

Мамытова Э.М., Кадыралиев Т.К., Сулайманов М.Ж., Раимбеков Ж.К., Жолдошев Э.К.

**НОРМАЛИЗАЦИЯ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ
НАРУШЕНИЙ СТРУКТУР МОЗГА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ
НА ФОНЕ ЦЕРЕБРОЛИЗИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА**

E.M. Mamytova, T.K. Kadyraliev, M.Zh. Sulaimanov, Zh.K. Raimbekov, E.K. Zholdoshev

**NORMALIZATION OF MORFOFUNCTIONAL CHANGES
OF THE BRAIN TISSUE AFTER TREATMENT WITH CEREBROLYSIN
IN CONDITION OF EXPERIMENTAL TRAUMA**

Авторы описывают результаты экспериментальных исследований, целью которых является изучение влияния церебролизина на патоморфологические изменения структур мозга в раннем посттравматическом периоде. Опыты проводились на крысах, на модели средне-тяжелой 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 регрессированию патоморфологических нарушений головного мозга крыс в раннем посттравматическом периоде, что отмечалось нами на 21-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, патоморфологические нарушения структуры мозга.*

Authors described results of experimental research. The aim of this work was to study Cerebrolysin's influence on brain structure pathomorphological 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 21th 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, pathomorphological changes, brain structures.*

Введение

Травматическое повреждение головного мозга является в настоящее время одним из наиболее распространенных видов травматической патологии. Ежегодные показатели составляют 3-4 случая возникновения черепно-мозговой травмы (ЧМТ) на 1000 населения в год [5, 6, 9]. Однако наиболее важны в социальном и экономическом

отношении последствия ЧМТ, поскольку они могут приобретать хронический характер, ухудшая качество жизни пациента, снижая его трудоспособность и нередко приводя к стойкой инвалидизации. В 2000 г. около 70 тыс. взрослых (4,7 на 10 тыс.) и 17,6 тыс. детей (6,2 на 10 тыс.) были признаны инвалидами вследствие травм всех локализаций [2, 11]. В случае верно поставленного диагноза и своевременно начатого патогенетически обусловленного лечения негативные последствия травматического повреждения черепа и головного мозга разной степени выраженности удастся смягчить [9, 16, 17].

Показано, что после ЧМТ в мозге инициируется сложный процесс, который сопровождается выраженными сосудистыми и морфологическими нарушениями [1, 2]. По данным ряда авторов, вследствие травматического повреждения мозга запускаются каскадные необратимые морфофункциональные дистрофические и некротические процессы, которые во многом определяют выраженность моторных и когнитивных нарушений в посттравматическом периоде [5]. Считается, что именно морфологические изменения паренхимы мозга вследствие механического воздействия на его ткань во многом определяют характер и выраженность последствий ЧМТ [3, 6, 8, 15].

В настоящий момент травматическое повреждение мозга, в том числе и ЧМТ, лечат при помощи различных терапевтических схем [2, 5, 8]. Эффективность некоторых из них была определена в условиях эксперимента [16, 17]. Показано, что лечение при ЧМТ важно начинать в острый период [4, 9]. Одно из ведущих мест в лечении занимает медикаментозная терапия, направленная на предотвращение гипоксии мозга, улучшение обменных процессов, восстановление активной умственной деятельности, нормализацию эмоциональных и вегетативных расстройств [2, 9]. Однако не всегда предложенные способы лечения оказываются эффективными, что заставляет специалистов разрабатывать и тестировать в экспериментальных условиях и в клинике новые схемы лечения травматического повреждения мозга и реабилитационной терапии. С учетом важности морфологических изменений в

определении характера и выраженности посттравматических проявлений целью настоящей работы явилось исследование эффективности препарата нейропротекторного и нейротрофического действия церебролизина на патоморфологические изменения структур мозга в раннем посттравматическом периоде.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились 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 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 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 средне-тяжелой ЧМТ. В момент нанесения травмы животное кратковременно прижимали к поролоновой прокладке, чем добивались горизонтального расположения поверхности свода черепа. Животным с помощью ударника наносили средне-тяжелую ЧМТ в теменно-затылочной области правого полушария головного мозга. После нанесения удара крысы, как правило, падали на бок с выпрямленными конечностями, причём у них отмечались тонико-клонические судороги продолжительностью 20-30 сек., наблюдалось бессознательное состояние, т.е. отсутствие признаков сознания в течение промежутка времени от 30 секунд до 3 минут. Затем крысы поднимались, имел место в половине случаев левосторонний гемипарез. В течение нескольких минут крысы оставались заторможенными, дезориентированными, вялыми. Затем в течение 1-3 суток их состояние улучшалось.

Экспериментальные наблюдения проводили на следующих группах животных. Животных контрольной группы ($n = 12$) фиксировали, но травму не наносили. Этим животным в течение 10 дней один раз в день утром внутривентриально (в/в) вводили 0,1 мл 0,9-процентного физиологического раствора. Животным основной группы ($n = 12$) с ЧМТ в течение тех же 10 дней в/в вводили церебролизин в дозе 0,1 мл (Ever Neuro Pharma,

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 1-е и 21-е сутки с момента нанесения ЧМТ (по 12 крыс из каждой группы в отмеченные временные интервалы). Забой животных осуществляли внутривентриальным введением тиопентала натрия (100 мг/кг).

После декапитации быстро вскрывали череп, удаляли головной мозг, который промывали в физиологическом растворе и помещали в 5-10-процентный 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 методике 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 с использованием морфометрической сетки Автандилова оценивали количество нейронов четырех основных структурно-функциональных типов.

Для электронно-микроскопического исследования в течение 5 мин. после выведения животных из эксперимента забирали кусочки ткани головного мозга из поврежденного и контралатерального полушария. Кусочки ткани фиксировали в 2,5-процентном растворе глутаральдегида с последующей дофиксацией в 1-процентном растворе осмиевой кислоты на фосфатном буфере при pH 7,4. Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Из эпоксидных блоков изготавливали ультратонкие срезы с помощью ультрамикротомов ЛКБ (Швеция). Для повышения контрастности ультратонкие срезы контрастировали раствором уранилацетата и цитрата свинца и просматривали в электронном микроскопе РЕМ-400 (Япония). Для прицельного ультрамикротомирования и углубленной оценки изучаемых процессов в ткани мозга из эпоксидных блоков изготавливали полутонкие срезы толщиной до 1 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином и толуидиновым синим и просматривали в светооптическом микроскопе фирмы "Оптон" (Германия). Идентификацию наблюдаемых в ткани мозга

процессов проводили путем морфометрической обработки полутонких срезов (гистологическое исследование) и электронограмм. Подсчитывали абсолютное количество или процентное отношение в 100 клетках интактных, патологически измененных нейронов и глиальных клеток, наблюдаемых в 10 полях зрения микроскопа.

Результаты и их обсуждение

У животных контрольной группы через 1 сутки во всех изученных отделах головного мозга и, прежде всего, в поврежденном полушарии, наблюдали выраженное полнокровие внутримозговых микрососудов, периваскулярный отек и дистрофические изменения нейронов, основная масса которых располагалась в области расширенных и полнокровных микрососудов. Описанные изменения наблюдали во всех участках головного мозга - в поврежденном и контралатеральном полушариях (рис. 1).

Через 21 сутки при среднетяжелой ЧМТ, нанесенной в правом полушарии в области первичной ЧМТ, в зоне ушиба наблюдали утолщение твердой оболочки головного мозга, которая была частично сращена с чешуей височной кости. По данным гистологического исследования, в зонах ушиба выявлена лимфоидно-клеточная инфильтрация с небольшим количеством дистрофически измененных нейронов и глиальных клеток, что свидетельствовало об атрофически-дистрофических изменениях ткани мозга в зоне ЧМТ.

В поврежденном полушарии все еще преобладали нарушения внутримозгового кровообращения, а в большинстве нейронов выявляли гиперхроматоз, дистрофические изменения отростков.

По данным электронно-микроскопического исследования нейронов коры головного мозга, а также структур синаптического аппарата с учетом морфометрического состояния внутриклеточных органелл при средне-тяжелой ЧМТ, начиная с 1-х суток в значительной части нейронов наблюдали выраженные изменения внутриклеточных органелл, которые в части нейронов можно рассматривать как необратимые вследствие деструкции мембран митохондрий, вакуольного перерождения эндоплазматического ретикулума и значительного уменьшения этих клеток в цитоплазме количества - как свободных, так и фиксированных рибосом, что обуславливало нарушение как белоксинтезирующей, так и энергопродуцирующей функций этих клеток. Так, на 21-е сутки отношение площади, занимаемой интактными митохондриями, уменьшалось по сравнению с таковым в основной группе в нейронах поврежденных полушарий.

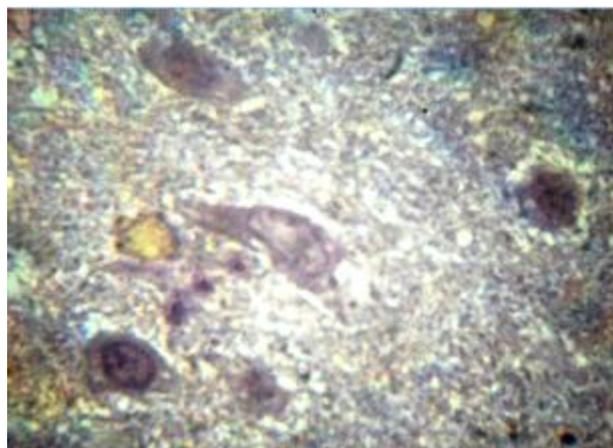


Рис. 1. а) Кора головного мозга. ЧМТ средней тяжести через 21 сутки. Вакуольная дистрофия нейронов и клеток глии, в цитоплазме нейронов видны светлые вакуоли. Размеры ядер уменьшены с конденсацией хроматина. Около нейронов видны олигодендроциты и клетки микроглии. В них отмечается вакуолизация цитоплазмы и уплотнение хроматина ядер. Полутонкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. X 1000.

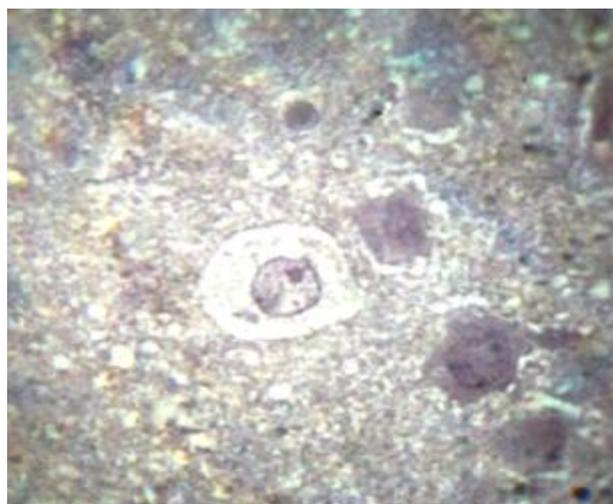


Рис. 1. б) Кора головного мозга. ЧМТ средней тяжести через 21 сутки. Виден астроцит со светлой вакуолизированной цитоплазмой. Сморщивание ядра с конденсацией хроматина по внутреннему краю ядерной мембраны. Около астроцита видны темные нейроны. Полутонкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. X 1000.

У животных основной группы по данным морфометрического анализа клеточных элементов (нейронов и глиоцитов) уже через 1 сутки после средне-тяжелой ЧМТ в поврежденном полушарии головного мозга наблюдали достоверное (в 2 раза) уменьшение количества измененных нейронов, максимальное на 21-е сутки после травмы, по сравнению с таковым в контроле; в контралатеральном полушарии количество измененных нейронов было в 1,4-1,5 раза меньше, чем в контроле (рис. 2).

В поврежденном полушарии количество измененных нейронов было в 6 раз, а в противо-

положном полушарии - в 4 раза меньше, чем в контроле. В контралатеральном и поврежденном полушариях количество глиальных клеток, расположенных вокруг измененных микрососудов и дистрофически неизмененных нейронов, в 1,7-2 раза превышало таковое в контроле.

Увеличение количества глиоцитов на фоне изменения количества нейронов обуславливало нарушение индекса "нейрон-глия". При средне-тяжелой ЧМТ этот индекс в поврежденном полушарии на 1-е сутки составил 2,3 (в норме 5,6), то есть был почти в 2,5 раза меньше. В контралатеральном полушарии индекс "нейрон-глия" был снижен в 1,9 раза. Это свидетельствовало об увеличении количества глиальных клеток во всех изученных отделах головного мозга. На 21-е сутки после средне-тяжелой ЧМТ в связи с восстановлением структурной целостности нейронов и уменьшением количества микроглиальных клеток индекс "нейрон-глия" значительно увеличивался и составлял в поврежденном и контралатеральном полушариях соответственно 4,0 (в норме 5,6). Это свидетельствует о восстановлении структурной целостности нейронов и уменьшением количества микроглиальных клеток.

По данным электронно-микроскопического исследования нейронов коры головного мозга необходимо отметить, что уже на 21-е сутки после средне-тяжелой ЧМТ в значительной части нейронов наблюдали процессы внутриклеточной репаративной регенерации различной степени выраженности, что проявлялось гиперплазией аппарата Гольджи и всей системы эндоплазматического ретикулума, активацией рибосом и полисом, а также появлением в цитоплазме нейронов молодых форм митохондрий. Наиболее активные процессы репаративной регенерации наблюдали в контралатеральном полушарии, а также в зонах восстановления внутримозгового кровообращения.



Рис. 2. а) Кора головного мозга. ЧМТ средней тяжести после лечения церебролизином на 21-е сутки. Виден светлый астроцит. Явления дистрофии отсутствуют. Полутоновый срез. Окраска гематоксилином-эозином. X 1000.

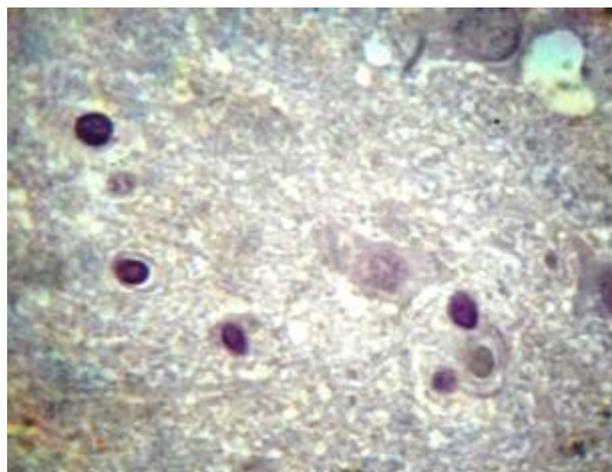


Рис. 2. б) Кора головного мозга. ЧМТ средней тяжести после лечения церебролизином на 21-е сутки. Видны олигодендроциты и увеличенное количество клеток микроглии. Явления дистрофии отсутствуют. Полутоновый срез. Окраска гематоксилином-эозином. X 1000.

Таким образом, проведенные исследования показали, что ЧМТ вызывала у крыс комплекс макро- и микроскопических патоморфологических нарушений. Анализ результатов патоморфологического изучения мозговых структур при ЧМТ свидетельствует об определенной стадийности в развитии патологических изменений. Так, в первые дни после средне-тяжелой травмы головного мозга отмечалось нарастание дисгемических и гидропических функциональных, а затем и дистрофических нарушений как в нейронах, так и в сосудах головного мозга, а после, в конце 3-й недели, наблюдалось прогрессирование реактивных и репаративных процессов на фоне стабилизации, а затем и регрессирования отека мозга. С другой стороны, полученные данные показывают развитие необратимых морфоструктурных изменений в виде дистрофических процессов, влекущих за собой появление участков "неполного микронекроза". По-видимому, выявленные патоморфологические изменения, индуцированные ЧМТ, обуславливают формирование значительной части неврологических заболеваний в посттравматическом периоде, что соответствует также мнению ряда авторов [7, 10, 12, 13, 14].

Что касается изменений у животных основной группы, церебролизин способствовал регрессированию патоморфологических нарушений головного мозга крыс в раннем посттравматическом периоде, что отмечалось нами на 21-е сутки с момента воспроизведения ЧМТ. Акцентируя внимание на отмеченных позитивных эффектах церебролизина при его 10-дневном введении животным, следует отметить, что препарат нормализовал качественные и количественные изменения ткани мозга, развившиеся вследствие нанесения механической ЧМТ. Определенный

оптимизм в этом отношении вселяет увеличение количества нейронов с повышенной функциональной активностью, что подтверждает регрессирование морфологических макро- и микроизменений в ткани мозга.

В заключение обращаем внимание на то, что результаты, изложенные нами в настоящей работе, дополняют полученные ранее данные о нормализации под влиянием церебролизина процессов биоэлектrogenеза и двигательной активности животных в аналогичных экспериментальных условиях.

Выводы

1. После нанесения механической ЧМТ в теменно-затылочной области у крыс развиваются патоморфологические нарушения, затрагивающие как поврежденное, так и неповрежденное, контралатеральное полушарие.

2. У крыс с ЧМТ редуцируется количество нейронов с нормальной и повышенной функциональной активностью.

3. Ежедневное введение церебролизина (0,1 мл в/б) крысам с ЧМТ способствовало качественной и количественной нормализации морфологической структуры мозга животных.

4. Лечебное действие препарата развивалось на 21-е сутки и было наиболее выраженным в контралатеральном полушарии, что свидетельствует о необходимости начала лечения при ЧМТ в остром периоде.

5. Назначение церебролизина может быть полезным в комплексной патогенетической терапии у больных с травматическим повреждением мозга.

Литература:

1. Касумова С.Ю. Динамика морфологических изменений при очаговых и диффузных повреждениях головного мозга // Травма центральной нервной системы. - Одесса, 1991. - С. 52-54.
2. Карахан В.Б., Крылов В.В., Лебедев В.В. Травматические поражения центральной нервной системы // Болезни нервной системы / Под ред. Н.Н. Яхно, Д.Р. Штульман. - М.: Медицина, 2001. - 744 с.
3. Курако Ю.Л., Букина В.В., Перькова А.В. Морфофункциональные соотношения в патогенезе сотрясения головного мозга // Неврология и психиатрия. - Киев: Здоров'я, 1989. - С. 9-11.
4. Курако Ю.Л., Букина В.В. Легкая закрытая черепно-мозговая травма. - Киев: Здоров'я, 1989. - 136 с.
5. Лихтерман Л.Б., Потапов А.А., Кравчук А.Д. и др. Клиническая классификация и концептуальные подходы к лечению последствий ЧМТ // Вопр. нейрохирургии. - 1999. - № 3. - С. 3-6.
6. Макаров А.Ю. Последствия ЧМТ и их классификация // Неврол. журн. - 2001. - Т. 6, № 2. - С. 38-42.
7. Хижнякова К.И. Динамика патоморфологии черепно-мозговой травмы. - М.: Медгиз, 1983.
8. Мякотных В.С., Тачанкина Н.З., Боровкова Т.А. Клинические, патофизиологические и морфологические аспекты отдаленного периода закрытой ЧМТ // Журн. неврол. и психиатр. им. Корсакова. - 2002. - Т. 102, № 4. - С. 61-65.
9. Никифоров А.С., Коновалов А.Н., Гусев Е.И. Клиническая неврология: Учебник: в 3 т. - М.: Медицина, 2002. - Т. II. - 792 с.
10. Foda M., Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II. Morphological characterization // J.
11. Савченко А.Ю., Захарова Н.С., Степанов И.Н. Лечение последствий заболеваний и травм головного мозга с использованием фенотропила // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2005. - Т. 105, № 12. - С. 22-26.
12. Katayama Y., Kawamata T., Taubokawa T. Effects of platelet activating factor antagonist on hemodynamic depression in cerebral pericontusion areas // J. Neurosurgery. - 1997. - V. 14, N. 4. - P. 264.
13. Смирнов Л.И. Патологическая анатомия и патогенез травматической болезни нервной системы. - М., 1949. - 203 с.
14. Babb T.L. Metabolic, morphologic and electrophysiologic profiles of human temporal lobe foci: An attempt at correlation // Adv. Exp. Med. Biol. - 1986. - Vol. 203. - P. 115-125.
15. Bullock R., Teasdale G.M. Head injuries-surgical management: Traumatic intracranial hematomas // R. Braakman (Ed.) Vinken and Bruyn's Handbook of Clinical Neurology, Head Injury. - Elsevier, Amsterdam, 1991. - Vol. 24. - P. 249-298.
16. McIntosh T.K. Novel pharmacologic therapies in the treatment of experimental traumatic brain injury: a review// J. Neurotrauma. - 1993. - Vol. 10. - P. 215-261.
17. Minz M., Knowlton B., Myslobodsky M.S. Effect of nootropic solkoceryl on kainic acid induced excitotoxic brain injury//armacol. Biochem. Behav. - 1993.- 45.- 55-58.