



Л.С. Онищенко, О.Н. Гайкова, С.Н. Янишевский

НЕЙРОПРОТЕКТИВНАЯ ТЕРАПИЯ ОСТРОЙ СТАДИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У БЕЛЫХ КРЫС (СВЕТООПТИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Резюме

В статье представлены подробные данные о характере компенсаторно-восстановительных реакций в гипоксически поврежденной ткани различных отделов головного мозга в условиях эксперимента, предложен и обоснован дифференцированный подход к назначению препаратов с ноотропными и нейрометаболическими свойствами при инсульте. Показана гетерогенность гиперхромности нейронов. Она может быть обусловлена как усилением синтеза белка, проявляющимся полирибосомией, гипертрофией эндоплазматической сети и комплекса Гольджи, так и состоянием глубокого торможения функциональной активности клеток. Последнее морфологически проявляется не только гиперхромией цитоплазмы, но и выраженным пикнозом ядер нейронов вследствие недостаточного обеспечения в них пластических процессов некоторыми из применявшихся препаратов.

Ключевые слова

Ишемический инсульт, ноотропное и нейрометаболическое лечение, световая и электронная микроскопия.



L.S.Onischenko, O.N.Gaikova, S.N.Yanishevsky

NEUROPROTECTIVE THERAPY OF ISCHEMIC INSULT ACUTE STUDY AT WHITE RATS (LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDY)

Abstract

In the experiment the character of compensatory-recovered reaction in hypoxic destroyed tissue of different brain departments is detaily studied. The differential approach to appointment of preparates with nootropic and neurometabolic properties at insult is proposed and based. The numerous cell death to apoptosis type is also averted off. Heterogeneity of neuron's hyperchromy is shown and it may be caused as intensification of protein synthesis manifested in polyribosomy, granular endoplasmic reticulum and Goldgy complex hypertrophy and also in the state of functional cell activity deep braking. The last is morphologically manifested besides the hyperchrome neuron's cytoplasm also the nuclear piknose in the case of insufficient security of plastic processes in neurons by some of the used preparates.

Key words

acute ischemic insult, neurometabolic and nootropic therapy, light and electron microscopy.



Большое количество экспериментальных работ и патологоанатомических наблюдений указывают на неоднородный характер повреждений ткани мозга при ишемии. Большая часть нежизнеспособной ткани в мозге формируется в течение 3-6 часов после нарушения кровообращения, а окончательное развитие некротического очага завершается через 48-72 часа [4, 14, 15]. Развитие некроза в зоне ишемической «полутени» можно избежать с помощью реперфузии и применения нейропротективных препаратов [2, 13, 16, 27].

Целью нашего исследования явилось изучение эффективности препаратов нейротрофической группы (альфа-GPC, церебролизин), ноотропов (пирацетам) и смешанного действия (винпоцетин) в метаболической терапии острого нарушения мозгового кровообращения в эксперименте [26].

Для решения поставленных в настоящей работе задач были проведены серии опытов на 18 беспородных половозрелых самцах крыс массой 200-250 гр. Временное нарушение мозгового кровообращения (острую ишемию) в правой гемисфере создавали путем клипирования ствола безымянной артерии, прекращая кровоток в правом каротидном и вертебрально-базилярном бассейнах. Оперативное вмешательство проводили с применением эфирного наркоза. Артерии обнажались срединным доступом – путем рассечения кожи и подлежащих фасций от нижней челюсти до грудины. Справа от срединной линии, над яремной вырезкой на устье безымянной артерии накладывали клипсу на 40 мин., после чего ее устранили и операционную рану ушивали [8]. Препараты вводили внутривентрикулярно после операции, а затем один раз в сутки в дозировках холин-альфосцерат (альфа-GPC) – 45 мг/кг (1-я группа), церебролизин – 65 мг/кг (2-я группа), пирацетам – 60 мг/кг (3-я группа), винпоцетин – 1 мг/кг (4-я группа). Контрольные нелеченные животные (n=3) получали плацебо – изотонический раствор NaCl. Шестая группа животных никаким воздействиям не подвергалась. Эффективность лечебного воздействия оценивали клинически, а затем по окончании эксперимента и морфологически. Время реперфузии составляло 48 часов.

Обезболивание животных перед декапитацией проводили с помощью паров эфира. Для морфологических исследований брали фрагменты ткани мозга из больших полушарий, ствола мозга и мозжечка. Материал для микроскопического исследования фиксировали в 10% формалине и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Нисслю и по Маллори. Помимо качественного анализа состояния нервной ткани, выполняли также и количественную оценку состояния нейронов. У каждого животного на 5 серийных срезах из коры больших полушарий и



коры мозжечка подсчитывали количество гиперхромных нейронов среди 100 клеточных элементов на каждом срезе. Светооптически исследовали также полутонкие аралдитовые срезы, окрашенные по Нисслю толуидиновым синим.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки ткани мозга размером 1-2 мм обрабатывали по стандартным методикам с конечной заливкой в аралдит. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-3, контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и уранилацетатом. Для просмотра и фотографирования ультратонких срезов использовали электронные микроскопы «Hitachi», «JEM-100CX» и «Tesla».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У всех животных в послеоперационном периоде определялись левосторонний гемипарез – гемиплегия и атаксия, сопровождавшиеся гиподинамией, заторможенностью и отказом животных от пищи и воды.

Наиболее ранняя активизация поведения после перенесенного нарушения мозгового кровообращения наблюдалась у леченных животных 1-й группы, у которых уже через 60-80 минут отсутствовали признаки перенесенного нарушения мозгового кровообращения, и они почти сразу обращались к воде и пище. Восстановление моторных и поведенческих реакций у крыс 2-й группы также было достаточно полным, но наступало несколько позже, чем у животных 1-й группы. Очень медленное восстановление отмечалось у животных 3-й и 4-й групп, причем в последней группе полного восстановления моторных функций в течение 48 часов не наблюдалось ни у одного животного, и весь послеоперационный период у них был самым тяжелым. Он характеризовался появлением патологических типов дыхания и долгим выходом из наркоза, а также отказом животных от пищи и воды.

При светооптическом исследовании головного мозга степень поражения клеток была максимальной у нелеченных животных. В мозжечке (по сравнению с корой полушарий большого мозга) отмечались более выраженные изменения клеток и большее число гиперхромных нейронов. У животных всех групп, кроме получавших терапию альфа-GPC, при световой микроскопии наблюдали спазм артериол и венозное полнокровие, причем у крыс 4-й группы, получавших в качестве терапии винпоцетин, обнаруживались даже признаки некроза эндотелия и деструкция стенки капилляров и артерий, сопровождавшиеся паренхиматозными кровоизлияниями (рис.1). У животных 1-й

группы (в сравнении с другими) наблюдалась лучшая сохранность клеток Пуркинье, среди которых лишь единичные нейроны находились в состоянии острого набухания. В то же время у крыс 3-й и 4-й групп наблюдалось разрежение гранулярного слоя мозжечка и деструктивные изменения ядер и цитоплазмы крупных нейронов (рис. 2).

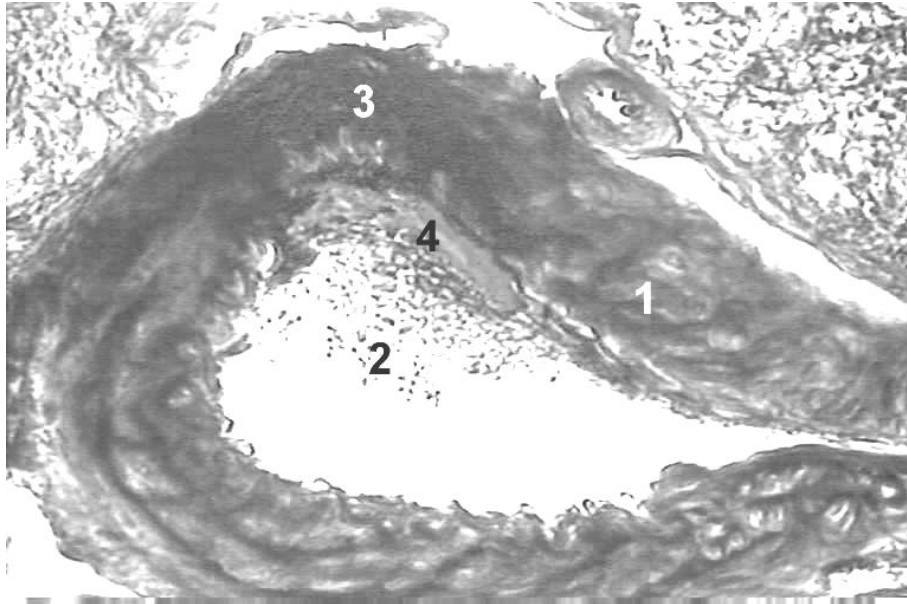


Рис.1. Крупная артерия из головного мозга крысы, после лечения винпоцетином. 1 – утолщенная стенка, внутренняя эластическая мембрана складчатая; 2 – слущенный эндотелий; 3 – сегментарный некроз стенки сосуда с тромботическими массами (4) со стороны эндотелия. Окраска по методу Маллори. X 120.

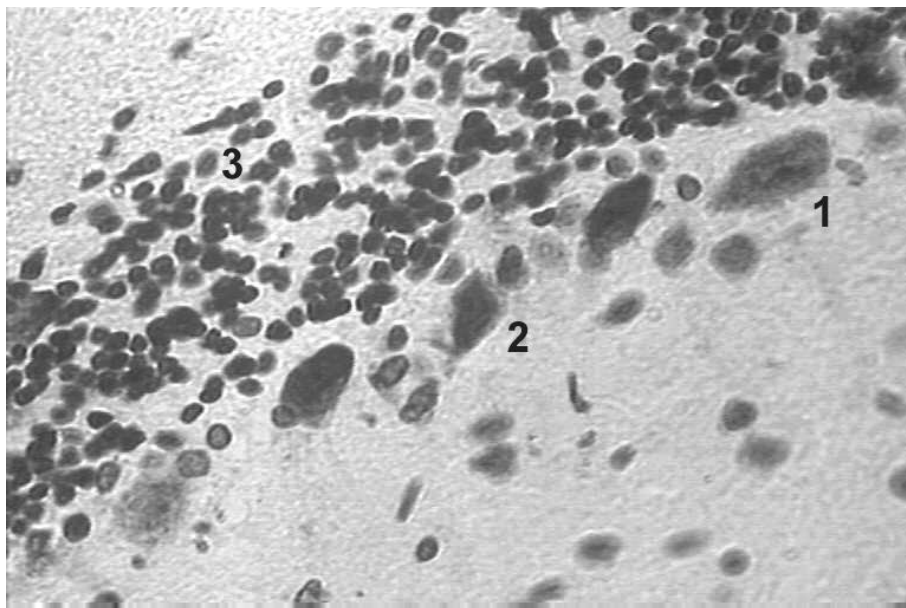


Рис.2. Мозжечок крысы после лечения винпоцетином. Клетки Пуркинье в состоянии острого набухания (1) или сморщивания (2). Зернистый слой (3) разрезан и истончен. Окраска по методу Ниссля. X 400.

При электронно-микроскопическом исследовании головного мозга у животных всех групп определялись нейроны в различном морфофункциональном состоянии. У нелеченных крыс в коре головного мозга часто встречались гиперхромные нейроны, которые, скорее всего, находились в стадии функционального напряжения и гибели. Кроме того, у части клеток отмечалось повышение электронной прозрачности цитоплазмы из-за вакуолизации митохондрий вследствие разрушения крист, резкого расширения канальцев эндоплазматической сети (ЭПС) и комплекса Гольджи. В них также обнаруживались фрагментированные ядра и ядрышкоподобные тельца в цитоплазме. Иногда нарушалась целостность цитолеммы в отдельных участках. В ядрах нейронов гранулярного слоя мозжечка встречались нарушения структуры кариоплазмы в виде изменения ее плотности и перераспределения хроматина, характерных для апоптоза.

Наиболее полное восстановление ткани мозга после ишемии отмечалось у животных 1-й группы. В неокортексе гиперхромные нейроны были немногочисленными и, в основном, они находились в состоянии активного синтеза и внутриклеточной репарации. Ядра этих нейронов нередко были крупными и складчатыми, в цитоплазме содержалось большое количество свободных рибосом и полисом, канальцы ЭПС располагались не только по всей цитоплазме, но и перинуклеарно, нередко в тесной связи с кариолеммой. Митохондрии в большинстве своем были сохранными (рис. 3). Очень часто рядом с такими нейронами обнаруживались активные полноценные олигодендроциты с типичной ультраструктурой ядра и цитоплазмы. По сравнению с 1-й группой у животных других групп гиперхромные нейроны встречались чаще, но в целом их количество не превышало таковое у крыс без лечения. У крыс, получавших терапию церебролизином (2-я группа), так же, как и у животных 1-й группы большинство гиперхромных нейронов находилось, вероятно, в состоянии активного синтеза или запасания белковых веществ, и лишь иногда в состоянии внутриклеточной репарации. У животных 3-й и 4-й групп среди гиперхромных нейронов преобладали клетки с морфологическими признаками как функционального напряжения, так и глубокого торможения. Об этом свидетельствовало частое обнаружение в цитоплазме ламеллярных структур, образовавшихся из митохондрий, а также большее (по сравнению с таковым в

контроле) количество лизосом (рис. 4). У животных 4-й группы чаще других встречались пикноморфные нейроны с почти не определявшимися ядрами и отчетливой дегенерацией белоксинтезирующих органоидов цитоплазмы (гранулярной ЭПС и комплекса Гольджи). Изменение структуры и распределения хроматина в кариоплазме нейронов гранулярного слоя мозжечка, характерные для апоптоза, также наблюдались чаще всего у животных 3-й и 4-й групп.....

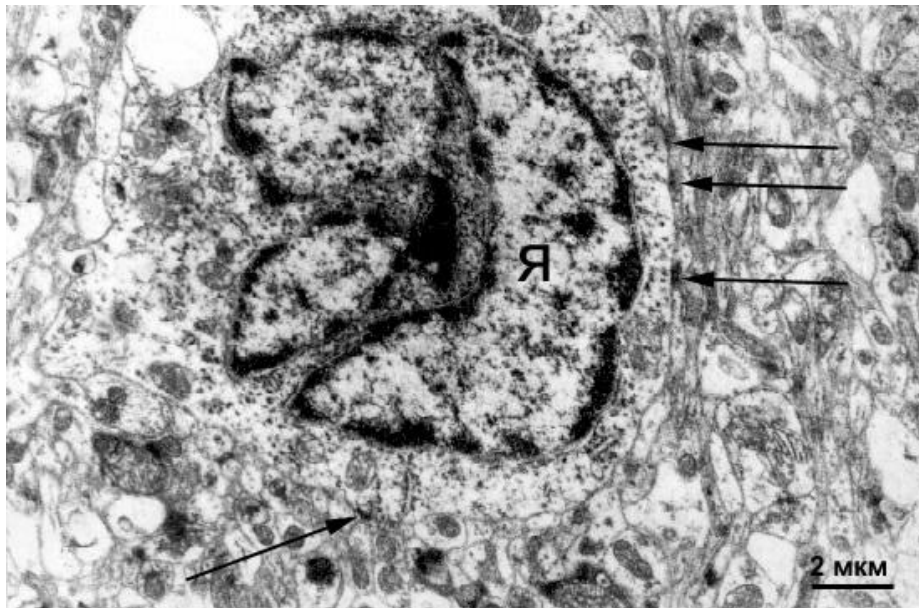


Рис.3. Нейрон из коры головного мозга крысы, получавшей лечение альфа-GPC. Я – складчатое ядро. На цитолемме нейрона – большое количество аксосоматических синапсов (↑). Электронограмма

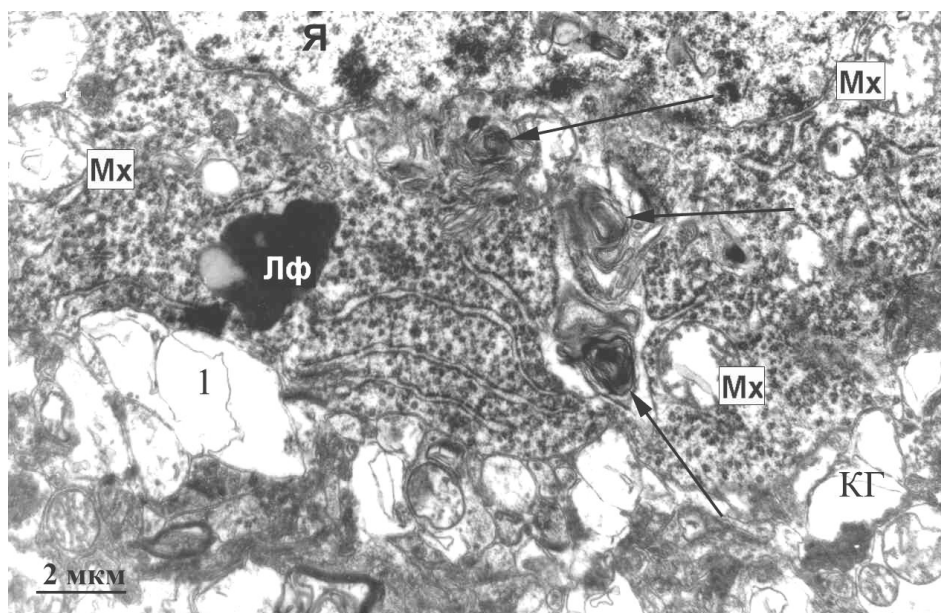


Рис.4. Фрагмент умеренно гиперхромного крупного нейрона из коры головного мозга крысы, получавшей лечение пираретамом. (↑) – фокальное скопление ламеллярных структур – цитосом, образованных из митохондрий и канальцев ЭПС; КГ – расширенные цистерны комплекса Гольджи; Лф – крупное липофусциновое включение; Мх – вакуолизированные митохондрии; 1 – отечные отростки астроцитов. Электронограмма.

Таким образом, в результате проведенного исследования удалось установить, что использование для нейромедиаторной терапии ишемических поражений ЦНС альфа-GPC или церебролизина, влияющих на процессы синтеза фосфолипидов, входящих в состав клеточных мембран, а также фосфолипидов, имеющих медиаторную активность, увеличивает толерантность нейронов к ишемическому повреждению. Применение этих препаратов позволяло сохранить структуру мембран главных органоидов цитоплазмы нейронов (ядра, митохондрий, ЭПС, комплекса Гольджи), а также предотвращало изменения структуры ядра, характерные для апоптоза. Полученные результаты дают возможность предполагать, что в коре больших полушарий и в мозжечке эти препараты проявляют свое столь отчетливое действие вследствие их высокой тропности к холинергическим структурам в этих отделах головного мозга. Заместительные свойства альфа-GPC и церебролизина позволяют снизить энергоемкость нейромедиаторной функции нейронов в период ишемического и реперфузионного повреждения, а также замедляют выполнение программы клеточной гибели. Кроме того, в этих группах животных нами обнаружено восстановление ткани мозга, о чем свидетельствовало появление нейронов в состоянии внутриклеточной репарации, пролиферация олигодендроцитов, ремиелинизация, восстановление осевых цилиндров в миелиновых и безмиелиновых волокнах и структуры синаптокомплексов, а также улучшение состояния гематоэнцефалического барьера. И, напротив, морфологические признаки функционального напряжения нейронов головного мозга, наличие различных стадий апоптоза нейроглиоцитов, феномен неполного расхождения клеток в ходе их пролиферации, патология миелина и безмиелиновых волокон, а также нарушения в структуре синапсов у животных, получавших пираретам и винпоцетин – все это указывает на недостаточное обеспечение энергоемких процессов репарации этими препаратами в острейшей стадии ишемического инсульта.



Литература

1. Боголепов Н.Н. Ультраструктура синапсов в норме и патологии. М.: Медицина, 1975. – 94 с.
2. Виленский Б.С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение. СПб., 1999.– 336 с.
3. Ганнушкина И.В., Шафранова В.П., Рясина Т.В. Функциональная ангиоархитектоника головного мозга. М.: Медицина, 1977. – С.22-23.
4. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Современные представления о лечении острого церебрального инсульта. *Consilium medicum*, 2000. – Т.2.– С.60-65.
5. Заболотский Н.Н., Онищенко Л.С., Галеев И.Ш. Митохондриальные мегакония и плейокония в мозге крыс как возможные адаптационные реакции при летальных радиационных и радиомодифицированных повреждениях. *Морфология*, 1999, – Т.115, №3, с.27-31.
6. Искра Д.А. Электрическая и магнитная стимуляция в диагностике и лечении миелопатий.: Автореф. дис.... канд. мед. наук. СПб., 1993.
7. Корнеева Т.Е., Даринский Ю.А. “Темный” нейрон как результат функциональной активности. *Цитология*, 1973,- Т.15, №8. – С.1051-1055.
8. Одинак М.М., Вознюк И.А. Новое в терапии при острой и хронической патологии нервной системы (нейрометаболическая терапия при патологии нервной системы). СПб., ВМедА, 2001. – 63 с.
9. Одинак М.М., Михайленко А.А., Иванов Ю.С., Семин Г.Ф. Сосудистые заболевания головного мозга. СПб., Гиппократ, 1997. – 157с.
10. Онищенко Л.С. Исследование функциональной морфологии преоптического ядра лягушки (*Rana temporaria* L.) в связи с его физиологической регенерацией.: Автореф. дис.... канд. биол. наук. Л.,1984. – 23с.
11. Янишевский С.Н. Сравнительная оценка различных видов нейрометаболической терапии в острой стадии ишемического инсульта.: Автореф. дис... канд. мед. наук. СПб., ВМедА., 2002. – 22с.
12. Bolander H.G., Persson L., Hillered L., Dargy R., Ponten U., Olsson Y. Regional cerebral blood flow and histopathologic changes after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 1989. – V.20. – P.930-937.
13. Fisher M., Jones S., Sacco R.L. Prophylactic neuroprotection for cerebral ischemia. *Stroke*, 1994. – V.25. – P.1075-1080.



14. Ginsberg M.D., Pulsinelli W.A. The ischemic penumbra, injury thresholds and therapeutic window of acute stroke. *Ann. Neurol.*, 1994. – V.36. – P.553-554.
15. Heiss W.D., Graf R. The ischaemic penumbra. *Curr. Opin. Neurol.*, 1994. – V.7 (1). – P.9-11.
16. Jenkins L.W., Povlishock J.T., Lewelt W. et al. The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.*, 1981. – V.5. – P.205–220.
17. Kumar K., Goosmann M., Krause G.S., et al. Ultrastructural and ionic changes in global ischemic dog brain. *Acta Neuropathol. (Berlin)*, 1987. – V.73. – P.393–399.
18. Levine J.M, Reynolds R., Fawcett J.W. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends in Neurosciences*, 2001.– V.24, N1, – P.39-47.
19. MacCarthy K.D., Salm A. Astroglial receptors and their regulation of intermedia filament protein phosphorylation. In: *Glial and Cell Receptors*. H.Kimelberg, ed. New York. Raven Press, 1988. – P.1-23.
20. Memezawa H., Minamisawa H., Smith M.L., Siesjo B.K. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Exp. Brain Res.*, 1992. – V.89. – P.67-78.
21. Nagayama M., Zhang F., Iadecola C. Delayed treatment with aminoguanidine decreases focal cerebral ischemic damage and enhances neurologic recovery in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1998. – V.18. – P.1107-1113
22. Petty M., Wettstein J. White matter ischemia. *Brain Res.Rev.*, 1999. – V.31. N1. – P.58-64.
23. Rosenbluth J. Glial membranes and axoglia junction. In: *Neuroglia*. New York, 1995. – P.613-630.



Полный текст статьи:

Онищенко Л.С., Гайкова О.Н., Янишевский С.Н. Нейропротективная терапия острой стадии ишемического инсульта у белых крыс (светооптическое и электронномикроскопическое исследование) // Морфология. – 2006. – №6. – С. 40-46.