

**Н.В.Журавель
В.Й.Мамчур**

Дніпропетровська державна
медична академія

УДК 616.831-005.4:615.214:612.822]-092.9

КОМПЛЕКСНА ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕН- ТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ ГОЛОВНОГО

МОЗКУ НА ТЛІ ЗАСТОСУВАННЯ НООТРОПНИХ ЗАСОБІВ

Ключові слова: експериментальна ішемія головного мозку, ноотропи, нейроморфометрія, міжпівкульові відмінності

Надійшла: 06.05.2007

Прийнята: 09.06.2007

Резюме. У досліджах на білих щурах-самцях лінії Вістар вивчені нейроморфометричного аналізу з використанням відмінності у дії ноотропів на праву і ліву півкулі мозку шляхом проведення імуногістохімічних методик на моделі гострого порушення мозкового кровообігу. Патологія моделювалася двобічною перев'язкою загальних сонних артерій у щурів. На 4 і 18 доба ішемії вивчався морфофункціональний стан нейронів, глій, вміст РНК в них, частка апоптотичних і деструктивно змінених клітин, а також кількість c-Fos-імунопозитивних нейронів. Встановлені деякі відмінності у впливі ноотропів на відновлення нервової тканини правої і лівої гемісфер мозку. Зроблені висновки про перевершуючу нейропротекторну дію пікамілону в порівнянні з аміналоном. А також виявлена тенденція до більшої ранішого відновлення нервової тканини правої гемісфери під впливом пікамілону, у меншій мірі – аміналону. Отримані дані можуть бути використані при розробці раціональних схем лікування патології мозку з півкульовою локалізацією.

Zhuravel' N.V., Mamchur V.I. Complex description of nervous fabric's morphological changes in the conditions of experimental cerebral ischemia on a background application of nootropes.

Summary. In experiments on male Wistar rats distinctions in operations of nootropes on the right and left hemispheres of brain are studied by conducting of neuromorphological research with the use of immunohistochemical methods. The model of experimental ischemic stroke was used. Pathology was designed by 2-sided bandaging of general carotids at rats. On 4 and 18 days of ischemia the morphological and functional condition of nervous cells, maintenance of PNA in them, stake of apoptotic cells, and also amount of c-fos-positive neurons was studied. Some distinctions are set in nootropes influence on renewal of right and left hemispheric nervous tissue. The conclusions are done about the superior neuroprotective action of Pikamilone as compared to Aminalone. And also a tendency is exposed to greater to more early renewals of nervous fabric of right hemisphere under influencing of Pikamilone, in less degree – Aminalone. The findings can be used for development of rational charts of treatment of the brain pathology with hemispheric localization.

Key words: experimental cerebral ischemia, nootropes, neuromorphological research, interhemispheric distinctions.

Вступ

Однією з найбільш важливих проблем сучасної нейрофармакології є лікування мозкових інсультів, що обумовлено неухильним зростанням захворюваності, стійкою втратою працездатності і високою смертністю (Гусев Е.И. и соавт., 2001; Дзяк Л.А. та співавт., 2003; Беленичев И.Ф. и соавт., 2006). Ішемічний інсульт спостерігається у 51,2% хворих на цереброваскулярну патологію, в той час як геморагічний – у 17,5%. Має місце й певна залежність різних клінічних варіантів порушень мозкового кровообігу від судинного басейну. Так, в вертебро-базиллярній системі частіше спостерігаються скороминущі порушення мозкового кровообігу, а інфаркти мозку у 8 раз частіше виникають у каротидному басейні (півкульові ішемічні інсульти) (Одинак М.М. та співавт., 1998).

Ішемічний інсульт є багатофакторним патологічним процесом, що виникає первинно на тлі невідповідності рівня кровопостачання метаболічним потребам тканини мозку. Дослідження критичних рівнів мозкового кровотоку дозволило сформулювати концепцію «ішемічної півтіні». З клінічної точки зору її значення полягає в тому, що порушення функції нейронів мають оборотний характер впродовж обмеженого часу (3-6 годин), відновлення кровотоку і метаболізму в цій зоні дозволяє відновити нормальне функціонування нейронів цієї ділянки. Основну роль в причинах загибелі нейронів в зоні ішемічної півтіні відводять глутаматному каскаду і оксидантному стресу. У каскаді глутаматної нейротоксичності одним з етапів, що призводять до загибелі клітини, є наростання генів-індукторів апоптоза або пригніблення генів-інгібіторів, порушення

окислювально-відновних процесів за рахунок блокування мітохондріального комплексу. Важливу роль в цьому грають так звані « гени раннього реагування» сімейств FOS і JUN (Мушкарбаров Н.Н., Кузнецов С.Л., 2003).

В лікуванні ішемічного інсульту важливе місце належить засобам з ноотропними властивостями, але їх вплив на процеси нейропротекції в різні терміни ішемії, а також можлива латералізація дії нейротропних препаратів не беруться до уваги клініцистами та не мають експериментального обґрунтування.

Метою даного дослідження було виявлення закономірностей змін нейрогістоморфологічних показників на різних етапах ішемії мозку під впливом ГАМК-ергічних ноотропів, а також спроба прослідкувати відмінності у впливі препаратів на зону інфаркту правої та лівої гемісфери мозку.

Матеріали та методи

Дослідження були проведені на білих статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 150-200 г. Щури отримані з пітомника ІФТ АМН України. Усі тварини утримувалися на стандартному раціоні віварію (Кожемякін Ю.М. та співавт., 2002). Порушення мозкового кровообігу моделювали шляхом незворотньої двобічної перерізання загальних сонних артерій. Двобічна оклюзія артерій проводилася під натрій-тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) з використанням хірургічного доступу для виділення сонних артерій та одномоментного накладання на них шовкової лігатури. Проводилося дві серії експериментів (по 30 щурів в кожній). Щури кожної серії були поділені на три експериментальні групи: перша група (А) – інтактні (псевдооперовані) тварини, друга (В) – щури з експериментальною мозковою ішемією, третя (С) – група тварин з порушенням мозкового кровообігу, яким проводилося лікування ноотропним препаратом. Щурам першої серії перорально один раз на день протягом 18 діб вводився аміналон (капсули по 250 мг, «Київський вітамінний завод», Україна) в дозі 250 мг/кг, щурам другої серії – пікамилон (таблетки по 50 мг, «Акрихин», Росія) в дозі 50 мг/кг. Частина тварин з груп А, В та С обох серій виводилася з експерименту на 4 добу шляхом декапітації під натрій-тіопенталовим наркозом (з біоетичних міркувань), частини груп тварин В та С, що залишились, продовжили вказані умови експерименту та виводилися з нього таким же шляхом на 18 добу. Для морфологічних досліджень у тварин після декапітації витягувалися ліва та права півкуля головного мозку, потім 24 години фіксувалися в 10% рідині Буена (Пирс Э., 1962), далі за стандартною схемою поміщалися в парафінові блоки, з яких готували 5-мікронні гістологічні зрізи в області постцентральної звини (соматосенсорна кора). Для вивчення морфофункціонального стану нейронів IV-V шарів кори мозку гістологічні зрізи депарафінували та фарбували галоціанін-хромовими квасцями за

Ейнардоном для специфічного виявлення РНК. Зображення кори мозку отримували на мікроскопі Ахіоскоп (Zeiss, Німеччина) та за допомогою 8-бітної CCD-камери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Морфометричний аналіз клітин мозку здійснювали в автоматичному режимі за допомогою макропрограми, розробленої в спеціалізованому середовищі програмування VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина). Визначали наступні показники:

- щільність нейронів, гліальних клітин, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів (кількість клітин на 1мм^2 площі зрізу кори мозку);
- площа тіл нейронів, гліальних клітин (мкм^2);
- концентрацію РНК в нейронах, гліальних клітинах (одиниці оптичної щільності, $E_{\text{оп}}$), які розраховували як логарифм відношення оптичної щільності тіла клітини до оптичної щільності міжклітинної речовини;
- визначення вмісту c-fos - позитивних нейронів імунофлуоресцентним методом.

Відмінності між групами оцінювали статистично з використанням параметричного критерію t-Ст'юдента за допомогою програми "Biostat" і MS Excell. Достовірність відмінностей відносних величин оцінювалася із застосуванням критерію χ^2 . Достовірними вважали відмінності з рівнем значущості більше 95% ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення

Аналіз наведених даних свідчить, що ефекти, які проявляються на гістологічному рівні, залежать як від впливу досліджуваних препаратів, так і від терміну їх дії, причому існують деякі відзнаки між показниками правої та лівої півкулі мозку.

За результатами першої серії досліджень (досліди з аміналоном) було з'ясовано, що ішемія призводила до зменшення щільності нейронів в тканинах обох півкуль (табл.1). При цьому відмічалося достовірне зменшення площі тіл нейронів зі зниженням вмісту в них РНК порівняно з інтактними тваринами. Ті ж тенденції були в характері змін гліального ланцюга: відмічалося невелике зниження щільності гліальних клітин та їх площ, разом з цим зниження вмісту РНК в гліях (табл.2). Це свідчить про зниження транскрипторної активності клітин нервової системи в гострий період ішемічного ураження мозку. В мозковій тканині щурів з ішемією на 4 добу в середньому в 4,3 рази підвищилася частка апоптотичних нейронів без суттєвих змін цього показника у відновний період (рис.1). Лікування аміналоном щурів з гострим ішемічним інсультом практично не впливала на щільність нейронів порівняно з контрольною групою, при цьому не було міжпівкульової різниці по показнику на 4 добу та відмічалося покращення цього показника в правій, та дещо в меншому ступені, в лівій гемісфері на 18 добу експерименту. Інші характеристики нейро-

нів цієї групи суттєво не відрізнялись по показникам гемісфер та, в порівнянні з контрольною групою, не приносили позитивних результатів в ранні терміни ішемії. Курсове введення амінало-

ну призводило до підвищення щільності гліальних клітин в 1,2 рази к 18 добі лікування більш за рахунок гліальних клітин правої гемісфери.

Таблиця 1

Характеристика нейронів IV-V шарів кори головного мозку щурів з експериментальною ішемією на тлі

Експериментальні групи	Щільність нейронів, клітин/мм ²		Площа тіл нейронів, мкм ²		Вміст РНК у нейронах, E _{оп}	
	4-та доба	18-та доба	4-та доба	18-та доба	4-та доба	18-та доба
Інтактні (права півкуля)	1285±22	1299±16	75,32±0,74	75,27±1,4	9,71±0,25	9,76±0,19
Інтактні (ліва півкуля)	1277±20	1289±18	75,21±1,08	75,14±0,7	9,64±0,19	9,69±0,17
Контроль (права півкуля)	1065±17	1075±21	62,92±0,56	64,12±1,1	5,3±0,12	6,5±0,38
Контроль (ліва півкуля)	1061±16	1062±14	62,17±0,93	64,10±1,05	5,21±0,16	6,15±0,23
Ішемія + аміналон (права півкуля)	1071±18	1162±23*	63,02±0,62	67,65±0,88*	6,38±0,19	7,02±0,25
Ішемія + аміналон (ліва півкуля)	1064±12	1146±18*	62,87±0,46	67,13±0,94*	6,17±0,11	6,81±0,28
Ішемія + пікамилон (права півкуля)	1121±20*	1139±14	67,24±0,32*	71,88±0,56*	7,73±0,18*	7,94±0,17*
Ішемія + пікамилон (ліва півкуля)	1108±17	1125±13	66,47±0,61*	71,26±0,63	7,52±0,22	7,69±0,2

застосування ноотропів

Примітка: тут та далі * - достовірність відмін (p<0,05) по відношенню до групи контролю

Таблиця 2

Морфологічні зміни в гліальному ланцюгу нервової тканини головного мозку щурів при застосуванні ноотропів на фоні ішемічного інсульту

Експериментальні групи	Щільність гліальних клітин, клітин/мм ²		Площа тіл гліальних клітин, мкм ²		Вміст РНК у гліях, E _{оп}	
	4-та доба	18-та доба	4-та доба	18-та доба	4-та доба	18-та доба
Інтактні (права півкуля)	422±11	425±15	20,78±0,24	20,83±0,17	3,32±0,08	3,33±0,06
Інтактні (ліва півкуля)	414±22	417±17	20,11±0,15	20,23±0,19	3,35±0,06	3,34±0,05
Контроль (права півкуля)	398±11	421±14	20,84±0,27	22,31±0,16	3,07±0,02	3,1±0,06
Контроль (ліва півкуля)	383±13	402±9	19,87±0,21	21,25±0,23	3,01±0,05	3,08±0,03
Ішемія + аміналон (права півкуля)	446±13*	508±11*	20,9±0,17	24,7±0,24*	4,09±0,08*	4,11±0,05*
Ішемія + аміналон (ліва півкуля)	438±18*	487±16*	20,3±0,12	23,4±0,21	3,96±0,05	4,08±0,04
Ішемія + пікамилон (права півкуля)	497±15*	511±13*	22,54±0,27*	25,68±0,23*	3,14±0,07*	3,16±0,04*
Ішемія + пікамилон (ліва півкуля)	489±12*	497±17*	22,08±0,16	25,33±0,19	3,12±0,06	3,18±0,07

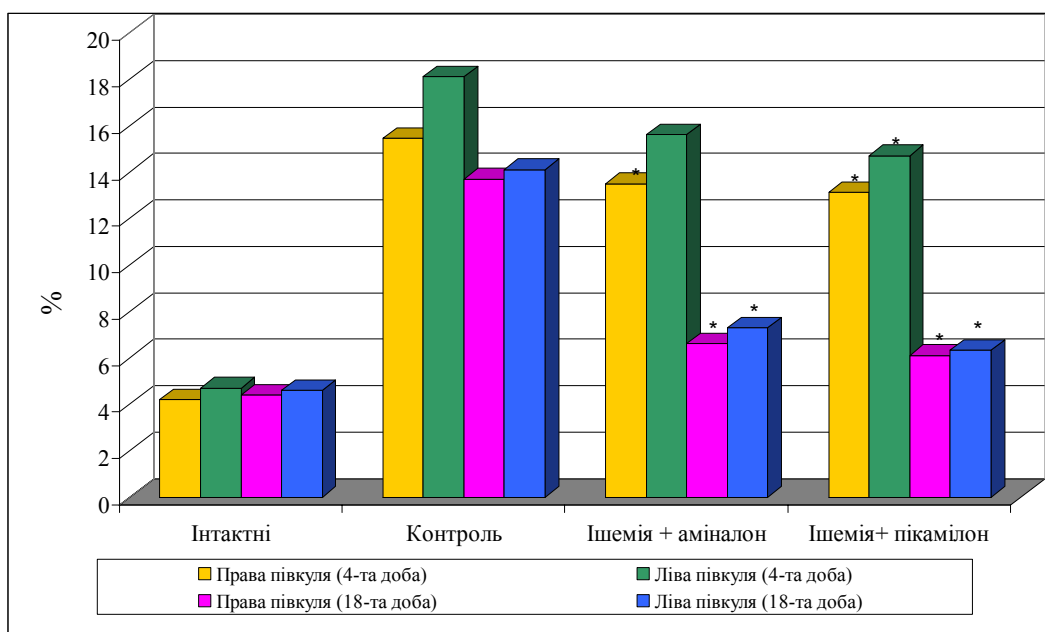


Рис. 1. Частка апоптотичних нейронів кори головного мозку в різні терміни ішемії при застосуванні церебропротекторів.

За нашими даними, в умовах гострої ішемії (на 4 добу) спостерігається значне падіння кількості c-fos-позитивних клітин (що узгоджується зі зниженням РНК в ці строки та підтверджує вплив препаратів на процеси протеїн-синтезу), к 18 добі спостерігається відновлення кількості c-fos в нейронах IV-V шару сенсомоторної зони кори (рис.3-5). Так, збільшення вмісту c-fos від-

бувалося на тлі переважання загибелі клітин за типом апоптоза, а зниження веде до посилення загибелі за типом некрозу (Oliveira L. et al., 1999; Gladilin S. et al., 2000; Chan W., Yu S., 2002). У відновний період відбувається адаптація клітини і перемикавання загибелі з шляху некрозу на апоптоз і зниження останнього (рис.1, табл.3).

Таблиця 3

Щільність апоптотичних та деструктивно змінених клітин IV-V шарів кори головного мозку щурів з експериментальною ішемією при застосуванні ноотропів

Експериментальні групи	Щільність клітин на 1 мм ²	
	4-та доба	18-та доба
Інтактні (права півкуля)	112±7	112±11
Інтактні (ліва півкуля)	108±9	110±7
Контроль (права півкуля)	297±15	294±18
Контроль (ліва півкуля)	281±10	276±16
Ішемія + аміналон (права півкуля)	427±19*	172±11*
Ішемія + аміналон (ліва півкуля)	419±14*	156±15*
Ішемія + пікамілон (права півкуля)	439±18*	164±10*
Ішемія + пікамілон (ліва півкуля)	424±13*	153±11*

Аміналон не впливав на кількість c-fos-позитивних клітин, не мав міжпівкульових відмінностей. Виходячи з вищезазначеного, аміналон в гострий період мозкового інсульту не володів нейропротективним ефектом, але у віддалені терміни мозкового інсульту вже можна відслідкувати його плив на відновлення нервової тканини.

У другій серії – дослідях з курсовим призначенням пікамілону на тлі гострого порушення мозкового кровообігу має місце більш вагома різниця міжпівкульових співвідношень та сила дії на зміни характеристик нервових клітин в цілому. Так, нами була відмічена більша тропність препарату до нейронів правої гемісфери за показниками щільності та площі тіл нейронів (табл.1). Важливо відмітити вплив пікамілону на гліальний ланцюг нервової тканини - підвищення щільності та площі гліальних клітин, а також значне підвищення вмісту РНК було вже на 4-ту добу експерименту. При цьому нами не зареєстровано

суттєвих міжпівкульових відмінностей при застосуванні пікамілону. В групі тварин, котрим проводилось лікування пікамілоном, відмічено, що препарат переводить деструкцію нервових клітин на апоптотичний тип головним чином за рахунок правої гемісфери, та, відповідно, гальмує загибель нейронів к 18 добі (рис.1). За імуногістохімічними показниками (за вмістом c-fos - позитивних нейронів) на фоні введення пікамілону більш суттєві зміни відбуваються в тканинах правої півкулі (рис.2), що допомагає вирівняти між півкулями та знизити до 18 доби явища апоптоза.

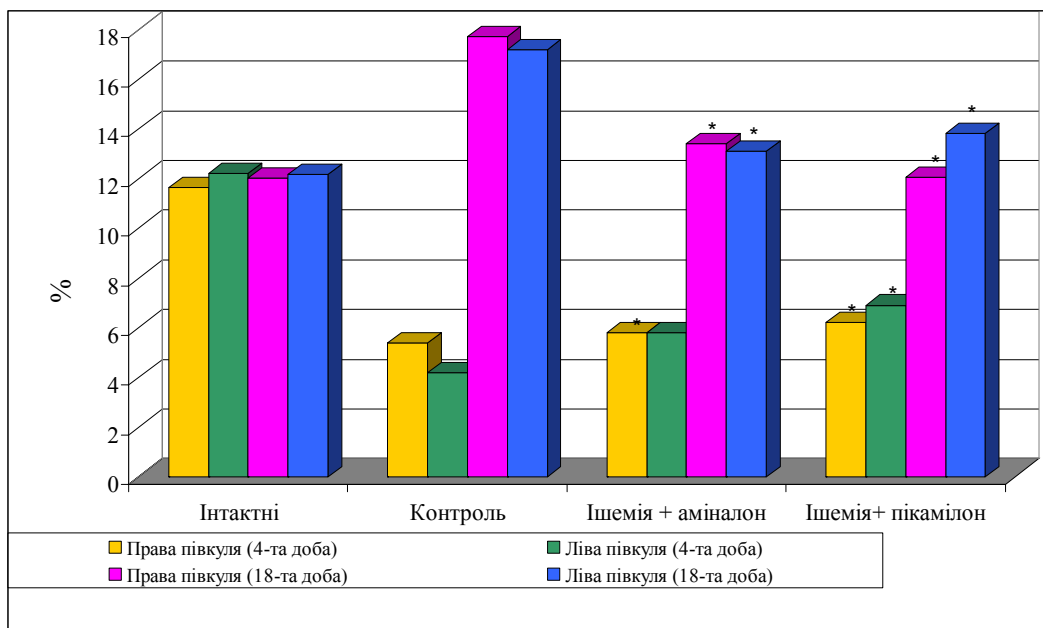


Рис. 2. Вміст Fos-імунопозитивних нейронів в зоні ішемії мозку в ранній та відновний період ішемічного інсульту.



Рис. 3. Флюоресценція Fos-позитивних нейронів в тканинах мозку щурів інтактної групи. $\times 100$.

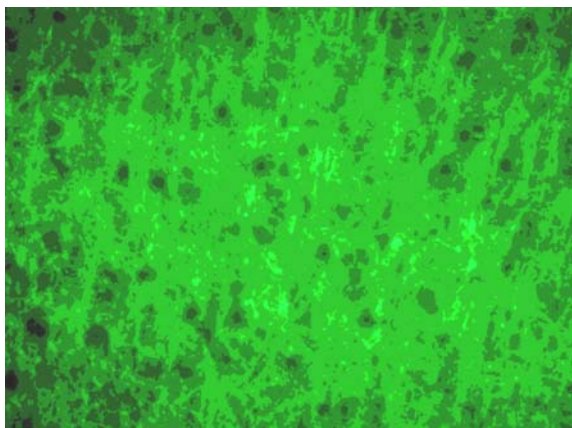


Рис.4. Флюоресценція Fos-позитивних нейронів зони ішемії мозку в контрольній групі тварин на 18 добу ішемії. $\times 100$.

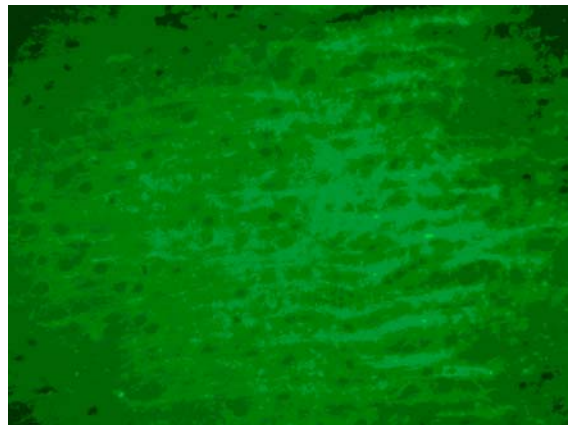


Рис. 5. Флюоресценція Fos-позитивних нейронів мозку тварин з ішемією на тлі 18-денного застосування церебропротекторів. $\times 100$.

Висновки

Моделювання гострого порушення мозкового кровообігу за ішемічним типом у щурів шляхом двобічної оклюзії загальних сонних артерій супроводжується характерними білатеральними морфофункціональними змінами в нервовій тканині.

Відмічається наявність впливу на процеси протеїн-синтезу та нейропротективної дії пікамілону у ранні терміни ішемії мозку.

Виявлена тенденція до більш активного по-

кращення показників відновлення нервової тканини правої гемісфери під впливом пікамилону, в значно меншому ступені - аміналону. Також відмічена відсутність міжпівкульових розбіжностей відновлення нервової тканини мозку в пізніші терміни ішемічного інсульту, що може бути пов'язано з існуванням деяких систем мозку, які можуть нівелювати латералізацію впливу фармакологічних препаратів за певний період часу, або перерозподіляти його належним чином.

Подяка

Автори висловлюють подяку за консульта-

тивну допомогу завідувачу кафедри фармакології Запорізького державного медичного університету професору І.Ф.Беленичеву.

Перспективи подальших розробок

Важливим питанням сьогодення є оптимізація лікування неврологічних захворювань півкульової локалізації, в терапії яких застосовуються ноотропи. Наведені дані є частиною досліджень по встановленню наявності або відсутності латералізації дії ноотропних засобів та потребують подальших наукових та дослідницьких підтверджень, які планується знайти.

Літературні джерела

Артеріальні аневризми і артеріовенозні мальформації головного мозку: Учебний посібник / Дзяк Л.А., Зорін М.О., Голик В.А., Скребець Ю.Ю.- Дніпропетровськ: Пороги, 2003.- 137 с.

Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга.- М.: Медицина, 2001.- 328с.

Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология.- М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003.- 544 с.

Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Кожемякін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайретдінова Т.А.- Київ, 2002.- 155 с.

Пирс Э. Гистохимия.- М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1962.- 962 с.

Сосудистые заболевания головного мозга / Одинак М.М., Михайленко А.А., Иванов Ю.С., Семин Г.Ф.- СПб.: Гиппократ, 1998.- 160 с.

Фармакологическая нейропротекция постинсультных повреждений нейронов сенсорной зоны фронтальной коры и гиппокампа у крыс / Беленичев И.Ф., Сидорова И.В., Дунаев В.В. и др. // Эксперим. и клинич. фармакол.- 2006.- Т.69, №5.- С.11-15.

Chan W.N., Yu S.S. Resistans to exitotoxin-induced seizures and neuronal death //Biochem. J.- 2002.- Vol.351, №3.- P.221-232.

Elevated circulating levels of caspases activity in sever cerebral pathology. Time course of ICAM-1 expression and leucocy subset infiltration in rat forebrain ischemia / Gladilin S., Bidmon H.S., Divanaeh A. et al. // Arch. Biophys.- 2000.- Vol.380, №2.- P.237-242.

Oliveira L., Bouton C., Drapier J.C. Focal cerebral ischemia in rat and apoptosis mechanisms // Biol. Chem.- 1999.- Vol.274.- P.516-521.

Журавель Н.В., Мамчур В.И. Комплексная характеристика морфологических изменений нервной ткани в условиях экспериментальной ишемии головного мозга на фоне применения ноотропных препаратов.

Резюме. В опытах на белых крысах- самцах линии Вистар изучены различия в действии ноотропов на правое и левое полушария мозга путём проведения нейроморфометрического анализа с использованием иммуногистохимических методик на модели острого нарушения мозгового кровообращения. Патология моделировалась билатеральной перевязкой общих сонных артерий у крыс. На 4 и 18 сутки ишемии изучалось морфофункциональное состояние нейронов, глии, содержание РНК в них, доля апоптотических и деструктивно изменённых клеток, а также количество с-Fos- иммунопозитивных нейронов. Установлены некоторые различия во влиянии ноотропов на восстановление нервной ткани правой и левой гемисферы. Сделаны выводы о превосходящем нейропротекторном действии пикамилона по сравнению с аминалоном. А также выявлена тенденция к более раннему восстановлению нервной ткани правой гемисферы под влиянием пикамилона, в меньшей степени – аминалона. Полученные данные могут быть использованы при разработке рациональных схем лечения патологии мозга с полушарной локализацией.

Ключевые слова: экспериментальная ишемия головного мозга, ноотропы, нейроморфометрия, межполушарные различия.