

# ТУРШИЛТЫН ХАРХАНД ТАРХИНЫ ШИГДЭЭСИЙН ЭМГЭГ ЗАГВАР ҮҮСГЭХ, СУДАЛГААНД НЭВТРҮҮЛЭХ НЬ

Тэгшбаяр Даваасамбуу<sup>1\*</sup>, Баяраа Оюунчимэг<sup>2</sup> Соёллхам Бадамцэцэг<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Эм судлалын хүрээлэн

<sup>2</sup>Монос Групп

\*Цахим хаяг: [davaasambuu@monos.mn](mailto:davaasambuu@monos.mn)

## A BRIEF REVIEW ON RAT MODELS OF BRAIN ISCHEMIA STROKE

Davaasambuu Tegshbayar<sup>1\*</sup>, Oyunchimeg Bayaraa<sup>2</sup> Badamtsetseg Soyollkham<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Drug research institute

<sup>2</sup>Monos Group

\*Email: [davaasambuu@monos.mn](mailto:davaasambuu@monos.mn)

### Abstract

**Introduction:** Cerebral ischemia, also known as ischemic stroke, occurs when there is insufficient blood flow to the brain, resulting in the deprivation of oxygen and nutrients necessary for brain cell survival. This condition can lead to significant brain damage and various neurological deficits. The pathogenesis of cerebral infarction is caused by atherosclerosis, thrombosis, embolism, hemorheological, hemostatic fibrinolysis, as well as heart diseases (heart attack, arrhythmia, congenital and acquired valvular abnormalities), C and S protein deficiency, homocystinuria, polycythemia, and other factors. Stroke is the most common cause of disability and the fourth most common cause of death in the developed world. The great majority of strokes can be prevented through blood pressure control, and the ideal treatment is to improve cerebral blood supply and cerebral blood flow.

Understanding cerebral ischemia is crucial for developing effective treatments and preventive strategies. In-vivo models of ischemic stroke have been developed, which allow us to explicate the pathophysiological mechanisms of injury further and investigate potential drug targets. These models directly replicate the reduction in blood flow and the resulting impact on nervous tissue. The most frequently used in vivo model of ischemic stroke is the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion (iMCAO, BCCAO) model, which has been fundamental in revealing various aspects of stroke pathology.

This review study conducted to establish a pathologically relevant model of cerebral ischemia in experimental animals, further investigate the therapeutic effect, and develop new medicines.

**Key words:** Ischemia Stroke, brain barrier, brain injure, neuroprotective

### Хураангуй

Тархины цусны эргэлтийн цочмог хямрал, цусны эргэлтийн гэнэтийн саатлын улмаас тархины эдийн голомтот эмгэг үүсэхийг тархины шигдээс гэнэ. Тархины шигдээсийн эмгэг жам нь атеросклероз, тромбозын, эмболийн, гемореологийн, гемостаз фибринолизийн, мөн түүнчлэн зүрхний эмгэгүүд (зүрхний шигдээс, хэм алдалт, төрөлхийн болон олдмол хавхлагийн гажгууд) C, S уургийн дутагдал, гомоцистинури (цус шээсэнд гомоцистейн хуралдах эмгэг), полицитемия (цусны улаан эсийн тоо олшрох) болон бусад хүчин зүйлээс үүдэлтэй.

Тархины шигдээс нь дэлхийн хүн амын нас баралтын тэргүүлэх шалтгаануудын нэг

болж байна<sup>1,2</sup>. Хамгийн тохиромжтой эмчилгээ нь тархины цусан хангамж болон тархины цусны урсгалыг сайжруулах юм. Тиймээс эмчилгээний чанарыг сайжруулах, оновчтой арга нэвтрүүлэхийн тулд тархины шигдээсийн in vivo судалгаа туршилт эрчимтэй хийгдэж байна. Тархины шигдээсийн эмгэг загварыг туршилтын харханд үүсгэх, тухайн эмгэг загварт ургамлын гаралтай эмийн бэлдмэлийг турших, эмчилгээний үйлдлийг тогтоох, цаашлаад тархины шигдээсэнд нөлөөлөхүйц эм бэлдмэлийн фармакологийн үйлдлийг тогтоох судалгааны аргачлалын горим тогтоох зорилгод нийцүүлэн тойм судалгаа хийлээ. Судлаачдын үзэж буйгаар тархины шигдээс үүсгэх хамгийн тохиромжтой аргачлал нь

гүрээний хоёр талын ерөнхий артерийн судсыг бөглөх (МСАО, ВССАО), боолт тавих аргууд байна. Эдгээр нь зардал багатай, судалгааны үр дүнг үнэлэх, дүгнэлт гаргах, мөн ургамлын гаралтай эм бэлдмэлийн тархины гэмтэл, тархины шигдээсд нөлөөлөх фармакологийн үйлдлийг тогтоох, ШУ-ны үндэслэлтэй тайлбар, нотолгоог хийхэд нэн тохиромжтой аргачлалууд юм.

### Удиртгал

Дэлхийн Эрүүл Мэндийн Байгууллагын статистик мэдээллээр тархины харвалт өвчнөөр дэлхийд жил бүр 15 сая гаруй хүн өвчилж байгаагаас нас баралт 33.3% тохиолдож, үлдсэн хувь нь тахир дутуу үлдэж байна. Тархины харвалтын үндсэн шалтгаан болох артерийн гипертензи нь нийт өвчлөлийн 84.7%-ийг эзэлж байна. Харин Монгол улсын 100000 хүн амд 290-д тархины харвалт тохиолдож үүнээс 49 нь нас барж, тархины цус харвалтын давтажмаар дэлхийд өндөр өвчлөлтэй орнуудын тоонд хамаарч байна. Эрүүл мэндийн хөгжлийн төвийн 2018 оны статистик мэдээгээр тархины цус харвалт 10000 хүн амд 10.5%-ийг эзэлж нийт нас баралтын тэргүүлэх шалтгааны өвчлөл хэвээрээ байна. Тархвар зүйн судалгаагаар тархины шигдээс буюу цус тасалдах харвалт нь дэлхийн улс орнуудад тархины харвалтын 80-85% байдаг бол Монгол улсын хүн амын тархины харвалтын 50%-ийг тархины шигдээс эзэлж байна<sup>1-4</sup>. Судасны шалтгаанаар гэнэт цочмог хэлбэрээр үүсэх тархины үйлийн хэсэгчилсэн ба бүрэн дутлын голомтот шинжүүд 24 цагаас дээш хугацаагаар илрэх тархины цусны эргэлтийн цочмог хямралыг тархины харвалт гэнэ. Тархины цус харвалтыг өвчний олон улсын ангилалаар тархины шигдээс (I63), цус тасалдах дайралт (G45, G46), тархины эдийн цус харвалт (I61, I62), аалзавч дорх цус харвалт (I60) гэж хувааж үздэг<sup>1</sup>. Тархины харвалт гэдэг нь тархины цусан хангамжийн дутагдал 85%, тархины цус харвалт 15%-иар илэрдэг мэдрэлийн үйл ажиллагаа хэсэгчлэн алдагдах эмгэг юм. Тархины цус харвалт нь том судасны

хатуурал, зүрхний эмболи, лакунар судасны ишеми, шалтгаан тодорхой бус ишеми зэргээр илрэх ба даралт ихсэх, чихрийн шижин, тамхидалт, гүрээний судасны нарийсал, тосгуурын фибрилляци, зүрхний дутагдал, архи хэтрүүлэн хэрэглэх, осол гэмтлийн эрсдэлт хүчин зүйлээр үүсгэгддэг байна<sup>5</sup>. Статистик судалгаагаар тархины судасны гаралтай өвчин (тархины цус харвалт, тархины шигдээс) цаашид нэмэгдэх хандлагатай байгаа нь эмчилгээ, урьдчилан сэргийлэх асуудал тулгамдаж буйг илэрхийлж байна. Тархины шигдээсийн эмгэг загвар үүсгэх аргачлалыг судалгаанд нэвтрүүлснээр туршилтын болон бусад эм бэлдмэлийн тархины эмгэг, тархины шигдээс, тархины харвалтанд нөлөөлөх үйлдлийн механизмыг тайлбарлах, шинжлэх ухаан (ШУ)-ы үндэслэлтэй нотолгоонд суурилсан үр дүн, дүгнэлт хийх судалгааны ач холбогдолтой юм.

**Тархины шигдээсийн эмгэг загвар:** Хүн болон амьтдын төрөл зүйлийн тархинууд хоорондоо илэрхий ялгаатай байдаг. Гэсэн хэдий ч эмнэл зүйн өмнөх судалгаанд амьтад дээр үүсгэсэн тархины шигдээсийн эмгэг загвар дээр судалгаа хийх нь судалгааны ач холбогдолтой. Тархины харвалтын эмчилгээний академи (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable/STAIR)-ийн удирдамжид эм бэлдмэлийн үйлдлийн эмнэл зүйн өмнөх судалгаа хийхээс өмнө хүн дээр эмнэл зүйн судалгааг хийхийг хориглосон байдаг<sup>7-9</sup>. Тиймээс бид тархины шигдээсэнд нөлөөлөх эм бэлдмэлийн судалгааг гарган авахын тулд эмнэл зүйн өмнөх судалгааг гүйцэтгэх зайлшгүй шаардлага үүсэж байна. Хүний эсийг ашиглан эмчилгээний төрөл бүрийн аргуудыг in vitro аргаар судлах нь цус харвалт өвчний судалгаанд өндөр ач холбогдолтой, зардал багатай, үр дүн сайтай гэж тооцогддог<sup>10,11</sup>. Хүний тархи болон амьтдын тархины нэг гол ялгаа нь тархины цагаан бодис юм. Цагаан бодис нь хүний тархины эдийн 60%-ийг, нохойнд 35%, туулайнд 20%, хулганад 10%-ийг эзэлдэг<sup>12</sup>. Тиймээс хүний тархины шигдээсийг судлахын тулд

энэхүү цагаан бодисын хэмжээг анхаарч үзэх шаардлагатай байдаг<sup>13</sup>.

**Туршилтын жижиг амьтан болон том амьтанд үүсгэдэг тархины шигдээсийн эмгэг загварууд:** Тархины шигдээсийн үндсэн механизмыг судлахын тулд хэд хэдэн төрлийн туршилтын амьтдыг ашигладаг<sup>14-17</sup>. Тархины цус харвалтын эмнэл зүйн өмнөх судалгаануудыг ихэвчлэн жижиг амьтан,

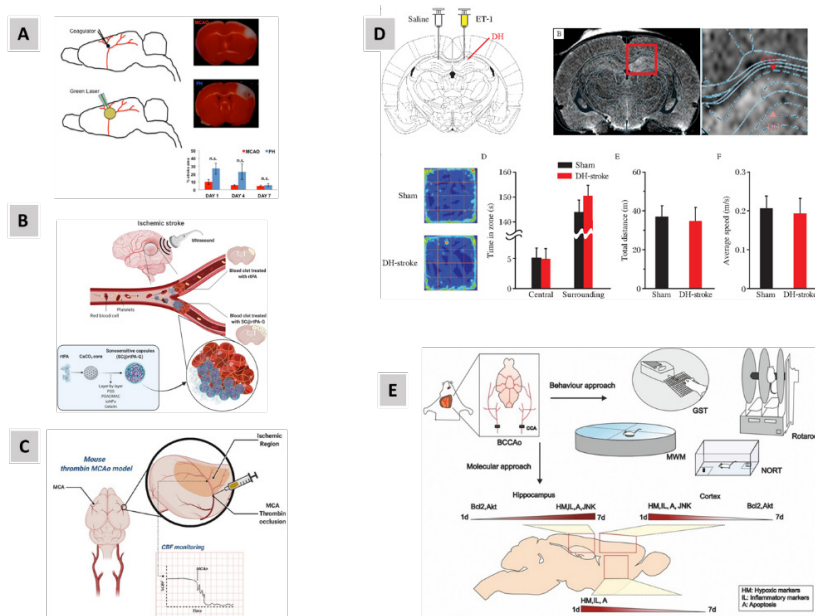
ялангуяа мэрэгчийн төрлийн амьтад дээр гүйцэтгэдэг. Энэ нь ишемийн үеийн тархины эд дэх биохимийн болон молекулын түвшинд гэмтлийн механизмыг тайлбарлахад давуу талтай<sup>18,19</sup>. Туршилтын харханд тархины шигдээс үүсгэх хэд хэдэн төрлийн аргачлал байдаг. Тойм судалгаагаар олон улсад хэрэглэгддэг үндсэн 5 төрлийн аргачлалыг голчлон судалж нэгтгэн Хүснэгт 1-т харуулав.

**Table 1. Experimental models of brain ischemia in rodents**

| Methods                                   | Diagnostic parameters                                                                                                                                                                                                                            | Reference                                                             |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Middle cerebral artery occlusion          |                                                                                                                                                                                                                                                  | S. Liu, 2009, D.W. Howells 2010, V.E. O'Collins 2006, Koisumi J 1986. |
| Bilateral common carotid artery occlusion | Brain tissue infarction volume, Cas-3, COX-2, ROS, SOD, Arg-1, Microglia/macrophage-specific protein-1, Bcl-2, BDNF, TrkB, NGF, rCBF, MABP, Blood P <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Blood P <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MRI, µCT/Brain analysis | Demarin V 2012, Bruijn R.F 2015, Adelborg K 2017.                     |
| Thromboembolic method                     |                                                                                                                                                                                                                                                  | Durukan A 2007, Orset 2007.                                           |
| Entoteluim-1 method                       |                                                                                                                                                                                                                                                  | Beirnaskie M 2001, Sablone M 2003.                                    |
| Photo thrombosis method                   |                                                                                                                                                                                                                                                  | Kleinschnits C 2008, Watson B.D 1985.                                 |

Үүнд гүрээний хоёр талын ерөнхий артери (BCCAO/Bilateral common carotid artery occlusion)-йн бөглөрөл, гүрээний хоёр талын судасны нарийсал (CCA/bilateral CCA stenosis) үүсгэх, Тромбоэмболи үүсгэх аргачлал, Эндотелин-1 тарих аргачлал болон ультра

туяа (Photo thrombosis)-р тромбо үүсгэх, дунд тархины артерийн судсыг бөглөх гэсэн аргууд багтана. Туршилтын амьтад тархины шигдээсийн эмгэг загвар үүсгэх судалгааны түгээмэл хэрэглэгддэг аргачлалуудыг Зураг 1-т тоймлон харуулав<sup>20-24</sup>.



**Picture 2. Experimental models of brain ischemia: A. Middle cerebral artery occlusion, B. Photothrombotic, C. Thromboembolic, D. Endotelium-1, E. Bilateral common carotid artery occlusion.**

Тархины төрөл бүрийн артерийн судаснуудаар тархины шигдээс/реперфузи үүсгэх амьтны загвар, аргачлалууд байдаг ба эдгээрээс сонгохдоо хүний цус харвалтын эмгэг физиологитой ойролцоо аргачлалыг сонгож судалгааны зорилго, зорилтод нийцүүлэн судалгааны аргачлалыг сонгож авна. Сүүлийн жилүүдэд туршилтын харханд цус харвалтын төрөл бүрийн эмгэг загваруудыг ашиглаж эмийн үйлдлийг судлах аргачлалуудыг өргөнөөр ашиглаж байна. Үүнээс тархины шигдээсийг дунд тархины артерийн бөглөрөл үүсгэх (MCAO/R, Middle Cerebral Artery Occlusion/Reperfusion, ДТАБ) аргачлалыг тархины эмгэгийн нийт судалгааны 40 гаруй хувьд ашиглаж байна<sup>25,26</sup>. Энэхүү аргачлал нь хүний тархины шигдээсийн харвалттай хамгийн ойр механизмаар явагддаг хэмээн үздэг<sup>27</sup>. Тархины шигдээс болон тархины гэмтлийн хооронд нарийвчилсан тодорхой ялгаа байхгүй бөгөөд тархины шигдээсийн эмгэг загвар нь тархины гэмтлийн түвшинг илүү нэмэгдүүлдэг. Тиймээс туршилтын амьтдын тархинд мэс заслын аргаар дунд тархины артерийн бөглөрөл үүсгэх үед тархинд шигдээс илүүтэйгээр үүсдэг тул энэ нь нийтээр зөвшөөрөгдсөн, стандартаар батлагдсан аргачлал гэж үзэж судалгаанд өргөн хэрэглэгддэг. ДТАБ эмгэг загварыг үүсгэхийн өмнө туршилтын хархны тархины зүүн болон баруун хэлтэрт ишеми үүсгэх үү, тархины ишеми үүсгэх үү, эсвэл тархины ишеми-реперфузын загварыг ашиглах уу гэдгийг сайтар анхаарах ёстой<sup>28,29</sup>.

#### **ДТАБ буюу МСАО эмгэг загвар үүсгэх:**

Ихэвчлэн тархины шигдээсийн гаралтай тархины харвалт нь дунд тархины артерийн бөглөрөлт (MCA, Middle cerebral artery)-өөс үүсдэг. Тиймээс хүний тархины голомтот ишемитэй дүйцэх эмгэг загвар үүсгэхийн тулд туршилтын харханд дунд тархины артерийн бөглөрөл үүсгэх аргачлалыг сонгож авсан. Туршилтын аргачлалыг 2 төрлөөр гүйцэтгэдэг. Энэхүү аргачлалыг анх 1986 онд эрдэмтэн Койзуми судалгаанд нэвтрүүлсэн бөгөөд 1989 онд эрдэмтэн Лонга сайжруулан аргачлалыг баталгаажуулжээ<sup>30,31</sup>. Лонгагийн аргачлал нь

захын гүрээний артер (external carotid artery)-ийн дотуур нийлэг гаралтай утас оруулж, артерийн судасны бөглөөс үүсгэх ба тархины шигдээсийн улмаас гэмтсэн тархины эд нь хажуугийн гүрээний энгийн артери (CCA/bilateral common carotid arteries, ХГЭА)-ийн нөхөн төлжилтөөр сэргээгддэг. Койзумигийн аргачлал нь артерийн судасны бөглөөсийг ХГЭА-иар дамжуулан эмгэг үүсгэж, эдгэрэлтийн зэргийг Виллисийн цагираг (Willis ring)-ын нөхөн сэргэлтээр үнэлдэг<sup>32</sup>. Тархины дунд артерийн түр зуурын болон байнгын бөглөрөл (MCAO)-ийн эмгэг загвар нь цусны даралт ихсэх үеийн цусны даралт багасах (артерийн даралт ихсэх үеийн тархины цусны даралт буурах), зүрхний шигдээсийн хэмжээтэй урвуу хамааралтай ба өөрөөр хэлбэл тархины цусны урсгал (CBF/cerebral blood flow, ТЦУ) их байх тусам тархины шигдээс бага байдаг<sup>33,34</sup>. ТЦУ нь мэдрэлийн эсүүд, астроцитуудаас нийлэгждэг төрөл бүрийн медиаторуудаар зохицуулагддаг бөгөөд артерийн судасны гөлгөр булчингийн эсүүд болон перикитүүдэд шууд ба шууд бусаар нөлөөлдөг<sup>35-38</sup>. Тархины шигдээсийн үед тухайн медиаторууд нь мэдрэлийн сэрэл дамжилт, мэдрэлийн эсүүдийн хэвийн үйл ажиллагааг хангах үүрэг гүйцэтгэдэг бөгөөд үүний зэрэгцээгээр глутамат (glutamate), эсийн доторх  $Ca^{2+}$  нэмэгдэх, простагландин үүсэх, азотын хэт исэл (nitric oxide) үүсэх зэрэг хүчин зүйлүүд нь мэдрэлийн эсүүдийг үхэлд хүргэдэг<sup>36,37</sup>. Мэдрэлийн судалын үйл ажиллагааны хямрал нь хэдэн өдрийн турш үргэлжилж болох бөгөөд энэ нь тархины шигдээсийн инсульт (цус харвалтын эзэлхүүн)-ийн түвшингээс хамаардаг<sup>38</sup>. Дунд тархины артерийн судсанд бөглөрөлт үүсгэх аргачлал нь тархины шигдээсийн анхдагч гэмтэл, улмаар мэдрэлийн эсийн гэмтэл, цус-тархины саад (BBB/Blood-brain barrier)-ын гэмтэл үүсгэдэг. Энэ нь артерийн судасны бөглөрөлийн эхний үе шатанд тархины шигдээс их байдаг төдийгүй мэдрэлийн гаралтай эмгэгээс хамгаалах судалгаанд нэн тохиромжтой<sup>39,40</sup>. Хүнд тохиолдох тархины гэмтлээс ялгаатай нь ДТАБ-ийн эмгэг загвар

үүсгэснээс хойш 60 минутын дараа туршилтын харх, хулганад гипоталамусын шигдээсийн гаралтай гипертерми нь 1-7 хоногийн турш үүсдэг<sup>41,42</sup>.

**Гүрээний хажуугийн хоёр ерөнхий артери (ГХХЕАБ)-йн бөглөрөл үүсгэх эмгэг загвар:** Гүрээний артерийн нарийсал, тосгуурын фибрилляци, зүрхний дутагдал зэрэг тромбоэмболийн хүндрэлээс хүний тархины шигдээс үүсдэг. ГХХЕАБ үүсгэх загвар нь харханд түр зуурын болон архаг тархины шигдээс үүсгэхэд харьцангуй хурдан, хялбар аргачлал юм. Хархны тархинд ихэвчлэн хүний цус харвалттай төстэй, мэдрэхүйн гэмтэл болон цагаан бодисын хямрал явагддаг. Гэвч энэ нь туршилтын хархны харааны төвгөрийн үйл ажиллагааг алдагдуулдаг сул талтай тул C57BL/6 хулганыг ашиглах нь тохиромжтой. Хулганы загварыг ашиглах нь тархины шигдээсийн эмгэгийн үе дэх үхлийг <2% хүртэл бууруулдаг ба харааны бэрхшээл үүсгэдэггүй давуу талтай<sup>43-45</sup>. Гүрээний хоёр талын ерөнхий каротид артерийн судасны нарийсал (BCAS)-ийн эмгэг загвар нь гүрээний артерид суулгасан бичил гуурсны диаметрийг өөрчлөх замаар тархины гипоперфузийн хүндрэлээр үүсгэгддэг. Энэхүү аргачлалаар үүсгэсэн тархины шигдээс нь хүний тархины архаг гипоперфузийн улмаас үүссэн цагаан бодисын гэмтэлтэй ойролцоо байдаг<sup>46-48</sup>.

**Тромбоэмболийн эмгэг загвар (Thromboembolic):** Тархинд шигдээс үүсгэх бас нэгэн аргачлал нь тромбоэмболизм үүсгэх юм. Тромбоэмболийн бүлэгнэлтийн эмгэг загвар нь эмгэг үүсгэх зам, бүлэгнэлтийн талбайгаас ихээхэн хамаарна. Тромбоэмболийн бүлэгнэл нь аутологи (цусны үүдэл эсийг өөрт нь шилжүүлэн суулгасан цусны сийвэн)-ийн гаралтай бөгөөд артерийн судас бөглөрлийн замаар тархины шигдээс үүсгэдэг<sup>49</sup>. Сонгодог арга бол гүрээний артерийн бөглөрөл үүсгэхийн тулд дунд тархины артери (MCA) эсвэл тархины дотор талын каротид артери (ICA) руу тромбиныг шууд тарих юм<sup>50</sup>. Тархины шигдээсийн загварт цөөн тооны ялтас эс, полимержсэн фибрин

ашиглаж судасны өтгөрөл үүсгэдэг<sup>51</sup> нь хүний тархины шигдээсийн үед тромбоцит, фибрины хуримтлал, нейтрофил, моноцитуудын бөөгнөрөл, эритроцитуудын хуримтлалтай төстэй байдгаараа онцлогтой. Судасны өтгөрөл болсноор тархинд мэдэгдэхүйц байдлаар олон тооны голомтот шигдээс үүсдэг<sup>52</sup>. Мөн цусны урсгалыг хаахын тулд микросфер/ макросфер ашигладаг. Тархинд үүссэн байнгын шигдээсийг PET эсвэл MRI-ийн шинжилгээгээр хянах боломжтой<sup>53</sup>.

**Эндотелин-1 эмгэг загвар (ET-1):** ET-1 (Артерийн судсыг нарийсгагч уураг) тарилга хийсний дараа тархины цусны урсгал хурдан буурдаг. ET-1-ыг дунд тархины артери (MCA)-д тарих эсвэл тархи руу шууд тарих замаар эмгэг үүсгэдэг. ET-1 аргыг хулганаас илүүтэй харханд үүсгэх нь илүү тохиромжтой байдаг боловч гэмтлийн хэмжээ нь харьцангуй өөр өөр байдгийг бодолцож үзэх шаардлагатай<sup>54-57</sup>.

**Фото тромбоз үүсгэх аргачлал (Photo thrombosis model):** Энэ эмгэг загварын зарчим нь гэрэлд мэдрэмтгий будаг, тухайлбал Rose Bengal эсвэл эритрозин В-г судсаар тарих арга юм. Судалгааны зорилгоос хамааран тархины тодорхой хэсгүүдэд тархины шигдээс үүсгэж болно. Будаг илэрснээс хойш хэт исэлдэлтийн хорт бүтээгдэхүүнүүд (ROS) үүсч, интрапаренхимийн судаснуудад хуримтлагдсанаар эндотел эсийн гэмтэл, ялтаст эсийн идэвхжилт болон тромби үүсгэдэг эмгэг жамтай. Энэхүү аргын давуу тал нь шигдээсний үед тархины эсийн үхэл маш хурдацтай явагддаг. Сул тал нь шигдээсийн гэмтэл нь хүний тархины цус харвалтаас ялгаатай, эсийн доторх болон эсийн гаднах хаван нь цочмог байдлаар илэрдэг<sup>58-63</sup>.

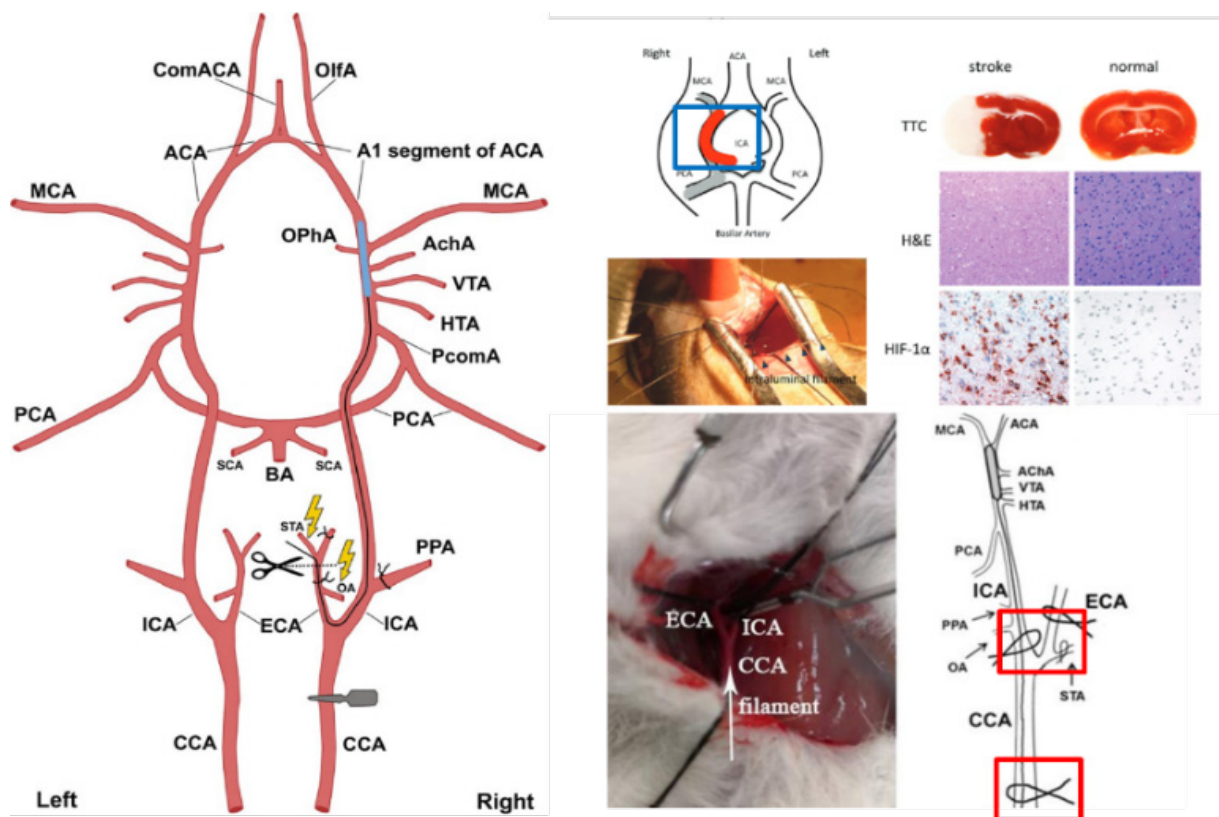
**Туршилтын хулганад дунд тархины бөглөрөлийн эмгэг загвар үүсгэх, эмчилгээний үр дүнг үнэлэх/ баталгаажуулах үзүүлэлтүүд:** Тархины шигдээсийн гаралтай тархины харвалтанд нөлөөлөх үйлдлийг тогтоох судалгааг дунд тархины артерийн судсанд бөглөрөлийн эмгэг загварыг үүсгэх аргачлалаар гүйцэтгэнэ.

Туршилтын амьтан: Туршилт судалгаанд

зориулалтын тэжээлтэй, тусгай орчин ( $21 \pm 20^\circ\text{C}$  12 цаг гэрэлтэй, 12 цаг харанхуй нөхцөлд, чийгшил 60-70%-д өсгөж үржүүлсэн 22-26 гр жинтэй (7-9 долоо хоногийн настай) C57/BL6 шугмын эр хулгана ашиглана. Туршилтыг амьтны ёс зүйн хэм хэмжээг баримтлан ёс зүйн зөвшөөрөл авсны дараа гүйцэтгэнэ.

Туршилтын хулганад дунд тархины артерийн судасны бөглөрөл (Middle cerebral artery, MCA) үүсгэх: Туршилтын хулганыг индукцийн камерт оруулан бага урсгалт мэдээ алдуулалтын системийг ашиглан индукцийн камер луу изофлуран (isoflurane)-ы 4-5%-ийн

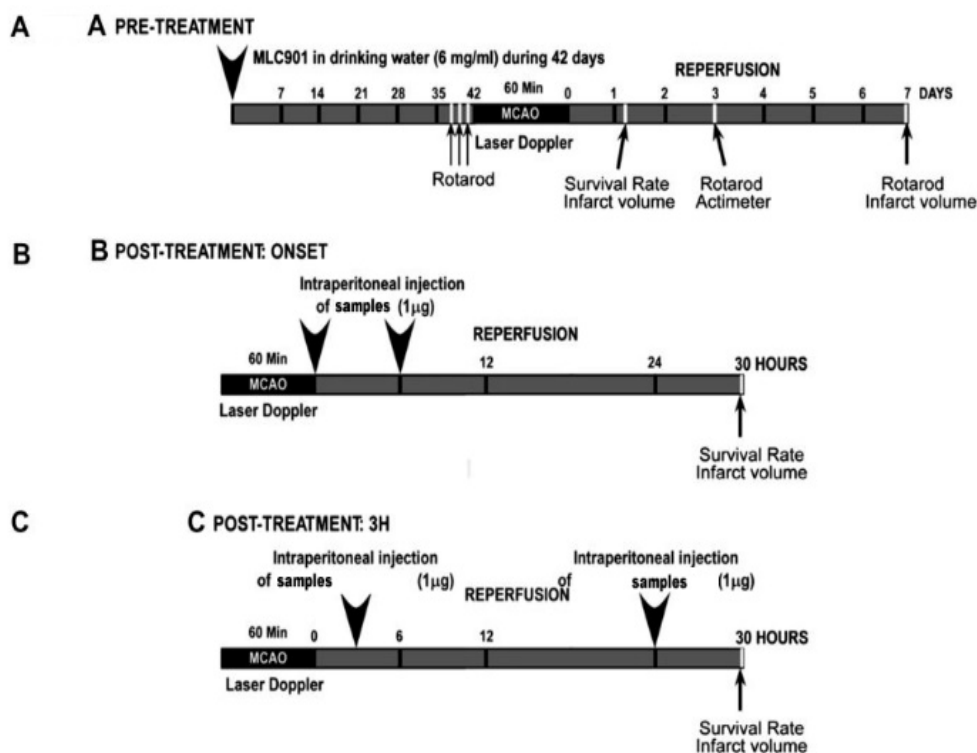
уусмалыг 500 мл/мин хурдаар оруулан мэдээ алдуулалтыг хийнэ. Мэсзаслын явцад хулганыг хэсэг газрын мэдээ алдуулалт (амьсгалын замаар)-ын дор мэс заслын дулаан хавтан руу шилжүүлнэ. Амьсгалын замаар мэдээ алдуулалтыг 1-2%-ийн изофлураны уусмалыг 250 мл/мин хурдаар хийнэ. Нүд гэмтэхээс хамгаалан туршилтын хулганыг нүдэнд хиймэл нулимс дусаана. Тархины шигдээсийн эмгэг загварыг үүсгэхдээ дунд тархины зүүн талын артерийн судсанд Intraluminal filament-ын мэс заслын аргаар гүйцэтгэнэ<sup>64</sup>.



**Picture 2. Intraluminal monofilament method for transient middle cerebral artery occlusion (MCAO)**

Гүрээний ерөнхий артери дээр хавчаар тавина. Монофиламент (6-0 coated)-ыг гүрээний гадна артери (ECA)-р оруулан гүрээний дотно артери (ICA)-иар дамжуулан дунд тархины гүрээний артериуд (MCA, VTA, AchA)-ын замыг хааж нийт 13 мм оруулна. Монофиламентийг 90 миунтын турш тавина (Зураг 2). Ингэснээр дунд тархины цусны урсгал хаагдаж тархины эдэд цусан хангамж

дутмагшил явагдаж тархины эд үхжиж тархины шигдээсийн гэмтэл үүснэ.



**Picture 3. Flowcharts show the different in-vivo experimental designs. In A, B and C, mice underwent a 60 minute middle cerebral artery occlusion (MCAO). (A) Pre-Treatment:** Investigating medicine administered during 42 days (6 weeks) in drinking water (6 mg/ml) before surgery. **(B) Post-treatment: ONSET.** Investigating medicine was intraperitoneally injected (1 mg per mouse) at the onset and six hours after ischemia. **(C) Post-treatment: 3H.** Investigation medicine was intraperitoneally injected (1 mg per mouse) 3 and 24 h after ischemia. Мэс засал хийгдсний дараа туршилтын хулганыг 370C-д 1 цагийн турш байлгана. Үүний зэрэгцээгээр тархины шигдээсийн хүндрэлийг хянахын тулд тархины цусны урсгалыг (rCBF) Laser-Doppler flowmetry багажийг ашиглан тодорхойлно<sup>65-70</sup>.

**Физиологийн үзүүлэлтүүд:** Ерөнхий мэдээ алдуудалтыг 3%-ийн изофлуранаар хийж, амьсгалын замын мэдээ алдуулалтыг 1%-ийн изофлуранаар гүйцэтгэж, туршилтын хулгануудын (n=5) цусны артерийн дундаж даралт (МАВР)-ыг хэмжинэ. Мөн шулуун гэдсээр туршилтын хулганы биеийн температурыг хэмжиж физиологийн үзүүлэлтүүдийг тодорхойлно. Туршилтын хулганы дунд чөмөгний артерийн судаснаас гепаринтай нөхцөлд цус (75 µl)-ыг цуглуулан цусны PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> болон цусны pH-ийг тодорхойлно<sup>70</sup>.

**Тархины шигдээсийн хэмжээг үнэлэх TTC аргачлал:** Эмчилгээний 1,3,7 дахь өдөр тархины шигдээсийн талбайг трифенил

теразол хлорид (ТТС) будгийн аргаар будаж тодорхойлно. Хулганы тархины хэсгийг авч, -200C-д 20 минут хөлдөөсний дараа 2 мм зузаантай зүсэж, зүссэн тархины эдийг 1% ТТС уусмалд хийж 370C-д 10 минут халаана. Эрүүл хэсэг улаан, шигдээс үүссэн хэсэг цагаан өнгөөр будагдах ба будагдсан тархийг 4%-ийн формалины уусмалд 24 цаг тогтворжуулна. Тархины шигдээсийн талбайг Image J программийн тусламжтайгаар үнэлнэ<sup>71</sup>. Тархины шигдээсийн хэмжээг тодорхойлсны дараа бусад шинжилгээнүүдийг гүйцэтгэнэ.

**Мэдрэхүй, хөдөлгөөнийг үнэлэх аргачлал:** Эмчилгээний 1,3,7 дахь хоногт мэдрэхүй, хөдөлгөөнийг тестийн 0-3 оноогоор шигдээс үүссэн эсэхийг үнэлнэ. Уг үнэлгээгээр 1

буюу түүнээс дээш оноо бол мэдрэхүй, хөдөлгөөний тест эерэг гэж үзнэ. Туршилтын харханд тархины шигдээсийн эмгэг загвар үүссэн үед 3 оноогоор үнэлэгдэж, эмчилгээний үед тархины шигдээс багасан мэдрэлийн эс сэргэж хөдөлгөөний идэвх сайжирч байвал үнэлгээний оноо буурна.

Сийвэн болон тархины эдэд үрэвслийн маркеруудын агууламжийг тодорхойлох аргачлал: Туршилтын хархнаас цус цуглуулан авч тасалгааны температурт 20 минут байлгасны дараа хөргүүртэй центрифугаар 3000 эрг/мин хурдаар 20 минут хурилдуулан сийвэнг ялган үрэвслийн маркер (IL-1B, TNF-а, IL-6, IL-10)-уудыг фермент холбох урвал (ELISA)-аар тодорхойлно. Дунд тархины зүүн тал хэлтэрээс 1 гр хэмжин авч 9 мл PBS уусмалд хийж 60 секундын хугацаанд соникатор аппаратаар тархины эдийг гомогенжүүлнэ. 5000 эрг/мин-р 15 мин хурилдуулан супернатантыг ялган үрэвслийн маркеруудыг тодорхойлно. Мөн тархины эдэд иммуногистохимийн аргаар үрэвслийн маркерууд (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-4) болон arginase-1 (Arg-1), microglia/macrophage-specific protein-1 (Iba-1), b cell lymphoma-2 (Bcl-2) уургуудын нийлэгжилтийг тодорхойлно. Хархны тархины эдэд transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), brain-derived neurotropic factor (BDNF), tyrosine protein kinase (TrkB), nerve growth factor (NGF)-ийн мРНХ экспрессийг RT-qPCR-р тодорхойлно.

Соронзон резонансийн зураг авах (Magnetic resonance imaging, MRI): Тархины шигдээсийн эмгэг физиологийг in vivo аргаар судлахад функциональ MRI (fMRI) маш чухал юм. Судалгааны үр дүнг дүгнэхэд MRI шинжилгээг зайлшгүй хийсэн байх шаардлагатай. fMRI нь тархины шигдээсийн талбай, эргэн тойронд байгаа мэдрэлийн эд, эсүүдийн хариу урвал, тархины эдийн зохион байгуулалт, нөхөн төлжилт, тархины цусан хангамж зэрэг маш олон үр дүнг харуулдагаараа давуу талтай.

Үр дүнгийн статистик боловсруулалт: Судалгааны үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг GraphPad Prism програмаар

хийж, судалгааны бүлэг хоорондын ялгааг Стьюдентийн Т критерийр үнэлэн, Wilcoxon Mann-Whitney (параметрийн бус) тестээр  $p < 0.05$  үеийн үнэн магадлалын ялгаа, статистик хамааралыг тооцно.

### Дүгнэлт

Тархины шигдээсийн гэмтэл, түүний нөхөн төлжилтийг In vivo аргаар судлах төрөл бүрийн аргачлал хэрэглэгдэж байгаагаас дунд тархины артерийн судсанд бөглөрөл үүсгэх (MCAO) болон гүрээний хажуугийн хоёр артерийн судсанд бөглөрөл үүсгэх (BCCAO) аргачлалууд нь хамгийн тохиромжтой, туршилтын зардал багатай, туршилтын үр дүн сайтай байдгаараа бусад аргуудаас давуу талтай. Тархины шигдээс болон тархины гэмтэлд биологийн идэвх сайтай эм бэлдмэлийг гарган авах, тэдгээрийн үйлдлийг тогтооход MCAO, BCCAO эмгэг загваруудыг ашиглах нь илүү тохиромжтой.

### Ном зүй

1. Тархины цочмог харвалтын эмнэл зүйн удирдамж, Эрүүл мэндийн яамны эмнэл зүйн удирдамж (9), 2013, х.9.
2. Хү Юүй Рунг. Тархины шигдээс, реперфузын эмгэг загварын үед эрдэнэ үрлийн үзүүлэх механизмын судалгаа. Уламжлалт анагаах ухааны докторын зэрэг горилсон бүтээл. 2020.
3. Mozaffarian D., Benjamin EJ., Go AS., Arnett DK., et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: A report from the American Heart Association. Circulation. 131, 2015.p.29–32.
4. Di Carlo A. Human and economic burden of stroke. Age Ageing. 38, 2009.p.4-5.
5. Heather F. Sateia., Tomas M. De Fer. Амбулаторийн дотрын анагаах ухааны вашингтон гарын авлага. 2 дахь хэвлэл, 2010. х.1043-1044.
6. Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke Participants: Stem cell therapies as an emerging paradigm in stroke (STEPS): Bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic

- factor therapy in treating stroke. *Stroke* 40: 2009.p.510-515.
7. Savitz SI., Chopp M., Deans R., et al. STEPS Participants: Stem cell therapy as an emerging paradigm for stroke (STEPS) II. *Stroke* 42: 2011.p.825-829.
8. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR): Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30: 1999.p.2752-2758.
9. Hanke T. Lessons from TGN1412. *Lancet* 368: 2006.p.1569-1570.
10. Römer PS., Berr S., et al. Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood* 118: 2011.p. 6772-6782.
11. Krafft PR., Bailey EL., Lekic T., Rolland WB et al. Etiology of stroke and choice of models. *Int J Stroke* 7: 2012.p.398-406.
12. Ahmad AS., Satriotomo I., et al. Considerations for the optimization of induced white matter injury preclinical models. *Front Neurol* 6: 172, 2015.
13. Edrissi H., Schock SC., et al. Cilostazol reduces blood brain barrier dysfunction, white matter lesion formation and motor deficits following chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res* 1646: 2016.p.494-503.
14. Shibata M., Ohtani R., Ihara M and Tomimoto H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 35: 2004.p.2598-2603.
15. Hattori Y., Enmi J., Kitamura A., et al. A novel mouse model of subcortical infarcts with dementia. *J Neurosci* 35: 2015.p.3915-3928.
16. Chen A., Akinyemi RO., Hase Y., et al. Frontal white matter hyperintensities, clasmotodendrosis and gliovascular abnormalities in ageing and post-stroke dementia. *Brain* 139: 2015.p.242-258.
17. McCabe C., Arroja MM et al. Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra. *Neuropharmacology* 134: 2018.p.169-177.
18. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 44: 2003. p.85-95.
19. S. Liu, G. Zhen, B.P. Meloni, K. Campbell, H.R. Winn Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials, *J. Exp. Stroke Transl. Med* (2) 2009. p.2-27.
20. Clara Correa-Paz, Maria F. Navarro Poupard et al. Sonosensitive capsules for brain thrombolysis increase ischemic damage in stroke model. *Journal of Nanobiotechnology* 20, 2022.
21. Yi-Min Kuo., Yu-Yo Sun., Chia-Yi Kuan. A fibrin-enriched and tPA-Sensitive Photothrombotic Stroke Model. *Neuroscience*, Issue 172, 2021.p.617-40.
22. Yunn-Hwa Ma., Chih-Hsin Liu et al. Targeted delivery of plasminogen activators for thrombolytic therapy: An integrative evaluation. *Molecules* (24), 2019.p.3407.
23. Maria Luisa Cotrina., Nanghong Lou et al. Direct comparison of microglial dynamics and inflammatory profile in photothrombotic and arterial occlusion evoked stroke. *Neuroscience*.343, 2017.p.483-494.
24. Abhipradnya Bipin Wahul et al. Transient global cerebral ischemia differentially affects cortex, striatum and hippocampus in Bilateral common carotid arterial occlusion (BCCAO) mouse model. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, Vol 92. 2018.p.1-15.
25. Heurteaux C., Laigle C., Blondeau N., Jarretou, G., Lazdunski, M. Alaphalinolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia. *Neuroscience* 137, 2006a.p.241-251.
26. D.W. Howells., M.J. Porritt., et al. Different strokes for different folks: the rich diversity

- of animal models of focal cerebral ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab* (30), 2010.p.1412-1431.
27. V.E. O'Collins., M.R. Macleod et al. 1,026 experimental treatments in acute stroke, *Ann. Neurol* (59), 2006.p.467-477.
  28. M. Fisher., G. Feuerstein., et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations, *Stroke* (40), 2009. p.2244-2250.
  29. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development stroke therapy academic industry roundtable (STAIR) *Stroke* (30), 1999.p. 2752-2758.
  30. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. *Nosotchu* 8(1): 1986.p.1-8.
  31. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20(1):1989.p.84-91.
  32. Yong Li., Li Tan et al. Comparison of middle cerebral artery occlusion models conducted by Koizumi and Longa methods: A systematic review and meta-analysis of rodent data. *Scientific reports. Nature research* (13), 2023.p.10247.
  33. Nagel S., Papadakis M., Chen R., et al. Neuroprotection by dimethylxalylglycine following permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* (31): 2011.p.132–143.
  34. Sutherland BA., Buchan AM. Alteplase treatment does not increase brain injury after mechanical middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* (33) 2013,p.1–7.
  35. Hall CN., Reynell C., Gesslein B., et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* (508); 2014.p.55–60.
  36. Attwell D., Buchan AM., Charpak S., et al. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* (488); 2010, p.232–243.
  37. Jackman K., Iadecola C. Neurovascular regulation in the ischemic brain. *Antioxid Redox Signal* (22); 2015.p.149–160.
  38. Sutherland BA., Minnerup J., Balami JS., et al. Neuroprotection for ischaemic stroke: Translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke* (7); 2012.p.407–418.
  39. Howells DW., Porritt MJ., Rewell SS et al. Different strokes for different folks: The rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:2010.p.1412-1431.
  40. Kuraoka M, Furuta T., Matsuaki T., et al. Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Exp Anim* 58:2009.p.19-29.
  41. Li F., Omae T and Fisher. Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke* 30: 1999.p.2464-2470.
  42. Barber PA., Hoyte L., Colbourne F and Buchan AM. Temperature- regulated model of focal ischemia in the mouse: A study with histopathological and behavioral outcomes. *Stroke* 35: 2004.p.1720-1725.
  43. Demarin V., Zavoreo I and Kes VB. Carotid artery disease and cognitive impairment. *J Neurol Sci* 322: 2012.p.107-111.
  44. de Bruijn RF., Heeringa J., Wolters FJ., et al. Association between atrial fibrillation and dementia in the general population. *JAMA Neurol* 72: 2015.p.1288-1294.
  45. Adelborg K., Szépligeti S., Sundbøll J., et al. Risk of stroke in patients with heart failure: A population-based 30-year cohort study. *Stroke* 48: 2017.p.1161-1168.
  46. Shibata M., Yamasaki N., Miyakawa T., et al. Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 38: 2007.p.2826-2832.
  47. Ihara M., Taguchi A., Maki T., et al. A mouse model of chronic cerebral hypoperfusion characterizing features of

- vascular cognitive impairment. *Methods Mol Biol* 1135: 2014.p.95-102.
48. Washida K., Hattori Y and Ihara M. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: From mouse to primate. *Int J Mol Sci* 20:2019.p. 6176.
  49. Durukan A and Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87: 2007.p.179-197.
  50. Orset C., Macrez R., Young AR., et al. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 38: 2007.p.2771-2778.
  51. Smith WS., Sung G., Starkman S., et al. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: Results of the MERCI trial: *Stroke* 36: 2005.1432-1438.
  52. Niessen F., Hilger T., Hoehn M and Hossmann KA. Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke* 34: 2003.2019-2024.
  53. Walberer M and Rueger MA. The macrosphere model-an embolic stroke model for studying the pathophysiology of focal cerebral ischemia in a translational approach. *Ann Transl Med* 3: 2015.p.123.
  54. Biernaskie J., Corbett D., et al. A serial MR study of cerebral blood flow changes and lesion development following endothelin-1-induced ischemia in rats. *Magn Reson Med* 46: 2001.p.827-830.
  55. Sablone M., Baumann D., Mir AK and Perry VH. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 2003.p.1276-1286.
  56. Horie N., Maag AL., et al. Mouse model of focal cerebral ischemia using endothelin-1. *J Neurosci Methods* 173: 2008.p.286-290.
  57. Ansari S., Azari H., Caldwell KJ., et al. Endothelin-1 induced middle cerebral artery occlusion model for ischemic stroke with laser Doppler flowmetry guidance in rat. *J Vis Exp*: 50014, 2013.
  58. Gyung W. Kim., Taku Sugawara et al. Involvement of oxidative stress and caspase-3 in cortical infarction after photothrombotic ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1690-1701, 2000.
  59. Kleinschnitz C., Braeuninger S., Pham M., Austinat M., et al. Blocking of platelets or intrinsic coagulation pathway-driven thrombosis does not prevent cerebral infarctions induced by photothrombosis. *Stroke* 39: 2008.p.1262-1268.
  60. Watson BD., Dietrich WD., Busto R., et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17: 1985.p.497-504.
  61. Dietrich WD., Ginsberg MD., et al. Photochemically induced cortical infarction in the rat. Time course of hemodynamic consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* 6: 1986.p.184-194.
  62. Lee VM., Burdett NG., Carpenter A., et al. Evolution of photochemically induced focal cerebral ischemia in the rat. Magnetic resonance imaging and histology. *Stroke* 27: 1996.p. 2110-2119.
  63. Provenzale JM., Jahan R., et al. Assessment of the patient with hyperacute stroke: Imaging and therapy. *Radiology* 229: 2003.p.347-359.
  64. Clara Correa-Paz, Maria F. Navorro Poupard et al. Sonosensitive capsules for brain thrombolysis increase ischemic damage in stroke model. *Journal of Nanobiotechnology* 20, 2022.
  65. Verena Staedtke Renyeen Bai et al. Clostridium novyi-NT can cause regression of orthotopically implanted glioblastomas. *Oncotarget* 6(8), 2015.p.5536-5546.
  66. Lu Cao., Haoting Li et al. Real-time imaging of infarction deterioration after ischemic stroke in rats using electrical impedance tomography. *Physiological Measurement*

- 41(1), 2020.
67. Gubskiy IL., Namestnikova DD., et al. MRI Guiding of the Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats Aimed to Improve Stroke Modeling. Transl Stroke Res 9(4): 2018.p.417-425.
  68. Kutluay Uluc., Amrendra Miranpuri et al. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. Journal of Visualized Experiments, Issue 48. 2011.p.1-5.
  69. Heurteaux C., Gandin C et al. Neuroprotective and neuroproliferative activities of NeuroAid (MLC601, MLC901), Chinese medicine, in vitro and in vivo. Neuropharmacology 58. 2010.p.987-1001.
  70. Okuno, S., Nakase, H., & Sakaki, T. Comparative study of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) and hematoxylin–eosin staining for quantification of early brain ischemic injury in cats. Neurological Research, 23(6),2001,p. 657–661.
  71. Bederson J B., Pitts L H., et al. Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke, Vol.17, No.3, 1986.p.472-476.