нарушения всегда предпочтительна, а в некоторых случаях (модель с внутрисосудистой окклюзией СМА) просто необходима. Наиболее подходящими для этих целей являются методы лазерной или ультразвуковой доплеровской флоуметрии.

Интубация

Для повышения оксигенации животных возможно проведение интубации с помощью эндотрахеальной трубки (силиконовая трубка длиной 3–4 см и диаметром 1–1,2 мм). В качестве направляющей используется модифицированная тупая спинальная игла. Во время отработки навыка целесообразно надрезать область шеи для визуализации трахеи, чтобы убедиться, что эндотрахеальная трубка вставлена правильно. Быстрая оценка проводится путем помещения инструмента из нержавеющей стали в переднюю часть трубки так, чтобы можно было наблюдать конденсацию дыхательной влаги. Если конденсации влаги не наблюдается, то это означает, что трубка находится не в трахее. Эндотрахеальная трубка закрепляется на морде животного с помощью временного шва.

Возможно применение интраназальной интубации (необходима принудительная подача газовой смеси).

Реперфузия

Известно, что реперфузия по своему повреждающему действию не только не уступает ишемии, но в некоторых случаях превосходит ее. У каждого конкретного животного и ишемия, и последующая реперфузия могут происходить по-разному и с различной повреждающей составляющей. Поэтому процесс реперфузии должен быть по возможности управляемым или контролируемым с целью своевременного исключения животного из эксперимента.

Аналогично важности моделирования тромботического/эмболического инсульта необходима разработка надежных способов удаления церебральных артериальных окклюзий с минимальными побочными эффектами. Поскольку вне зависимости от природы окклюдера (силикон, сгусток крови, продукты фототромботической реакции и т.д.) почти каждый

метод реканализации будет вызывать возникновение (или индуцировать образование) фрагментов тромбов разных размеров. Их возникновение может по-разному влиять на экспериментальных животных в послеоперационном периоде и искажать терапевтический ответ на проводимую церебропротективную терапию. Так, если фокальная ишемия головного мозга воспроизводится у животных с повышенным коагулопатическим потенциалом (например, при сахарном диабете) методом внутрисосудистой окклюзии с последующей реперфузией, количественную оценку мозгового кровотока необходимо давать не только на момент введения монофиламента, но и при реперфузии. То есть контролироваться должна не только окклюзия, но и реперфузия, а точнее, ее наличие. Такая необходимость связана с тем, что монофиламент, находясь в сосуде головного мозга, мог инициировать образование тромба, который будет препятствовать реперфузии и способствовать существенному увеличению объема некроза, не связанного с действием фармакологически активных веществ.

Использование лазерного луча в моделях с фотохимической реакцией

Луч сначала устанавливается на очень малой мощности через расстояние в 25 см на сферической стеклянной линзе с антибликовым покрытием, а затем отражается на выбранном сегменте дистальной СМА.

Затем мощность пучка Р рассчитывают, чтобы обеспечить интенсивность I около 13 Вт/см², по формуле:

$$I \text{ (Вт/см}^2\text{)} = 12,73 \text{ Р (мВт)} / D \text{ (100 } \mu\text{м)}^2,$$

где D кратно 100 мкм (обычно от 1,8 до 2,4 для типичной дистальной СМА диаметром от 180 до 240 мкм). Для сегмента диаметром 200 мкм (D=2) Р=4 мВт.

По мере того как мощность лазера увеличивается до желаемого уровня, интенсивная соломенно-желтая (оранжевая) флуоресценция в связи с возбуждением циркулирующего эритрозина В (бенгальского розового) остается видимой. Затем флуоресценция исчезает и образовавшийся тромб окрашивается лазерным лучом.

Послеоперационный уход

После выхода животных из наркоза для профилактики обезвоживания допускается внутрижелудочное введение до 5 мл воды. В послеоперационном периоде желательно содержать животных в просторных (540х390х210 мм) клетках либо изолированно, либо малыми группами (по 3–4 особи) и переводить их на облегченный режим питания (размоченный комбинированный корм).

Достоинства и недостатки моделей создания ОНМК в экспериментальных исследованиях на крысах представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Достоинства и недостатки моделей используемых для моделирования нарушений мозгового кровообращения [49]

Модель	Достоинства	Недостатки
Интралюминальные модели ОСМА	Имитирует инсульт у человека. Формирует пенумбру. Высокая воспроизводимость. Возможность осуществления контролируемой реперфузии. Отсутствие краниотомии.	Повышение риска кровотечений при использовании некоторых типов окклюдеров. Не подходит для изучения тромболитических препаратов.
Модели с краниотомией	Длительная и стойкая выживаемость животных. Визуальный контроль эффективной окклюзии.	Высокая инвазивность и риск осложнений. Требует высокого уровня хирургического мастерства.
Фототромботические модели	Позволяет осуществить локализованное ишемическое повреждение. Высокая воспроизводимость. Малая инвазивность.	Вызывает ранний сосудистый отек, отсутствующий в клинической ситуации. Не подходит для изучения нейропротекторных свойств соединений.
Модели с применением эндотелина-1	Малая инвазивность. Воспроизведение ишемического повреждения в корковых или подкорковых зонах мозга. Низкая летальность.	Неконтролируемая длительность ишемии. Вызывает астроцитоз и аксональное прорастание, что может повлиять на интерпретацию результатов. Низкая воспроизводимость инфарктов мозга.
Эмболические модели	Наиболее близка к клиническому течению инсульта у человека. Подходит для изучения тромболитических препаратов.	Возможна спонтанная реканализация. Высокая вариабельность размеров повреждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная медицина нуждается в создании оригинальных лекарственных средств, поскольку мировая статистика демонстрирует снижение эффективности лечения многих социально значимых заболеваний. Ученые связывают это обстоятельство с тем, что возможностей существующих лекарственных средств, их комбинаций и терапевтических стратегий недостаточно для сохранения темпов увеличения продолжительности и качества жизни людей.

Несмотря на широкое использование в настоящее время мишень-ориентированного скрининга, основанного на использовании протеомных, клеточных и других технологий, создание лекарственных средств невозможно без проведения исследований *in vivo*, а моделирование в этих условиях патологического процесса является единственным эффективным методом оценки эффективности разрабатываемого препарата. На выбор метода моделирования влияет множество факторов, в числе которых профиль лаборатории, ее материально-технические и финансовые возможности, квалификация и число сотрудников. В то же время выбранная экспериментальная модель должна отвечать обязательным требованиям: в максимальной степени соответствовать патологическим процессам, происходящим у человека, быть воспроизводимой, поддаваться фармакологической коррекции.

В данном обзоре была предпринята попытка кратко описать экспериментальные модели, используемые для скрининга и оценки эффективности соединений с церебропротективной активностью, приведены их основные достоинства и недостатки, а также техники исполнения. В заключительной части даны общие рекомендации относительно выполнения манипуляций с животными при проведении хирургических операций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.И. Гусев, А.С. Чуканова. Современные патогенетические аспекты формирования хронической ишемии мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. № 3–1. С. 4–8.
2. S.T. Carmichael. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose // *NeuroRx*. 2005. V. 2. № 3. P. 396–409.
3. U. Dirnagl, M.R. Macleod. Stroke research at a road block: the streets from adversity should be paved with meta-analysis and good laboratory practice // *Br. J. Pharmacol.* 2009. V. 157. № 7. P. 1154–1156.
4. S. Braeuninger, C. Kleinschnitz, B. Nieswandt, G. Stoll. Focal cerebral ischemia methods // *Mol. Biol.* 2012. V. 788. P. 29–42.
5. E.G. Sozmen, J.D. Hinman, S.T. Carmichael. Models that matter: white matter stroke models // *Neurotherapeutics*. 2012. V. 9. № 2. P. 349–358.
6. D.W. Howells, M.J. Porritt, S.S. Rewell, V. O'Collins, E.S. Sena, H.B. van der Worp, R.J. Traystman, M.R. Macleod. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010. V. 30. № 8. P. 1412–1431.
7. N. Beckmann. High resolution magnetic resonance angiography non-invasively reveals mouse strain differences in the cerebrovascular anatomy in vivo // *Magn Reson Med*. 2000. V. 44. № 2. P. 252–258.
8. B.W. McColl, H.V. Carswell, J. McCulloch, K. Horsburgh. Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice // *Brain Res*. 2004. V. 997. № 1. P. 15–23.
9. F.C. Barone, D.J. Knudsen, A.H. Nelson, G.Z. Feuerstein, R.N. Willette. Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1993. V. 13. № 4. P. 683–692.
10. Y. Yamori. Neural and non-neural mechanisms in spontaneous hypertension // *Clin. Sci. Mol. Med. Suppl.* 1976. V. 3. P. 431–434.
11. E.L. Bailey, C. Smith, C.L. Sudlow, J.M. Wardlaw. Is the spontaneously hypertensive stroke prone rat a pertinent model of sub cortical ischemic stroke? A systematic review // *Int. J. Stroke*. 2011. V. 6. № 5. P. 434–444.
12. Manual of stroke models in rats / Ed. by Yanlin Wang Fischer. – Taylor & Francis Group: CRC Press, 2008. 340 p.
13. S.J. Murphy, L.D. McCullough, J.M. Smith. Stroke in the female: Role of biological sex and estrogen // *ILAR J.* 2004. V. 45. № 2. P. 147–153.
14. S.M. Graham, L.D. McCullough, S.J. Murphy. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care // *Comp. Med.* 2004. V. 54. № 5. P. 486–497.
15. K.A. Radermacher, K. Wingler, F. Langhauser, S. Altenhöfer, P. Kleikers, J.J. Hermans, M. Hrabě de Angelis, C. Kleinschnitz, H.H. Schmidt. Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of oxidative stress // *Antioxid. Redox. Signal.* 2013. V. 18. № 12. P. 1418–1427.
16. K.A. Hossmann, F.J. Schüier. Experimental brain infarcts in cats. Pathophysiological observations // *Stroke*. 1989. V. 11. № 6. P. 583–592.
17. B. Bose, J.L. Osterholm, R. Berry. A reproducible experimental model of focal cerebral ischemia in the cat // *Brain Res*. 1984. V. 311. № 2. P. 385–391.
18. W. Paschen, M. Sato, G. Pawlik, C. Umbach, W.D. Heiss. Neurologic deficit, blood flow and biochemical sequelae of reversible focal cerebral ischemia in cats // *J. Neurol Sci.* 1985. V. 68. № 2–3. P. 119–134.
19. T.H. Jones, R.B. Morawetz, R.M. Crowell, F.W. Marcoux, S.J. FitzGibbon, U. DeGirolami, R.G. Ojemann. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys // *J. Neurosurg.* 1981. V. 54. № 6. P. 773–782.
20. S. Hayashi, D.G. Nehls, C.F. Kieck, J. Vielma, U. DeGirolami, R.M. Crowell. Beneficial effects of induced hypertension on experimental stroke in awake monkeys // *J. Neurosurg.* 1984. V. 60. № 1. P. 151–157.
21. M.J. Robinson, I.M. Macrae, M. Todd, J.L. Reid, J. McCulloch. Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the

- rat // *Neurosci. Lett.* 1990. V. 118. № 2. P. 269–272.
22. A. Tamura, D.I. Graham, J. McCutloch, G.M. Teasdale. Focal cerebral ischaemia in the rat: description of the technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1981. V. 1. P. 53–60.
23. P. Coyle. Diameter and length changes in cerebral collaterals after middle cerebral artery occlusion in the young rat // *Anat. Rec.* 1984. V. 210. № 2. P. 357–364.
24. P. Coyle. Outcomes to middle cerebral artery occlusion in hypertensive and normotensive rats // *Hypertension.* 1984. V. 6. № 2. P. 69–74.
25. J.B. Bederson, L.H. Pitts, M. Tsuji, M.C. Nishimura, R.L. Davis, H. Bartkowski. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination // *Stroke.* 1986. V. 17. № 3. P. 472–476.
26. S.T. Chen, C.Y. Hsu, E.L. Hogan, H. Maricq, J.D. Balentine. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction // *Stroke.* 1986. V. 17. № 4. P. 738–743.
27. А.В. Топчян, Р.С. Мирзоян, М.Г. Баласанян. Локальная ишемия мозга крыс, вызванная перевязкой средней мозговой артерии // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 1996. Т. 59. № 5. С. 62–64.
28. И.Н. Тюрников, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, И.О. Логвинов, Т.А. Антипова. Нейропротекторное действие нейроглутама в условиях активации свободно-радикального окисления // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2014. Т. 77. № 8. С. 16–19.
29. А.А. Шмонин. Перевязка средней мозговой артерии крысы: сравнение модификаций моделей фокальной ишемии мозга у крысы // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2011. Т. 10. № 3. С. 68–76.
30. D. Chalothorn, J.E. Faber. Formation and maturation of the native cerebral collateral circulation // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2010. V. 49. № 2. P. 251–259.
31. J. Sharkey, I.M. Ritchie, P.A. Kelly. Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1993. V. 13. № 5. P. 865–871.
32. P.M. Hughes, D.C. Anthony, M. Ruddin. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1 // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003. V. 62. № 12. P. 1276–1286.
33. K. Fuxe, B. Bjelke, B. Andbjør, H. Grahm, R. Rimondini, L.F. Agnati. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia // *Neuroreport.* 1997. V. 8. № 11. P. 2623–2629.
34. S.B. Frost, S. Barbay, M.L. Mumert, A.M. Stowe, R.J. Nudo. An animal model of capsular infarct: endothelin-1 injections in the rat // *Behav. Brain Res.* 2006. V. 169. № 2. P. 206–211.
35. N.M. Ward, J. Sharkey, H.M. Marston, V.J. Brown. Simple and choice reaction-time performance following occlusion of the anterior cerebral arteries in the rat // *Exp. Brain Res.* 1998. V. 123. № 3. P. 269–281.
36. J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa, G. Ooneda. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area // *Jpn. J. Stroke.* 1986. V. 8. P. 1–8.
37. E.Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats // *Stroke.* 1989. V. 20. P. 84–91.
38. L. Belayev, O.F. Alonso, R. Busto, W. Zhao, M.D. Ginsberg. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture neurological and pathological evaluation of an improved model // *Stroke.* 1996. V. 27. № 9. P. 1616–1622.
39. И.Н. Тюрников, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова. Изучение нейропротекторного действия нового производного глутаминовой кислоты – нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2014. Т. 77. № 9. С. 8–12.
40. А.А. Спасов, В.Ю. Федорчук, Н.А. Гурова, Н.И. Чепляева, Е.В. Резников. Методологический подход для изучения нейропротекторной активности в эксперименте // *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2014. № 4. С. 39–45.
41. N. Futrell N. C. Millikan, B.D. Watson, W.D. Dietrich, M.D. Ginsberg. Embolic stroke from a carotid arterial source in the rat: pathology and clinical implications // *Neurology.* 1989. V. 39. № 8. P. 1050–1056.
42. P. Wester, B.D. Watson, R. Prado, W.D. Dietrich. A photothrombotic «ring» model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion // *Stroke.* 1995. V. 26. P. 444–456.
43. H. Yanamoto, I. Nagata, Y. Niitsu, J.H. Xue, Z. Zhang, H. Kikuchi. Evaluation of MCAO stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique // *Exp. Neurol.* 2003. V. 182. № 2. P. 261–274.
44. A.M. Buchan, D. Xue, A. Slivka. A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat // *Stroke.* 1992. V. 23. № 2. P. 273–279.
45. K. Hiramatsu, N.F. Kassell, Y. Goto, S. Soleau, K.S. Lee. A reproducible model of reversible, focal, neocortical ischemia in Sprague-Dawley rat // *Acta Neurochir. (Wien).* 1993. V. 120. № 1–2. P. 66–71.
46. B.D. Watson. Concepts and techniques of experimental stroke induced by cerebrovascular photothrombosis. Central Nervous System Trauma. – Florida: CRC Press, 1995. 438 p.
47. J.L. Tremoleda, A. Kerton, W. Gsell. Anaesthesia and physiological monitoring during in vivo imaging of laboratory rodents: considerations on experimental outcomes and animal welfare // *EJNMMI Res.* 2012. V. 2. № 1. P. 44.
48. J.A. Davis. Mouse and rat anesthesia and analgesia // *Curr. Protoc. Neurosci.* 2008. Appendix 4:Appendix 4B.
49. F. Fluri, M.K. Schuhmann, C. Kleinschnitz. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research // *Drug Des. Devel. Ther.* 2015. V. 2. № 9. P. 3445–3354.