



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G09B 23/28 (2020.01)

(21)(22) Заявка: 2019134892, 30.10.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.10.2019

Дата регистрации:
18.05.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.10.2019

(45) Опубликовано: 18.05.2020 Бюл. № 14

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Шевцовой
И.В.

(72) Автор(ы):

Нестеров Аркадий Витальевич (RU),
Колесниченко Павел Дмитриевич (RU),
Покровский Михаил Владимирович (RU),
Нестерова Наталья Игоревна (RU),
Марковская Вера Александровна (RU),
Иванова Мария Игоревна (RU),
Карагодина Анастасия Юрьевна (RU),
Сапарбоева Нозима Махмуд кизи (RU),
Мурашев Борис Владимирович (RU),
Прошин Антон Юрьевич (RU),
Патраханов Евгений Александрович (RU),
Архинов Иван Сергеевич (RU),
Покровский Владимир Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: МАКАРЕНКО А.Н. и др.,
Сравнительный анализ влияния
лекарственных средств "Ампассе", "М2" и
"Церебрала" на системную глиальную
клеточную реакцию сенсомоторного
цереброкортекса белых крыс при
моделировании острого геморрагического
инсульта, Актуальн проблемы сучаснох
медицини: В сник украхнськох медичнох
стоматолог чнох академ х, 2017, т.17, 1 (см.
прод.)

(54) Способ моделирования геморрагического инсульта у крыс

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной неврологии. Выполняют отверстие в черепе лабораторного животного в области внутренней капсулы любого из полушарий. Вводят пункционную иглу согласно

стереотаксическим координатам на глубину 3 мм. Выполняют деструкцию сосудов и мозговой ткани вращательными движениями мандрен-ножа тремя оборотами по часовой и тремя оборотами против часовой стрелки. Струйно вводят аутологичную

венозную кровь в объеме 0,11 мл/100 г веса животного. Способ позволяет моделировать геморрагический инсульт вне зависимости от

различных параметров животных с повышением повторяемости результатов, наиболее приближенный к модели человека. 6 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

(57), с.244-248. RU 2307396 C2, 27.09.2007. CN 107753957 A, 06.03.2018. ЕГОРОВ А.А., Соединения L-лизина в фармакокоррекции нарушений энергетического метаболизма головного мозга при моделировании геморрагического инсульта, Молодежь, Наука, Медицина, 2016, с.136-138. FLURI FELIX et al. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. Drug design, development and therapy, 2 Jul. 2015, vol. 9, 3445-3454.

R U 2 7 2 1 2 7 2 1 2 8 9 C 1

R U 2 7 2 1 2 8 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 721 289** (13) **C1**(51) Int. Cl.
G09B 23/28 (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(52) CPC
G09B 23/28 (2020.01)(21)(22) Application: **2019134892, 30.10.2019**(24) Effective date for property rights:
30.10.2019Registration date:
18.05.2020

Priority:

(22) Date of filing: **30.10.2019**(45) Date of publication: **18.05.2020 Bull. № 14**

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Shevtsovoj I.V.**

(72) Inventor(s):

**Nesterov Arkadij Vitalevich (RU),
Kolesnichenko Pavel Dmitrievich (RU),
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),
Nesterova Natalya Igorevna (RU),
Markovskaya Vera Aleksandrovna (RU),
Ivanova Mariya Igorevna (RU),
Karagodina Anastasiya Yurevna (RU),
Saparboeva Nozima Makhmud kizi (RU),
Murashev Boris Vladimirovich (RU),
Proshin Anton Yurevich (RU),
Patrakhonov Evgenij Aleksandrovich (RU),
Arhipov Ivan Sergeevich (RU),
Pokrovskij Vladimir Mikhajlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) METHOD FOR MODELING HAEMORRHAGIC STROKE IN RATS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to experimental neurology. A hole is made in the skull of a laboratory animal in the area of an internal capsule of any hemisphere. A puncture needle is inserted according to stereotaxic coordinates at depth of 3 mm. Vessels and cerebral tissue are decomposed by rotary motions of mandrel-knife in clockwise direction and

three turns counterclockwise. Autologous venous blood is jet injected in amount of 0.11 ml/100 g of animal's body weight.

EFFECT: method enables simulating hemorrhagic stroke irrespective of various parameters of animals with high repeatability, the most approximate to the human model.

1 cl, 6 tbl, 2 ex

RU 2 721 289 C1

RU 2 721 289 C1

Изобретение относится к экспериментальной медицине и может быть использовано для моделирования и изучения последствий геморрагического инсульта, а также для экспериментальной фармакотерапии.

Наиболее близкими аналогами к заявляемому изобретению являются способы моделирования внутримозговых гематом.

Известен способ моделирования и исследования последствий геморрагического инсульта (RU № 2005133737, публ. 10.05.2007), включающего воздействие аутокровью на нервные клетки мозга, заключающегося в том, что переживающие срезы нервных клеток мозга после приготовления помещают в стеклянные виалы с кровью (без гепарина) объемом 1 мл на заданный интервал времени. Затем срезы извлекают из виалы с кровью, отмывают перфузионной средой от крови и регистрируют биоэлектрическую активность клеток в заданных структурах. Сопоставляя параметры активности клеток с их контрольными значениями, которые получают на интактной группе срезов (n=4-6), определяют степень их повреждения и оценивают возможность их восстановления.

Известен способ моделирования развития мелкоочаговых мозговых геморрагий в коре головного мозга у новорожденных крыс (RU № 2505865, публ. 27.01.2014), включающий воздействие звуком, согласно решению выбирают крыс в возрасте трех дней после рождения, подвергают воздействию звука величиной 70 дБ, частотой 110 Гц непрерывно на протяжении 60 мин. В силу слабой подвижности новорожденных крыс (1-3 дня после рождения), животные не фиксируются, они помещаются в плексиглазовую камеру объемом 2000 см³ для звукоизоляции. Звук силой 70 дБ подается непрерывно на протяжении 60 мин. После завершения звукового воздействия у животных (n=37) проводили исследования церебральной гемодинамики с применением когерентной оптической томографии. Измерение диаметра венозных и артериальных сосудов мозга, скорости кровотока в них и перфузии осуществляли через родничок со снятым участком скальпа (2 мм × 2 мм) под эфирной анестезией.

Однако вышеуказанные способы не позволяют моделировать геморрагический инсульт с результатами смертности, приближенными к смертности у людей.

Прототипом предлагаемого способа является способ моделирования геморрагического инсульта у лабораторных животных (SU № 1767518, публ. 07.10.1992), включающий, моделирование геморрагического инсульта, которое осуществляют путем вживления в головной мозг лабораторного животного – кошки – по стереотаксическим координатам билатерально полых игл, введения в них изогнутых мандренов, разрушения ткани мозга и проходящие в ней сосуды несколькими вращательными движениями мандрена. Затем в образовавшиеся области механического повреждения вводится 0,2-0,3 мл аутологичной крови животного, и спустя 2-3 мин в эти же области дополнительно вводится еще раз 0,1-0,2 мл аутокрови.

Недостатками известных технических решений является то, что моделирование осуществляется на примере лабораторных животных – кошках и для крыс, повторяемости способа достичь не удалось. Также недостатком является высокая чувствительность способа как к типу лабораторного животного, так и к его линии, возрасту, полу и весу, что не может дать четких, повторяемых результатов при изучении активности нейропротективных препаратов.

Задачей предлагаемого изобретения является создание способа моделирования геморрагического инсульта у крыс, позволяющего моделировать данную патологию вне зависимости от различных параметров животных, с повышением повторяемости результатов, наиболее приближенного к модели человека.

Поставленная задача решается с помощью предлагаемого способа моделирования геморрагического инсульта у крыс, включающего выполнение отверстия в черепе лабораторного животного в области внутренней капсулы любого из полушарий, введение полой иглы согласно стереотаксическим координатам, деструкцию сосудов и мозговой ткани вращательными движениями мандрен-ножа и введение аутологичной венозной крови, причем с помощью устройства для стереотаксиса, согласно 5 стереотаксическим координатам у мелких лабораторных животных – крыс, в головной мозг вводится пункционная игла в области внутренней капсулы на глубину 3 мм, затем устройство фиксируется, внутрь иглы вводится мандрен-нож, и тремя оборотами по часовой и тремя оборотами против часовой стрелки осуществляется деструкция мозговой 10 ткани, далее мандрен-нож извлекается, и в стерильных условиях струйно вводится аутокровь, взятая из хвостовой вены животного, в объеме 0,11 мл/100 г веса животного.

Техническим результатом является экспериментальная модель геморрагического инсульта у крыс, позволяющая моделировать данную патологию вне зависимости от 15 различных параметров животных, с повышением повторяемости результатов, наиболее приближенного к модели человека.

Осуществление изобретения

Для воспроизведения модели использовались как линейные крысы Вистар, так и 20 нелинейные, массой 150-350г, самцы и самки в соотношении 50/50%. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и Приказу МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP) с 25 соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г). Животные были разделены на две группы: 1 – животные с геморрагическим инсультом, не получающие лекарственных препаратов (контрольная группа, 20 крыс); 2 группа – животные с геморрагическим инсультом, которым вводили мексидол (20 крыс).

Острый аутогеморрагический инсульт моделируется в области внутренней капсулы 30 правого полушария. Операция выполняется в условиях общей анестезии. Анестезия осуществляется путем внутрибрюшинного введения «Хула» в дозе 0,1 мл для премедикации, после лёгкой седации крысам в качестве базисного наркоза внутрибрюшинно вводится хлоралгидрат в дозе 300 мг/кг. По достижению глубокого наркоза проводится забор крови с помощью шприца из хвостовой вены крысы. Затем 35 проводится обработка операционного поля, линейный разрез кожи головы в теменной области. Разрез выполняется во фронтальной плоскости, с последующим проведением гемостаза. Длина разреза составляет 1,0 см. В дальнейшем выполняется скелетирование кости, отделение надкостницы. С помощью стоматологического бора накладывается трепанационное отверстие в правой теменной области. Диаметр трепанационного 40 отверстия составляет 2 мм. В дальнейшем, с помощью пункционной иглы и устройства для стереотаксического введения, вводится пункционная игла в области внутренней капсулы (координаты Н=4 мм, L=3.0 мм, А=1.5 мм от брегмы по атласу G. Paxinos) на глубину 3 мм. Затем устройство фиксируется, и внутрь иглы вводится мандрен-нож, осуществляется деструкция мозговой ткани (мандрен-нож проворачивается в три 45 оборота по часовой и в три оборота против часовой стрелки). Мандрен-нож извлекается, и в стерильных условиях крысе вводится аутокровь, взятая из хвостовой вены животного, в объеме 0,11 мл/100 гр веса. Введение крови осуществляется струйно. Эффективность введения определяется по наличию стволовых судорог. После чего пункционная игла

извлекается, рана осушается и производится послойное ушивание раны и контроль гемостаза.

Исследуемый препарат вводился животным внутрибрюшинно однократно за 1 час до операции. Препаратом – референсом был выбран мексидол в дозе 50 мг/кг (согласно межвидовому коэффициенту пересчёта средне-терапевтической дозы человека), используемые в клинической практике в терапии цереброваскулярных заболеваний. Контрольным животным вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Наблюдения проводят в течение 14 суток после операции. Регистрируют особенности поведения и состояния животных на 1, 3, 7 и 14-е сутки. Для оценки нарушения поведения и состояния животных после геморрагического инсульта используют комплекс методов, традиционно применяемых для этих целей в эксперименте. Для оценки неврологического статуса использовался метод оценки неврологического дефицита по шкале оценки инсульта McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной (1996) и метод оценки мышечного тонуса путём измерения силы хвата конечностей животных посредством динамометра.

Для морфологической оценки животных выводят из эксперимента на 1, 3, 7 и 14 сутки после начала исследования. Крыс декапитируют, забирают головной мозг, фиксируют его в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24-48 часов и заливают в парафин. Фронтальные гистологические срезы головного мозга толщиной 7 мкм окрашивают гематоксилином и эозином.

Пример 1. Контрольная группа

Во время операции и в течение 1 суток после нее в контрольной группе погибло 50% крыс с геморрагическим инсультом. В первые сутки после операции при оценке неврологических нарушений практически у всех крыс с моделированной интрацеребральной гематомой наблюдались неврологические нарушения в виде вялости и замедленности движений. Выраженный неврологический дефицит, проявляющегося в виде маневжных движений по кругу и параличей конечностей у животных с геморрагическим инсультом, был отмечен в 100% случаев (таблица 1). Шкала McGrow демонстрирует неврологический дефицит крысы. 0 – неврологический дефицит отсутствует. Чем выше баллы, тем хуже состояние лабораторного животного. Удельная сила хвата – это показатель силы хвата животного к массе и находится в обратной зависимости со шкалой McGrow.

Таблица 1

Контроль	удельная сила	McGrow
До моделирования патологии	6.7±0,2	0
1 сутки	2.8±0.2	8.1±2.0
3 сутки	3,6±0,4	5.8±1.7
7 сутки	4,2±0,4	5.4±2.0
14 сутки	4,90±0,3	5.1±2.2

Регистрация силы хвата у крыс с геморрагическим инсультом показала, что на первые сутки после инсульта ослабление мышечного тонуса в группе контроля составила в среднем 58.2%. Высокие показатели активности контрольной группы на 14 сутки можно объяснить высокой летальностью в данной группе и выживаемостью лишь наиболее сильных особей с высоким регенераторным потенциалом (таблица 2).

Таблица 2

Контроль	Суммарное количество движений за 5 мин.	Стереотипность движений	Двигательная активность в головном конце	Максимальная скорость животного	Минимальная скорость животного	Пройденное расстояние
до моделирования патологии	1010±76	27±3	983±74	22±1	1.8±0,1	545±43
1 сутки	495±74	40±4	422±35	21±2	2±1	610±77
3 сутки	580±136	18±6	661±137	14±1	1±0	276±51
7 сутки	431±91	20±8	411±88	19±3	1±0.3	304±82
14 сутки	1133±90	69±9	1097±92	19±2	2±0.2	586±65

При морфологическом исследовании в контрольной группе в первые 1-3 суток после кровоизлияния в узкой зоне (0.5-1.0 мм), окружающей гематому, выявлялся периваскулярный и перицеллюлярный отек; нарушение гистоархитектоники шести слоев нейронов коры, выраженные ишемические, тяжелые изменения, кариолизис нейронов, также выражена перифокальная лейкоцитарная реакция и менее выраженная глиальная реакция. Отек мозга сопровождался рядом последовательных морфологических изменений со стороны сосудистой стенки и микроциркуляторного русла. Первоначально отмечался спазм артериол с их запустеванием. К 3 дню после кровоизлияния это состояние сменялось паретическим расширением капилляров, артериол и венул. В просвете сосудов в этот период выявлялись скопление и краевое стояние форменных элементов крови, в частности лейкоцитов. Расширенные периваскулярные пространства, заполненные плазмой, свидетельствовали о значительно повышенной проницаемости сосудистой стенки, приводящие к вторичным диапедезным периваскулярным геморрагиям. Начиная с 7 дня, выраженная перифокальная лейкоцитарная реакция сменилась на выраженную глио-макрофагальную реакцию; начинали появляться скопления макрофагов с внутриклеточным скоплением кровяного пигмента (гемосидерофаги). Впоследствии к 14 суткам восстановительные процессы глиальных клеток приводили к формированию тонкой капсулы вокруг очага кровоизлияния со скоплением единичных гемосидерофагов и скоплением кровяного пигмента (таблица 3).

Таблица 3

Контроль	1 – 3 сутки	7 сутки	14 сутки
Изменения микроциркуляции	+	+++	++
Изменения нейронов	+++	++	+
Реакция <u>глии</u>	+++	++/+++	++
Инфильтрация нейтрофилами	+++	++/+++	++
Инфильтрация макрофагами	+	+ / +++	++
Инфильтрация <u>гемосидерофагами</u>	-	+	++
Кровяной пигмент	-	-	+

+ незначительно

++ умеренно

+++ выражено

Пример 2. Группа мексидола

В группе животных, получивших исследуемые вещества, смертность в течение 1 суток была ниже, чем в контрольной группе. В частности, в группах животных, получавших мексидол, суточная выживаемость составила 70%.

Крысы, получавшие мексидол на 1–7 сутки не имели достоверных различий по шкале McGrow с группой контрольных животных. К 14 суткам все животные, получавшие исследуемое вещество, имели более чем в 1.5 раза более низкие показатели по шкале McGrow, чем контрольная группа (таблица 4).

Таблица 4

<u>Мексидол</u>	удельная сила	<u>McGrow</u>
До моделирования патологии	7.4±0,3*	0
1 сутки	3.1±0.1	7.0±2.2
3 сутки	5.0±0.2*	5.2±2.1
7 сутки	4,5±0,5	4.7±1.8
14 сутки	4,8±0,4	3.3±0.3*

Регистрация силы хвата у крыс с геморрагическим инсультом показала, что на первые сутки после инсульта ослабление мышечного тонуса в группе мексидола достоверно составило в среднем 58.2%. На 3 сутки отмечался прирост мышечной силы во всех группах, причём в группе, получавших исследуемое вещество, прирост оказался достоверно выше, чем в контрольной группе. Показатели активности крыс, получавших мексидол, на 1 и 3 сутки после операции не имели достоверных различий с группой контроля. Однако к 14 суткам активность животных, получавших мексидол, нарастала (таблица 5).

Таблица 5

<u>Мексидол</u>	Суммарное количество движений за 5 мин.	Стереотипность движений	Двигательная активность в головном конце	Максимальная скорость животного	Минимальная скорость животного	Пройденное расстояние
до моделирования патологии	1188±49*	29±1	1036±51	22±1	2.2±0,3*	594±24*
1 сутки	407±47	39±7	369±40*	16±2*	1.7±0*	520±78*
3 сутки	658±99	61±10*	597±89	28±2*	3.8±0,6*	1128±181*
7 сутки	689±115*	64±12*	625±104*	27±3*	4±0,8*	1198±226*
14 сутки	829±43*	86±7*	749±36*	34±4*	5.1±0.5*	1524±159*

Данные морфологических исследований в группе мексидола представлены в Таблице 6. Видимые отличия от данных контрольной группы наблюдались к 14 суткам.

Таблица 6

<u>Мексидол</u>	1 – 3 сутки	7 сутки	14 сутки
Изменения микроциркуляции	+ / ++	++	+
Изменения нейронов	++ / +++	+ / ++	-
Реакция <u>глии</u>	++ / +++	++	+ / ++
Инфильтрация нейтрофилами	++	++	+
Инфильтрация макрофагами	++ / +++	++	+ / ++
Инфильтрация <u>гемосидерофагами</u>	-	+ / ++	++
Кровяной пигмент	-	+	++

+ незначительно

++ умеренно

+++ выражено

Полученные результаты данного способа моделирования геморрагического инсульта демонстрируют высокую повторяемость результатов на примере контрольной группы и группы с препаратом-референсом и нечувствительность методики к качеству животных, так как на выживаемость не повлияли ни линия, ни вес, ни пол, ни возраст животного и допустимыми оказались комбинации в возрасте и массе +/- 100 г.

Таким образом, предложенный способ отвечает критериям «новизна» и «изобретательский уровень» и позволяет повысить повторяемость результатов при исследовании нейропротективных свойств на референсном препарате мексидол вне зависимости от различных параметров животных

(57) Формула изобретения

Способ моделирования геморрагического инсульта у крыс, включающий выполнение отверстия в черепе лабораторного животного в области внутренней капсулы любого из полушарий, введение пункционной иглы согласно стереотаксическим координатам, деструкцию сосудов и мозговой ткани вращательными движениями мандрен-ножа и введение аутологичной венозной крови, отличающийся тем, что с помощью устройства для стереотаксиса, согласно стереотаксическим координатам у лабораторных животных – крыс – в головной мозг вводят пункционную иглу в области внутренней капсулы на глубину 3 мм, затем устройство фиксируют, внутрь иглы вводят мандрен-нож и тремя оборотами по часовой и тремя оборотами против часовой стрелки осуществляют деструкцию мозговой ткани, далее мандрен-нож извлекают и в стерильных условиях струйно вводят аутокровь в объеме 0,11 мл/100 г веса животного.