

Э.М.Мамытова

Кыргызская государственная медицинская академия имени И.К.Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан

Ключевые слова: Церебролизин, черепно-мозговая травма, морфофункциональные изменения, структуры мозга.

Надійшла: 28.04.2016

Прийнята: 16.05.2016

УДК [616.714+616.831-001.3/.4]-092.9:612.823:615.03

ХАРАКТЕР ДЕСТРУКТИВНЫХ И КОМПЕНСАТОРНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СРЕДНЕ-ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

Реферат. Автор описывает результаты экспериментальных исследований, целью которого являлось изучение влияния Церебролизина на морфофункциональные изменения структур мозга в раннем посттравматическом периоде.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 2. – С. 18-22.

© Э.М.Мамытова, 2016

✉ elmiramamytova@yahoo.com

Mamytova E.M. The nature of the destructive, compensatory and regenerative processes in the brain of rats after experimental moderate traumatic brain injury and the possibility of their pharmacological correction.

ABSTRACT. Background. The most important task of intensive care patients with traumatic brain injury is prevention and treatment of secondary brain injury, including cerebral ischemia secondary, and neuroprotection, which reduces the impact of secondary damaging factors and allows the nerve cells to escape death. One of the most promising ways of neuroprotection in traumatic brain injury can be neurotrophic therapy. Among the drugs used as neuroprotective agents cerebrolysin occupies a special place. **Objective.** The aim of this work was to study the effect of the drug cerebrolysin on the morphological changes of brain structures in the early posttraumatic period. **Methods.** To simulate a traumatic brain injury spring drummer was used, it was experimentally calibrated to apply rats moderate injury. At the time of injury animals were briefly pressed to the foam lining, achieved than horizontal arrangement surface of the cranial vault. In the first subgroup of the main group of animals applied injury secondary to severe without further therapy cerebrolysin. In the second subgroup of the main group after the application of the medium-heavy injury in an experimental neuroprotective therapy used Cerebrolysin (0.1 ml once within 10 days). Calculated absolute number or percentage of 100 cells observed in 10 fields of view of the microscope intact pathologically altered neurons and glial cells. **Results.** Under the recovery and regeneration (day 21) due to the neuroprotective therapy after traumatic brain injury modeling moderate severity in both hemispheres an increase of normal neurons was observed, it was expressed in the absence of significant differences in this indicator when compared with the control. The same trend was observed on the 14th day after the injury, but occurs only in the damaged hemisphere. On day 21 compared to control a decline of the total number of neurons changed, the values of this index approaches the value 1 day after the injury. Morphometric analysis showed a reduction in the bulk density of the nucleus is 7, and 21 days of experimental traumatic brain injury in the group without treatment. In Cerebrolysin group on day 14 and 21, the bulk density of the nucleus closer to the control parameters. The same trend was observed in relation to the bulk density of ribosomes and neurofibrillary. In case of injury of moderate severity in the group without a neuroprotectant during the entire study period there is a diffuse lesion of the brain studied departments mostly damaged hemisphere, which appeared resistant dystrophic and destructive changes of the neurons without significant signs of pronounced reparative regeneration in the regenerative posttraumatic period. **Conclusion.** When using a neuroprotectant cerebrolysin marked increase in intact neurons, which was celebrated not only in the injured, but also in the contralateral hemisphere on the day 21st of the experiment. In this case an increase amount of glial cells was also seen.

Key words: Cerebrolysin, brain injury, morphological and functional changes in brain structure.

Citation:

Mamytova EM. [The nature of the destructive, compensatory and regenerative processes in the brain of rats after experimental moderate traumatic brain injury and the possibility of their pharmacological correction]. *Morphologia*. 2016;10(2):18-22. Russian.

Введение

В течение последних лет механизмы нейрональной гибели после черепно-мозговой травмы (ЧМТ) являются предметом пристального вни-

мания благодаря высокой уязвимости нейронов и последующей хронической нейродегенерации. Нейрональная гибель в результате травмы является сложным феноменом возможно происходя-

щим от одновременной активации различных молекулярных каскадов в ответ на травму и эта активация остается эффективной в течение длительного периода времени и вызывает прогрессивную атрофию мозга с последующей неврологической дисфункцией [1-5].

Значительную роль в переживании нейронов после травмы и формирования синапсов играют астроциты, выделяющие трофические факторы и цитокины, как ингибирующие, так и способствующие регенерации, фактор роста фибробластов, интерлейкин-1, интерлейкин-3, интерлейкин-6, туморо-некротический фактор, фактор роста нервов и другие. После травмы увеличивается число органелл астроцитов, что вероятно связано с необходимостью продуцировать большое количество факторов роста [6].

Важнейшими задачами интенсивной терапии пострадавших с ЧМТ (в том числе в послеоперационном периоде) является профилактика и лечение вторичных повреждений головного мозга, в том числе вторичной ишемии мозга, и нейропротекция, которая уменьшает воздействие вторичных повреждающих факторов и позволяет нервным клеткам избежать гибели [7].

Одним из перспективных способов нейропротекции при ЧМТ может быть нейротрофическая терапия. Среди препаратов, применяемых в качестве нейропротекторов, особое место занимает церебролизин.

Цель исследования

С учетом важности морфологических изменений в определении характера и выраженности посттравматических проявлений целью настоящей работы явилось изучение влияния препарата церебролизин на морфофункциональные изменения структур головного мозга в раннем посттравматическом периоде.

Материалы и методы

В нашей работе в опытных группах было использовано 72 белых лабораторных крыс. Контрольная группа – интактные животные – 30 животных. Опытные группы: 1) ЧМТ без нейропротективной терапии – 36 животных; 2) ЧМТ с нейропротективной терапией – 36 животных. Животным опытных групп моделировали ЧМТ средней степени. Вышеприведенные подгруппы также разделяли на четыре подгруппы (по 3 животных) в зависимости от экспериментальных сроков – 1, 7, 14 и 21 сутки.

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

ЧМТ средней степени тяжести. В момент нанесения травмы животное кратковременно прижимали к поролоновой прокладке, чем добивались горизонтального расположения поверхности свода черепа.

В первой подгруппе основной группы животным наносили ЧМТ средне-тяжелой степени без последующей терапии Церебролизин. Во второй подгруппе основной группы после нанесения средне-тяжелой ЧМТ в качестве экспериментальной нейропротекторной терапии использовался Церебролизин (0,1 мл внутривбрюшинно один раз в течение 10 суток). Животных на первые, седьмые, четырнадцатые и двадцать первые сутки после травмы выводили из эксперимента, вскрывали полость черепа и извлекали головной мозг.

Для микроскопического исследования брались участки мозгового вещества из корково-подкорковой области на стороне поражения и из контрлатерального полушария.

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 микротома 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 дальнейшей срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Наличие качественных морфологических изменений в тканях головного мозга оценивали при помощи светового микроскопа «Zeiss» (Германия). 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).

Проводился морфометрический анализ. Подсчитывали абсолютное количество или процентное соотношение в 100 клетках, наблюдаемое в 10 полях зрения микроскопа интактных, патологически измененных нейронов и глиальных клеток. Индекс нейрон – глия подсчитывали как отношение общего количества нейронов к количеству глиальных клеток.

Все полученные в работе материалы обработаны методами вариационной статистики в пакете Microsoft Excel. Достоверность получен-

ных данных между группами определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Как видно из таблицы 1, на 1-е сутки при ЧМТ в группе без церебролизина и в группе церебролизина количество интактных нейронов в поврежденном и контрлатеральном полушарии практически не отличается по сравнению с контролем ЧМТ.

В группе животных без нейропротекторной и с нейропротекторной терапией в поврежденном и контрлатеральном полушарии на 7-е, 14 сутки после травмы наблюдается достоверное (1,2 раза) уменьшение количества неизмененных нейронов по сравнению с таковым в контроле.

При гистологическом исследовании ткани головного мозга животных группы без церебролизина уже в 1-е сутки после нанесения ЧМТ средней тяжести увеличивалось количество дистрофически-измененных нейронов в лобно-теменной области поврежденного полушария – в 3 раза, контрлатерального полушария – в 2,4 раза и составляло соответственно (14±2,1) и (12±4,1)%, в контроле – (5,0±0,38)%. В последующие сроки наблюдения (7-е–14-е сут) количество измененных нейронов увеличивалось в области поврежденного полушария до (22±2,5)%, что в 4,4 раза превышало таковое в контроле, в области контрлатерального полушария – в 3,2 раза.

Таблица 1
Морфометрические изменения нейронов и глиоцитов при черепно-мозговой травме средней степени тяжести

Параметры	Область мозга	Контроль, n=30	Величина показателя (M±m) в сроки, сут							
			1 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки				
			Церебролизин	Церебролизин	Церебролизин	Церебролизин				
Количество нормальных нейронов	Поврежденное полушарие	79±4,5	72±3,6	75±4,2	64±3,7*	66±4,5*	62±3,5*	69±3,6	57±3,4*	71±3,1
	Контрлатеральное полушарие	83±3,4	75±3,5	76±4,1	67±3,6*	70±4,1*	65±3,7*	72±3,7*	68±3,4*	75±3,4
Количество измененных нейронов	Поврежденное полушарие	5±0,38	14±2,1*	15±2,3*	22±2,5*	20±2,4*	21±3,1*	15±2,1*	16±1,7*	13±1,5*
	Контрлатеральное полушарие		12±4,1	11±4,1	15±3,1*	12±1,7*	16±2,3*	14±2,1*	15±3,1*	11±2,3*
Количество глиальных элементов	Поврежденное полушарие	17±1,2	19±1,1	21±1,2*	20±1,3	16±1,5	25±2,3*	30±2,3*	27±1,7*	31±2,5*
	Контрлатеральное полушарие		15±2,1	16±2,3	18±3,1	21±4,3	22±1,7*	25±1,6*	26±1,7*	27±1,5*
Соотношение нейрон-глия	Поврежденное полушарие	4,6	4,6	3,5	3,5	4,0	2,5	2,3	2,1	2,2
	Контрлатеральное полушарие		4,8	4,8	3,1	3,3	3,0	2,9	3,0	2,8

Примечание: * - различия показателей достоверны по сравнению с таковыми в контрольной группе.

При лечении нейропротектором церебролизином на 7-е, 14-е сутки посттравматического периода также имеет место рост количества измененных нейронов в обоих полушариях, но более отчетливый, чем в группе без нейропротектора.

Важным показателем в посттравматическом периоде является состояние и количество измененных глиальных клеток. По данным морфометрических исследований уже в 1-е сутки после ЧМТ средней степени тяжести на фоне нейропротекторной терапии по ходу капилляров в

лобно-теменной области поврежденного полушария головного мозга достоверно (в 1,2 раза) увеличивалось количество глиальных клеток – с $(17 \pm 1,2)$ до $(21 \pm 1,2)\%$. Чего не наблюдалось микроскопически у животных группы без церебролизина. В контрлатеральном полушарии обеих опытных групп не отмечается достоверной разницы в общем количестве глиоцитов.

В последующем (на 7–14-е сутки) в группе с церебролизином количество глиоцитов в поврежденном полушарии головного мозга увеличивалось почти в 2 раза по сравнению с контрольным уровнем, в группе же без церебролизина не обнаружено достоверных отличий данного показателя при сравнении с контролем. В контрлатеральном полушарии количество глиальных элементов достоверно увеличивалось (в 1,5 раза) при сравнении с контролем только на 14 сутки в обеих испытуемых группах.

В связи с увеличением количества глиальных клеток изменялся индекс нейрон-глия, который был более отчетливым на 14-е сутки. Так на 14-е сутки в поврежденном полушарии группы с церебролизином индекс нейрон-глия составлял 2,3, в контроле – 4,6, в группе без церебролизина – 2,5, т.е почти в 2 раза меньше. В контрлатеральном полушарии индекс нейрон-глия на 7-14-е сутки снижался относительно контрольного значения в 1,6 раза и составлял в среднем 3,0. Это свидетельствовало о значительной активации глиальных клеток в раннем посттравматическом периоде.

ском периоде.

В стадии восстановления и регенерации (21-е сутки) на фоне нейропротективной терапии после моделирования ЧМТ средней степени тяжести в обоих полушариях отмечается рост нормальных нейронов, который выражается в отсутствии достоверной разницы данного показателя при сравнении с контролем. Такая же тенденция отмечается на 14-е сутки после травмы, хотя имеет место только в поврежденном полушарии.

На 21-е сутки по сравнению с контролем отмечается снижение общего количества измененных нейронов, значения данного показателя приближаются к значениям 1-х суток после травмы. Так у животных обеих испытуемых групп количество измененных нейронов во всех отделах головного мозга в 2,5 – 3,2 раза превышало таковое в контроле, а количество глиальных клеток также через 21-е сутки наблюдения было в среднем в 1,7 раза больше, чем в контроле. При этом индекс нейронглии в пораженном полушарии в 2,2 раза выше такового в контроле, а контрлатеральном – в 1,6 раза.

Морфометрический анализ показал уменьшение объемной плотности ядра на 7 и 21 сутки экспериментальной ЧМТ в группе без лечения. В группе с Церебролизином на 14 и 21 сутки отмечается – объемная плотность ядра приближается к контрольным показателям (табл. 2). Такая же тенденция отмечается в отношении объемной плотности рибосом и нейрофибрилл.

Таблица 2

Морфометрические показатели ультраструктуры пирамидных клеток коры головного мозга в остром периоде экспериментальной черепно-мозговой травме средней степени тяжести

Показатели	Контроль	14 сутки		21 сутки	
		Без лечения	Церебролизин	Без лечения	Церебролизин
Ядро	$42 \pm 1,2$	$31 \pm 0,9^*$	$33 \pm 1,3^*$	$36 \pm 1,2^*$	$40 \pm 1,1$
Рибосомы	$3,9 \pm 0,03$	$1,9 \pm 0,06^*$	$2,1 \pm 0,09^*$	$2,7 \pm 0,01$	$3,4 \pm 0,02$
Митохондрии	$2,2 \pm 0,04$	$1,4 \pm 0,03^*$	$1,6 \pm 0,02^*$	$1,8 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,03$
Нейрофибриллы	$1,9 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,02^*$	$1,3 \pm 0,03$	$1,8 \pm 0,02$

Примечание: * – различия показателей достоверны по сравнению с таковыми в контрольной группе при $p \leq 0,002$.

Выводы

1. При ЧМТ средней степени тяжести в группе без нейропротектора на протяжении всего изучаемого периода (1-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки) имеет место диффузное поражение всех изученных отделов головного мозга преимущественно поврежденного полушария, которое проявлялось стойкими дистрофически-деструктивными изменениями значительной части нейронов без признаков выраженной репаративной регенерации в восстановительном посттравматическом периоде.

2. При применении нейропротектора Церебролизин отмечен рост интактных нейронов, который отмечался не только в поврежденном, но и в контрлатеральном полушарии на 21-е сутки эксперимента. При этом также отмечалось увеличение количества глиальных клеток.

Перспективы дальнейших исследований

Ультраструктурные изменения структур головного мозга в раннем посттравматическом периоде являются перспективным направлением изучения эффективности церебролизина.

Литературные источники
References

1. Stoica BA, Faden AI. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7:3-12.
2. Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma*. 2000;17:811-29.
3. Formigli L, Papucci L, Tani A. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*. 2000;182:41-9.
4. Smith DH, Chen XH, Xu BN, McIntosh TK, Gennarelli TA, Meaney DF. Characterization of diffuse axonal pathology and selective hippocampal damage following inertial brain trauma in the pig. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1997;56:822-34.
5. Yu SW, Andrabi SA, Wang H. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:18314-9.
6. Moppett IK. Traumatic brain injury: assessment, resuscitation and early management. *Br J Anaesth*. 2007;99:18-31.
7. Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neurobiology of Disease*. 2007;147(4):867-83.

Мамитова Е.М. Характер деструктивних і компенсаторно-відновних процесів у головному мозку щурів після експериментальної середньо-важкої черепно-мозкової травми та можливості їх фармакологічної корекції.

Реферат. Автор описує результати експериментальних досліджень, метою якого було вивчення впливу Церебролізину на морфофункціональні зміни структур мозку в ранньому посттравматичному періоді.

Ключові слова: Церебролізін, черепно-мозкова травма, морфофункціональні зміни, структури мозку.