

ВЛИЯНИЕ ЦЕРЕБРОЛИЗИНА НА СТРУКТУРНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Мамытова Э.М.

Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева,
кафедра неврологии с курсом медицинской генетики,
Бишкек, Кыргызская Республика.

Резюме: Проведено экспериментальное исследование, целью которого являлось изучение влияния Церебролизина на структурные изменения мозга в раннем посттравматическом периоде. Опыты проводились на крысах на модели легкой ЧМТ. Показано, что ЧМТ вызывала у крыс комплекс макро- и микроскопических патоморфологических нарушений, анализ которых свидетельствует об определенной стадийности в развитии патологических изменений. Церебролизин способствовал улучшению головного мозга крыс в раннем посттравматическом периоде, что отмечалось нами на 7-е сутки с момента воспроизведения ЧМТ. В контрольной группе крыс, у которых использовался физиологический раствор после нанесения травматического повреждения мозга, нормализующее действие не было выражено. Результаты данного экспериментального исследования являются экспериментальным обоснованием целесообразности применения Церебролизина при травматическом повреждении мозга.

Ключевые слова: Церебролизин, черепно-мозговая травма, патогистологические нарушения, структуры мозга.

ЭКСПЕРИМЕНТТЕГИ СООК - МЭЭ ТРАВМАСЫНДА БОЛГОН НЕЙРОНДОРДУН ТУЗУЛУШУНУН ОЗГОРУУЛОРУНО ЦЕРЕБРОЛИЗИНДИНДИН ТААСИРИ

Мамытова Э.М.

И.К.Ахунбаев атындагы Кыргыз мамлекеттик медициналык академиясы,
неврология жана медициналык генетика кафедрасы,
Бишкек, Кыргыз Республикасы

Корутунду: Церебролизиндин мээнин түзүлүштөрүнүн травмадан кийинки алгачкы мезгилдеги патологиялык-гистологиялык өзгөрүүлөрүнө берген таасирин изилдөө максатында тажрыйбалык изилдөөлөр жүргүзүлдү. Тажрыйбалык изилдөөлөр баш-сөөк-мээ травмаларынын эсенил денгээлдеги моделинде келемиштерге жүргүзүлдү. Изилдөөлөр көрсөткөндөй, баш-сөөк-мээ травмасы келемиштердин мээсинде макро- жана микроскопиялык патоморфологиялык жабыркоолорго алып келген, аларды тастыктоодон, бул патологиялык кубулуштар биринен кийин бири өрчүгөндүгү малым болду. Церебролизин келемиштердин мээсинин калыптануусуна баш-сөөк-мээ травмасынын алгачкы мезгилинде - 7-күнүндө алып келгендиги айкын болду. Травма жасалгандан кийин физиологиялык эритме колдонулган, контролдук топтогу келемиштердин мээсинин кайра калыбына келүүсү байкалган эмес. Бул тажрыйбалык изилдөөлөрдүн натыйжасы церебролизинди мээнин травмадан жабыркоосунда максаттуу түрдө колдонуунун тажрыйбалык негизи болуп саналат.

Негизги сөздөр: Церебролизин, баш-сөөк-мээ травмасы, патологиялык-гистологиялык өзгөрүүлөр, мээнин түзүлүштөрү.

CEREBROLYSIN INFLUENCE THE NEURONS STRUCTURAL DAMAGE AFTER EXPERIMENTAL TRAUMATIC HEAD INJURY

Mamytova E.M.

Kyrgyz State Medical Academy named after I.K. Ahunbaeva,
Neurology and Medical Genetics Department,
Bishkek, Kyrgyz Republic

Resume: Authors described results of experimental research. The aim of this work was to study Cerebrolysin's influence on brain structure pathological changes in the earliest posttraumatic period. The experiment was based on moderate brain injury experimental model using rodent animals. The trauma caused at animals complex of macro- and microscopic pathomorphological changes. Their analysis demonstrated definite stages in these pathological changes development. Cerebrolysin lead to regression of pathomorphological changes in the early posttraumatic period (at 14th day after trauma). In the control group of animals was used physiological solution. Its curable effect on the cortex neurons was not verified. Results of this experiment are reason for the effectiveness of Cerebrolysin using in the therapy of patients with traumatic brain injury.

Key words: Cerebrolysin, traumatic brain injury, pathohistological changes, brain

Введение.

В современной концепции травматической болезни головного мозга принципиально важным моментом считается выделение первичного и вторичного повреждения.

Располагающаяся вокруг очага первичного травматического повреждения зона ишемической полутени (пенумбра) содержит частично поврежденные, но жизнеспособные элементы нервной ткани, с частично сохраненным энергетическим и нейротрансмиссивным метаболизмом и морфологически сохраненными путями гемодинамики (1,2). Именно на поддержание функционирования клеточных элементов перифокальной зоны мозга и предотвращение дальнейшего ее разрушения направлены основные терапевтические стратегии, применяемые в острый период ЧМТ (3,4,5).

Многие патофизиологические механизмы вторичного повреждения мозга рассматриваются большинством авторов как потенциально обратимые, а их выявление и устранение считаются основной мишенью фармакологического действия препаратов, применяемых для лечения пациентов с черепно-мозговой травмой (6,7,8,9). Терапия травматического повреждения мозга должна быть максимально ранней, активной и должна рассматриваться как комплексная церебропротекторная стратегия (10). Препараты, применяемые для устранения вторичного повреждения, должны обладать разнонаправленным действием, предупреждая, блокируя и исправляя как можно большее количество патологических цепей, приводящих к необратимым изменениям в тканях.

Одним из перспективных способов нейропротекции при ЧМТ может быть нейропротекторная терапия Церебролизин — метод, позволяющий индуцировать в клетках поврежденного мозга синтез тех или иных белков с потенциальным терапевтическим эффектом.

Возможность повлиять на баланс внутриклеточных процессов, которые, с одной стороны, реализуют эффекты первичной травмы и последующего вторичного повреждения мозга, с другой стороны, обеспечивают регенеративно-репаративные процессы в ЦНС, в настоящее

время предоставляется возможным при проведении нейропротекторной терапии.

С учетом важности морфологических изменений в определении характера и выраженности посттравматических проявлений целью настоящей работы явилось исследование эффективности препарата Церебролизин на патоморфологические изменения структур мозга в раннем посттравматическом периоде.

Материалы и методы исследования.

Моделирование ЧМТ. Исследование проводилось в условиях хронического эксперимента на 24 половозрелых белых крысах массой от 180 до 220 г, которых содержали в индивидуальных боксах с естественной 12-часовой сменой света и темноты, влажностью воздуха 60 % и его температурой 22 ± 1 °С, со свободным доступом к воде и пище. С целью приручения крыс перед началом эксперимента держали в руках по 2–3 мин в течение 5 дней, что облегчало последующие экспериментальные исследования с животными. Работу с лабораторными животными проводили с соблюдением основных нормативных и этических требований к проведению лабораторных и иных опытов с участием экспериментальных животных разных видов. Данная работа была одобрена комиссией по этическому проведению экспериментальных исследований. Для моделирования ЧМТ применяли пружинный ударник, который экспериментальным путем (по последствиям) откалиброван для нанесения крысам легкой ЧМТ. В момент нанесения травмы животное кратковременно прижимали к поролоновой прокладке, чем добивались горизонтального расположения поверхности свода черепа. Животным с помощью ударника наносили легкую ЧМТ в теменно-затылочной области правого полушария головного мозга. После нанесения удара крысы, как правило, впадали в легкое бессознательное состояние сознания в течение промежутка времени до 30 секунд или вообще сознание не нарушалось. В течение нескольких минут крысы оставались заторможенными, дезориентированными, вялыми. Затем в течение первых часов их состояние улучшалось.

Экспериментальные наблюдения

проводили на следующих группах животных. Животных контрольной группы ($n = 12$) фиксировали, наносили травму. Этим животным в течение 10 дней один раз в день утром внутрибрюшинно (в/б) вводили 0,1 мл 0,9% физиологического раствора. Животным основной группы ($n = 12$) с ЧМТ в течение тех же 10 дней в/б вводили Церебролизин в дозе 0,1 мл (21,5 мг/кг) (EverNeuroPharma, Австрия) также как и животным контрольной группы 1 раз в день утром. Церебролизин вводился через 30 минут после нанесения травмы.

Декапитацию крыс с последующим патоморфологическим изучением ткани мозга проводили на 7 сутки момента нанесения ЧМТ (по 12 крыс из каждой группы в отмеченные временные интервалы). Забой животных осуществляли внутрибрюшинным введением тиопентала натрия (100 мг/кг).

Гистологическое исследование.

После декапитации быстро вскрывали череп, удаляли головной мозг, который промывали в физиологическом растворе и помещали в 5-10 % нейтральный забуференный раствор формалина при pH 7,2-7,4. Приготовленные при помощи микротомы фронтальные срезы головного мозга площадью 0,5-1 см², взятые на уровне брегмы, сначала подвергали действию спиртов с возрастающей концентрацией (70°, 80°, 90°, 96°, 100°), после чего их заливали в парафин в соответствии с требованиями по стандартной

методики для световой микроскопии. Из приготовленных блоков готовили в дальнейшем срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Наличие качественных морфологических изменений в тканях головного мозга оценивали при помощи светового микроскопа МБИ-15. При этом в коре головного мозга оценивали изменения нейронов четырех основных структурно-функциональных типов.

Результаты и их обсуждение

Оценка влияния нейропротекторной терапии на патоморфологические изменения в головном мозге при экспериментальной ЧМТ у крыс.

В ранние сроки после экспериментальной ЧМТ (первые 7 суток) в обеих исследуемых группах морфологические изменения в нейронах идентичны. При этом преобладали гиперхромные нейроны, но состояние ядер и ядрышек в них различно (хорошо сохранившиеся ядра с четко выраженной ядерной мембраной и четко контурированным ядрышком, уменьшение размеров ядра и едва различимое ядрышко). Умеренно гиперхромные клетки рассматриваются как клетки, активность которых начинает усиливаться, а гиперхромофилия характеризует состояние первичного активного торможения или временное прекращение активности нейронов.

В контрольной группе наблюдалось

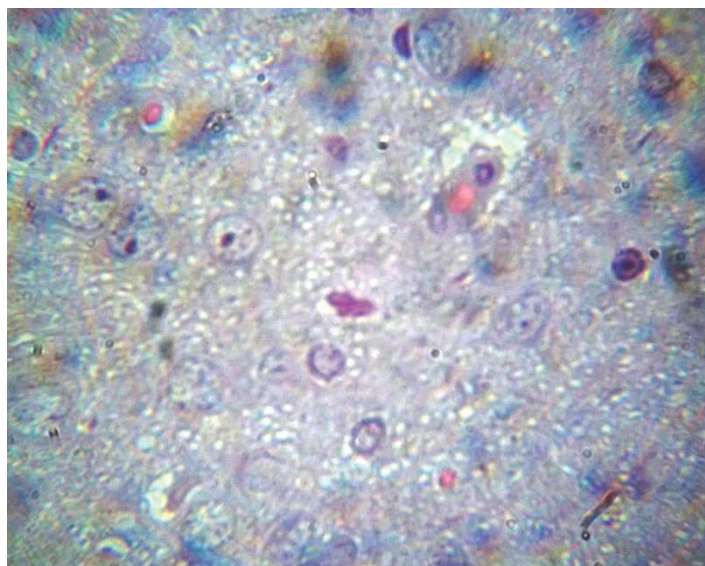


Рис 1. Кора головного мозга крысы. ЧМТ легкой степени на 7 сутки без лечения. В нейронах имеются явления гидропической дистрофии. Отмечаются сморщивание ядер с конденсацией хроматина. Ядра олигодендроцитов и астроцитов с конденсацией хроматина. Полутолстые срезы, окраска гематоксилином и эозином. X 1500.

нарастание деструктивных процессов в нейронах. Усиливается гипохромия, вакуолизация цитоплазмы, деформация клеточной мембраны, перичеселлюлярный отек, появляются клетки «тени», нейронофагия (рис. 1).

В раннем посттравматическом

усиления функции сохранившихся клеток при гибели других и явиться источником регенерации нервных проводников при активной реакции со стороны глии (рис. 2).

Процесс раннего восстановления активно протекал по-разному, хотя наблюдался как в

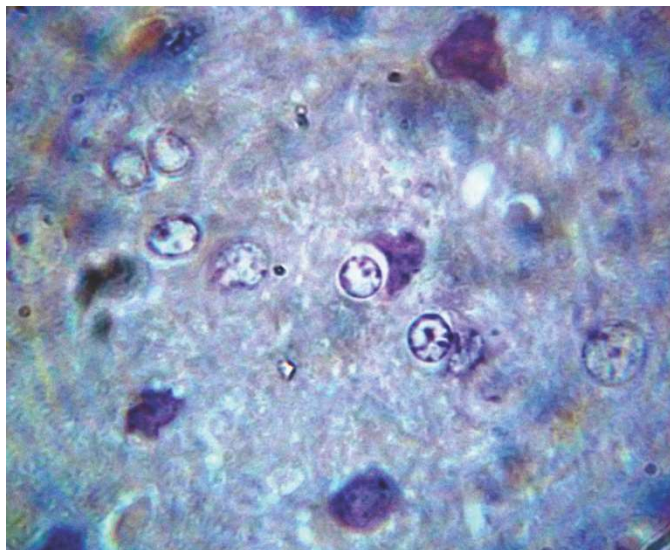


Рис 2. Кора головного мозга крысы. ЧМТ легкой степени на 7 сутки после лечения Церебролизином. В нейронах отсутствуют явления гидропической дистрофии. Ядра олигодендроцитов и астроцитов хорошо выражены. Полутонкие срезы, окраска гематоксилином и эозином. X 1500.

периоде в перифокальной зоне отмечены единичные гипертрофированные нейроны, что свидетельствует о проявлении репаративных изменений в клетках. В ходе патологического процесса функциональные изменения нервных клеток перерастают с одной стороны в дистрофические, атрофические и некробиотические, а с другой — в репаративные.

У животных группы Церебролизина преобладали обратимые изменения нейронов: набухание, перичеселлюлярный отек, центральный хроматолиз, эктопия ядра. Отмечены также необратимые изменения нейронов (клетки - «тени»). На 7 сутки после применения Церебролизина нарастают репаративные изменения нейронов с тенденцией к нормализации их структуры. Проявлением компенсаторного характера изменений является гипертрофия отдельных нейронов. При этом характерно укрупнение глыбок базофильного вещества цитоплазмы, крупное, светлое ядро, окруженное утолщенной ядерной мембраной, гипертрофированное ядрышко с эмиссией ядрышковых глыбок. Умеренная гипертрофия нейронов может быть материальным субстратом

контрольной, так и в опытной группах. Это связано с тяжестью наносимой травмы.

Основными видами клеток, подвергающихся апоптозу, были глиоциты, однако среди нейронов апоптотная гибель также регистрировалась. Преимущественную подверженность апоптозу глиальных клеток можно объяснить тем, что глиоциты, основной функцией которых является трофическая, испытывают дополнительную нагрузку на утилизацию трансплантата при его применении, поэтому они расходуются в большей степени, тем самым способствуя сохранности нейронов. Выявилась тенденция снижения интенсивности апоптоза нейронов в группе с Церебролизином. Наши данные о тенденции развития процесса апоптоза при повреждении головного мозга согласуются с данными других авторов (8, 9).

Патологические изменения, возникающие при черепно-мозговой травме (ЧМТ), представляют собой «не отдельные события, а процессы, запущенные в движение механическим воздействием на центральную нервную систему. Эти процессы не завершаются в сколько-нибудь обозримые сроки после

травмы» (11), представляя непредсказуемо длительный период. Обусловленное ЧМТ первичное повреждение ткани мозга различной тяжести, индуцирующее в основном эффекты «возбуждающих» аминокислот и ионов Ca^{2+} , происходит в течение относительно непродолжительного времени, что существенно ограничивает возможности фармакологической коррекции посттравматических реакций мозга. При этом считают, что первичное повреждение мозга сменяется процессом, получившим название «отсроченной клеточной смерти». Этот процесс может длиться в течение продолжительного времени (дни, недели, месяцы) после травмы и охватывает как зону травматической «пенумбры» (перифокальной зоны «полутени», клетки которой в течение определенного времени сохраняют относительную жизнеспособность на низком метаболическом уровне и могут в последующем как погибнуть, так и выжить), так и регионы мозга, расположенные на отдалении от очагов первичного повреждения.

При этом количество нервных клеток, погибающих вследствие вторичного повреждения, может значительно превышать этот показатель в зоне первичной травмы. Вклад «отсроченной клеточной смерти» в формирование неврологического дефицита является весьма существенным. Вместе с тем, продолжительность периода вторичной гибели нервных клеток определяет существование так называемого «терапевтического окна», что позволяет проводить лечебные мероприятия, способствующие обеспечению нейропротекции [1, 9, 10, 12, 13, 14, 15).

Уменьшенное содержание пикнотически измененных нейронов в группе «ЧМТ+Церебролизин» по сравнению с группой «ЧМТ» в течение периода исследования, а также качественные признаки уменьшения перивазального отека, свидетельствуют о выраженном цитопротективном действии Церебролизина.

В настоящем исследовании, структурные изменения нейронов при ЛЧМТ проявлялись не только в пределах участка травматического повреждения, но распространялись

на контралатеральное полушарие. Зарегистрированное в настоящей работе синхронное или почти синхронное течение процесса в обоих полушариях свидетельствует о том, что в патологический процесс вовлекается весь мозг в целом за счет включения согласующих и пока не очень хорошо известных механизмов.

Выводы.

1. Применений Церебролизина в раннем посттравматическом периоде обеспечивает протекторное действие на паренхиму головного мозга, тормозя развитие его вторичных повреждений при экспериментальной ЧМТ у крыс. Об этом свидетельствует умеренная гипертрофия нейронов, что является материальным субстратом усиления функции сохранившихся клеток при гибели других и является источником регенерации нервных проводников при активной реакции со стороны глии.

2. Основными видами клеток, подвергающихся апоптозу, были глиоциты, однако среди нейронов апоптозная гибель также регистрировалась. Была отмечена тенденция снижения интенсивности апоптоза нейронов в группе с Церебролизинном.

3. Наши данные о тенденции развития процесса апоптоза при повреждении головного мозга согласуются с данными других авторов.

Литература

1. Баснакьян А.Г., Басков А.В., Соколов Н.Н., Борщенко И.А. Апоптоз при травматическом повреждении спинного мозга: перспективы фармакологической коррекции // Вопросы мед. химии. -2000 Т.46, № 5 - С. 431 - 443.

2. Белошицкий В.В. Основные направления применения генной терапии при черепно-мозговой травме // Вісн. Укр. товариства генетиків і селекціонерів. — 2005. — Т.3, №1–2. — С.15–20.

3. Борщенко И.А. Динамика апоптоза при травме спинного мозга. Экспериментальное и клиническое исследование: // Автореф. дис. . канд. мед. наук Москва, 2000 - 28 с.

4. Борщенко И.А., Басков А.В., Коршунов А.Г., Сатанова Ф.С. Некоторые аспекты патофизиологии травматического повреждения и

регенерации спинного мозга (обзор литературы) // *Вопр. нейрохир.*-2000.-№2.-С.28-31.

5. Борщенко И.А., Коршунов А.Г., Сатанова Ф.С., Басков А.В. Вторичное повреждение спинного мозга: апоптоз при экспериментальной травме // *Нейрохирургия.* 2002,- № 4.-С.23 - 27.

6. Викторов И.В. Современное состояние исследований регенерации центральной нервной системы *in vivo* и *in vitro*. Возбудимые клетки в культуре ткани. Пушино, 1984. - С. 4-18.

7. Гретен А.Г. Проблемные аспекты механизмов восстановительных процессов в мозге. Механизмы и коррекция восстановительных процессов мозга. Горький, 1982. - С. 5-11.

8. Суфианова Г.З. Воздействие феракрила на нервную ткань в норме и при повреждении головного мозга у крыс // *Нейрохирургия.* -2003. -№ 1. С.45 - 48.

9. Clark R.S., Chen J., Watkins S.C. et al. Apoptosis-suppressor gene *bcl-2* expression after traumatic brain injury in rats // *J. Neurosci.* — 1997. — V.17, N23. — P.9172–9182.

10. Conti A.C., Raghupathi R., Trojanowski J.Q., McIntosh T.K. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute

and delayed post-traumatic period // *J. Neurosci.* — 1998. — V.18, N15. — P.5663–5672.

11. Doll H. Pharyngeal selective brain cooling improves neurofunctional and neurocognitive outcome after fluid percussion brain injury in rats // *J. Neurotrauma.* — 2009. — V.26. — P.235–242.

12. Jenkins L.W., Lu Y.-C., Johnston W.E. et al. Combined therapy affects outcomes differentially after mild traumatic brain injury and secondary forebrain ischemia in rats // *Brain Res.* — 1999. — V.817. — P.132–144.

13. Jia F. Effect of post-traumatic mild hypothermia on hippocampal cell death after traumatic brain injury in rats // *J. Neurotrauma.* — 2009. — V.26. — P.243–252.

14. Kaya S.S., Mahmood A., Li Y. et al. Apoptosis and expression of p53 response proteins and cyclin D1 after cortical impact in rat brain // *Brain Res.* — 1999. — V.818, N1. — P.23–33.

15. Kim B.-T., Rao V.L.R., Sailor K.A. et al. Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on hippocampal neurons after TBI // *J. Neurosurg.* — 2001. — V.95, N4. — P.674–679