

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

Э. А. Пономарев, В. В. Новочадов, Н. Н. Стрепетов

Кафедра патологической анатомии, кафедра госпитальной хирургии ВолГМУ

В эксперименте на лабораторных животных воспроизведена модель ишемии-реперфузии головного мозга. Применена окраска секций гематоксилин-эозином, по Нисслию и иммуногистохимическое выявление экспрессии NOS1, NOS3, TRAIL. Произведена общая оценка патологии по отделам головного мозга и характера отсроченной гибели нейронов (апоптоза) без церебропротекции и с использованием популярных нейропротекторов. Выявлены характерные цитотоксические (коагуляционный, пикноморфный и колликвационный некроз нейронов) и сосудистые (застой крови, эритропедез) изменения. Сделан вывод об убывании нейропротективной активности препаратов в ряду: АКФ-90-7 > цитофлавин > эноксифол > актовегин > мексидол.

Ключевые слова: головной мозг, ишемия-реперфузия, нейропротекция.

MORPHOLOGICAL NEUROPROTECTION PARAMETERS OF RAT BRAIN WITH ISCHEMIA-REPERFUSION

E. A. Ponomarev, V. V. Novochadov, N. N. Strepetov

In our research carried out on experimental animals we produced a model of ischemia-reperfusion. We dyed a section of brain tissues with hematoxyline-eosine, Nissl and used immunohistological exposure of expression of NOS1, NOS3, TRAIL. We estimated pathology in parts of brain and the nature of delayed death of neurons (apoptosis) without cerebroprotection and with popular neuroprotectors. Typical cytotoxic (coagulation, picnomorphic and colliquative necrosis of neurons) and vascular (haemostasis, erythropedesis) changes were revealed. A conclusion was made that neuroprotective activity of drugs decreases in the following way: AKF-90-7>Cytoflavin > Enoxifol> Actovegin> Mexidol.

Key words: brain, ischemia-reperfusion, neuroprotection.

Лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности во всем мире занимают цереброваскулярные заболевания, преобладающими среди которых имеют ишемические поражения центральной нервной системы [2, 6]. До 25 % ишемических инсультов и транзиторных ишемических атак (ТИА) связаны с осложнениями эмболического характера из бляшек, локализующихся в экстракраниальных отделах артериальной системы [3, 4]. Возможности профилактических мероприятий при данной патологии, во многом связаны с хирургическим вмешательством на экстракраниальных сосудах, проходящем на фоне ишемии-реперфузии головного мозга. Очевидна необходимость поиска новых данных о метаболических аспектах патогенеза, стадийности изменений биохимических процессов, возможностей нейропротекции головного мозга на данный период.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

1. Общая оценка характера патологии по основным отделам ГМ и оценка церебропротективного эффекта (окраска гематоксилин-эозином, по Нисслию).

2. Выявление механизмов отсроченной убыли нейронов (апоптоза) — иммуногистохимическое выявление экспрессии нейрональной и эндотелиальной нитроксидазы, лиганда TNF-зависимого апоптоза TRAIL.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 82 половозрелых крысах обоего пола массой 180—250 г. Животным под наркозом (30 мг/кг этаминал-натрия внутривенно) выделяли с обеих сторон *a. carotis communis*, которые клеммировали на соответствующий срок (экспериментальная группа), табл. 1.

Затем всем крысам опытной группы возобновляли кровоток по сонным артериям на 30 мин, после чего выводили из эксперимента передозировкой этаминал-натрия. Все процедуры выполняли в соответствии с «Правилами работы с лабораторными животными...». Клеммирование общих сонных артерий, как это уже неоднократно было показано исследованиями ишемии-реперфузии ГМ, приводит к ограничению церебрального кровотока примерно на 70—80 %, что сопровождается после реперфузии формированием обратимого повреждения нейронов в течение 8—12 ч, необратимого — при увеличении сроков ишемии [3, 5, 7].

Группа сравнения (22 крысы) была представлена животными, которым выполнялась ишемия головного мозга клеммированием сонных артерий на срок до 20 ч с 30-минутной реперфузией, без применения каких-либо препаратов, с последующими аналогичным выведением из эксперимента. Непосредственно после эвтаназии головной мозг (ГМ) животных из-

влекали щадящим образом из черепа, помещали в 10%-й раствор нейтрального забуференного формалина (рН = 7,4) на 30 мин, после чего разделяли на 3 блока (А, В и С) фронтальной секцией через точку Р0 по Сентаготаи и тангенциальной — от борозды, разделяющей полушария большого мозга и мозжечка до границы между стволом и промежуточным мозгом на вентральной его поверхности. После этого дофиксировали материал в том же растворе в течение 24 ч. С фронтальной (А, В) и вентро-фронтальной (С) поверхностей каждого блока делали по 50—60 серийных срезов толщиной 5 мкм. Использовали окраски гематоксилином и эозином и тионином по Нислю для каждого 10-го среза. Общее количество микропрепаратов — 30 на 1 ГМ экспериментального животного. В результате подобного исследования идентифицировали на срезах и подвергали качественной и полуколичественной оценке следующие структуры: заднюю фронтальную, теменную и затылочную области коры больших полушарий ГМ, таламус, гипоталамус, стриопаллидум, мозжечок, средний и продолговатый мозг. Производили микрофотосъемку цифровой камерой Canon (Japan, 5.0 мегапикселей) на базе микроскопа Axiostar plus (Карл Цейс, Германия) с использованием объектива x 40, x 100 и окуляра x 10.

Таблица 1

Распределение животных в экспериментальных группах

№	Характер эксперимента в серии	Сроки, ч	Количество животных
1	Ишемия головного мозга клеммированием сонных артерий с 30-минутной реперфузией без применения каких-либо препаратов	1	4
		3	4
		8	6
		12	5
		17,5	2
2	Цитофлавин – 0,15 мг/кг массы внутривнутрибрюшинно за 30` до клеммирования сонных артерий	8	6
		24	6
3	Актовегин – 30 мг/кг массы внутривнутрибрюшинно за 30` до клеммирования сонных артерий	8	6
		24	6
4	Мексидол – 1,5 мг/кг массы внутривнутрибрюшинно за 30` до клеммирования сонных артерий	8	6
		24	6
5	Эноксифол – 5 мг/кг массы внутривнутрибрюшинно за 30` до клеммирования сонных артерий	8	6
		24	6
6	АКФ-90-7 – 10 мг/кг массы внутривнутрибрюшинно за 30` до клеммирования сонных артерий	8	6
		24	6

Иммуногистохимическое исследование проводили на базе лаборатории морфологии Волгоградского научного центра РАН и администрации Волгоградской области. Использовали моноклональные мышиные антитела к нейрональной нитрооксидсинтазе (NOS-1, клон NS14), эндотелиальной нитрооксидсинтазе (NOS-3, клон NS5) и TRAIL производства

DakoCytomation, Дания. Визуализацию проводили с помощью непрямого иммунопероксидазного метода с высокотемпературной и ферментной демаскировкой антигенов. Экспрессию оценивали по разбиению нейронов на классы в зависимости от степени экспрессии иммунопозитивного материала. Для достоверности полученных результатов применяли позитивные и негативные контроли антигенов, а также негативные контроли антител [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сопоставлении цитотоксических, сосудистых и фибропластических изменений в ткани головного мозга у контрольных животных с ишемией-реперфузией головного мозга было обнаружено, что на протяжении эксперимента в течение 24 ч на ранних сроках ишемии преобладали сосудистые изменения. На микропрепаратах головного мозга крыс, окрашенных гематоксилином и эозином, это выражалось в виде резкого набухания ткани, разволокнения нервных проводников, развитию периваскулярного отека вокруг сосудов микроциркуляторного русла.

В самих сосудах отмечалась неоднородность — часть артериол была спазмирована, часть — паретически расширена. Однако вне зависимости от степени вазоспазма во всех случаях определялось явлениями стаза и сладжа эритроцитов, что может быть свидетельством замедлением интрацеребрального кровотока. Данная картина наиболее ярко была представлена к 7 ч ишемии.

К 24 ч эксперимента к уже указанным признакам застоя крови присоединялись явления внутрисосудистой седиментации плазмы крови и периваскулярные диапедезные кровоизлияния. Этот факт может рассматриваться как свидетельство нарушения сосудистой проницаемости на фоне длительно протекающей ишемии головного мозга с последующей реперфузией.

В противовес сосудистым изменениям явления цитотоксичности наиболее ярко проявляли себя именно на сроках, близких к 24 ч.

Если в сроках 3—7 часов в нейронах определялись дистрофические изменения в виде отека и набухания нейронов, базофилии периариона и явления выраженного перичеллюлярного отека, то ближе к 24 ч во многих отделах коры наблюдались признаки гибели нейронов. К таким признакам в данном случае можно отнести явления потери пирамидным клетками характерной формы, лизиса ядер, снижения тинкториальных характеристик нейронов. Более того, во многих случаях были выражены явления глиальной реакции, скопления глиоцитов вокруг погибших нейронов и фокусы нейрофагии. Причем такая картина была характерна практически для всех отделов

коры большого мозга. В опытной группе с использованием мексидола на фоне ишемии-реперфузии головного мозга было обнаружено, что морфологические изменения мало отличаются от таковых в контрольной группе, однако имеют место различия в сроках наступления сосудистых и цитотоксических реакций. Так, явления застоя крови в сосудах и эритродиapedезной экстравазации наступают позже, чем в контрольной группе. При этом дистрофические изменения нейронов в виде так называемых «гематоксилиновых» шаров можно наблюдать начиная с 7 ч ишемических повреждений. При окраске по Нисслю можно обнаружить, что явления необратимого повреждения нейронов в виде резкого потемнения нейронов и неразличимости ядра и цитоплазмы на фоне диффузной прокрашиваемости красителем цитоплазмы определяются с 9—12 ч эксперимента и наибольшей выраженности достигают к 24 ч.

В опытной группе с терапией актовегином можно обнаружить следующие различия с контрольной группой животных. При анализе сосудисто-тканевых реакций обнаруживается более выраженное набухание интерстиция мозговой ткани у опытных крыс, которое развивается вплоть до деструктивного отека уже к 9 ч. При этом, как и для контрольной группы, остаются актуальными явления полнокровия сосудов, стазирования и сладжирования эритроцитов и седиментации плазмы крови в сосудах. Указанные изменения проявляются примерно на тех же сроках, что и в контроле.

В отдельных случаях в коре большого мозга были обнаружены тяжелые ишемические изменения нейронов в виде колликационного некроза на ранних сроках эксперимента. Данные изменения характеризовались кариолизисом, набуханием, сателлитозом, нейронофагией и, в конечном итоге, образованием так называемых «клеток-теней».

При исследовании микропрепаратов головного мозга крыс с ишемией-реперфузией на фоне предварительной терапии эноксифолом было обнаружено, что на морфологическом уровне тканевые изменения мозга резко отличались от изменений в контрольной группе в сторону меньшей выраженности.

В первую очередь, это касается сосудистых реакций. Для животных данной группы были характерны явления спазмирования сосудов, однако кровенаполнение оставалось низким и застойные явления отсутствовали. Кроме этого отсутствовали признаки диapedезного пропотевания эритроцитов через базальную мембрану капилляров.

Изменения клеточного состава также было менее выраженным, чем в контрольной группе, но и здесь определялись тяжелые нарушения нейрональных клеток в виде коагуляционного некроза на поздних сроках эксперимента.

При окраске по Нисслю эти клетки выглядели резко уменьшенными в размерах, с гомогенной темной цитоплазмой, выраженным перичеселлюлярным

отеком. Такие пикноморфные нейроны в ткани мозга у крыс с эноксифолом определялись практически повсеместно.

При исследовании препаратов головного мозга у крыс на фоне предварительной терапии цитофлавином и экспериментальным препаратом АКФ-90-7 было обнаружено, что на морфологическом уровне исследования эффективность данных лекарственных средств практически равнозначна. Это выражается в интенсивном снижении ряда патологических изменений, присущих ишемизированному мозгу.

Так, у крыс данных опытных групп было отмечено снижение всех форм отечности на протяжении всего эксперимента — периваскулярной, перичеселлюлярной, интерстициальной. Также характерна минимальность сосудистых изменений — в виде спазма или паретического расширения сосудов. Однако у животных обеих групп характерным было высокое кровенаполнение сосудов с признаками сладжирования эритроцитов в части из них. Нейрональные изменения становились видимыми, начиная с 12-го часа эксперимента, причем наиболее характерной формой гибели нейронов был пикноморфный коагуляционный некроз, что подтверждалось окраской по Нисслю. Данные об изменениях экспрессии NOS-1, NOS-3 и лиганда TNF-зависимого апоптоза TRAIL представлены в табл. 2.

Таблица 2

Основные эффекты наиболее употребительных нейропротекторов при экспериментальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс

Эффекты	Ишемия ГМ двусторонним клеммированием сонных артерий с 30-минутной реперфузией					
	Без лечения	Цитофлавин	Актовегин	Мексидол	Эноксифол	АКФ-90-7
Выживаемость животных						
Досуточная гибель животных	в основном гибнут через 8–14 ч	с 12–14 ч	с 12–14 ч	-	-	-
Выживают к 24 ч, %	0	50	62	100	100	100
Результаты морфометрии коры ГМ						
Степень поражения нейронов, %	42,5 ± 7,8	18,3 ± 6,6*	35,4 ± 5,3	21,1 ± 8,9*	19,6 ± 5,4*	17,7 ± 5,6*
Коэффициент глиа/нейрон	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,4	2,0 ± 0,4	1,5 ± 0,2*	2,1 ± 0,4	1,8 ± 0,3
Возрастание экспрессии нитрооксидсинтазы и лиганда апоптоза в ГМ, %						
NOS-1	679	451	650	428	103	126
NOS-3	85	149	4	199	245	-2
TRAIL	96	232	218	275	245	106

* Достоверные различия с показателями без лечения ($P < 0,05$).

Таким образом, на основании проведенного морфологического исследования можно сделать ряд выводов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Наиболее часто встречающиеся изменения в ткани головного мозга у крыс с ишемией-реперфузией последнего относятся к цитотоксическим и сосудистым проявлениям.

2. Наиболее характерные сосудистые изменения проявляются в виде сочетанного увеличения и уменьшения различных сосудов, сопровождающихся явлениями застоя крови и выходом эритроцитов в интрастициальное пространство.

3. К характерным цитолитическим изменениям можно отнести некротические явления в нейронах, протекающие по типу коагуляционного пикноморфного некроза и колликвационного повреждения с формированием «клеток-теней».

По данным морфологического исследования можно сделать вывод о сопоставлении нейропротективной активности используемых препаратов, причем

активность убывает в ряду: АКФ-90-7 > цитофлавин > эноксифол > актовегин > мексидол.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. — М.: Медицина, 2002. — 240 с.
2. Виленский Б. С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение. — СПб.: Институт развития бизнеса; «Сандра», 1999. — 336 с.
3. Джигладзе Д. Н. Патология сонных артерий и проблема ишемического инсульта. — М., 2002. — 207 с.
4. Кадыков А. А. // Фармацевтический вестник. — 1999. — № 29 — С. 145—147.
5. Николлс Дж. Г., Мартин А. Р., Валлас Б. Дж., Фукс П. А. От нейрона к мозгу. — М.: УРСС, 2003. — 672 с.
6. Суслина З. А., Танащян М. М., Умарова Р. М. // Лечение нервных болезней. — 2003. — № 4. — С. 14—18.
7. Hagberg H., Peebles D., Mallard C. // Ment. Retard. ev. Disabil. Res. Rev. — 2002. — Vol. 8, № 1. — P. 30—38.

Контактная информация:

Стрепетов Николай Николаевич — кафедра госпитальной хирургии ВолГМУ, nstrepetov@mail.ru

УДК 617.55-089:616-007.274

ДИАГНОСТИКА БОЛЕВЫХ ФОРМ СПАЕЧНОЙ БОЛЕЗНИ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

И. В. Михин, А. Г. Бебуришвили, А. В. Гушул

Кафедра факультетской хирургии с курсом эндоскопии и эндоскопической хирургии ФУВ ВолГМУ

Болевая форма спаечной болезни без дисфункции внутренних органов у ранее оперированных пациентов возникает вследствие образования сращений в различных областях брюшной полости. Болевой синдром способен вызывать как висцеро-париетальные, так и висцеро-висцеральные спайки. Лапароскопия, включающая визуальную оценку изменений органов брюшной полости, позволяет установить наличие, характер и распространенность спаечного процесса в брюшной полости, исключить наличие других заболеваний брюшной полости, что облегчает установление причины болевого синдрома.

Ключевые слова: спаечная болезнь брюшной полости, спайки, лапароскопия.

DIAGNOSTICS OF ALGESIC FORMS OF ABDOMINAL ADHESIVE DISEASE

I. V. Mikhin, A. G. Beburishvili, A. V. Gushul

The painful form of adhesive illness without dysfunction of an internal at earlier operated patients arises owing to formation of unions in various areas of a belly cavity. A painful syndrome are capable to cause both vistsero-parietalnye, and vistsero-vistseralnye solderings. The laparoscopy including a visual estimation of changes of bodies of a belly cavity, allows to establish presence, character and prevalence of adhesive process in a belly cavity, to exclude presence of other diseases of a belly cavity that facilitates an establishment of the reason of a painful syndrome.

Key words: adhesive abdominal disease, adhesions, laparoscopy.

Спаечная болезнь органов брюшной полости — тяжелое заболевание, нередко встречающееся в молодом и наиболее трудоспособном возрасте. В типичных ситуациях диагностика спаечной болезни не представляет каких-либо трудностей. Однако у 11,6—38 % больных признаки кишечной непроходимости отсутствуют и единственным клиническим проявлени-

ем заболевания являются стойкие боли в животе [2]. Именно у этой группы больных нередко диагностические ошибки, приводящие к неоправданным оперативным вмешательствам. Пациенты со спаечными болями часто длительно, безуспешно лечатся без конкретного диагноза. При этом часто фигурирует диагноз неврастенического синдрома [3]. Ошибочная