

УДК [616.831-001.3/4-092]:615.214.2

**ДИНАМИКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
В ТКАНИ МОЗГА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ
НА ФОНЕ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ**

Э.М. Мамытова, Т.К. Кадыралиев, Э.К. Жолдошев

Представлены результаты экспериментального исследования, целью которого являлось изучение влияния Церебролизина на патоморфологические изменения структур мозга в посттравматическом периоде.

Ключевые слова: Церебролизин; черепно-мозговая травма; патоморфологические нарушения; структуры мозга.

**DYNAMICS OF BRAIN MORPHOFUNCTIONAL CHANGES
AFTER NEUROPROTECTIVE THERAPY IN TRAUMATIC BRAIN INJURY**

E.M. Mamytova, T.K. Kadyraliev, E.K. Dzholdoshev

There are presented the results of experimental research aimed at study the influence of Cerebrolysin on pathological changes of brain structure in posttraumatic period.

Key words: Cerebrolysin; traumatic brain injury; brain structure; pathological changes.

Актуальность. Травматические повреждения головного мозга, являются одной из лидирующих причин смертности и инвалидизации лиц молодого и среднего возраста, что делает их социальной и экономической проблемой в мире и, в частности в Кыргызстане. Частота черепно-мозговой травмы (ЧМТ) в разных странах колеблется от 2 до 4,5 на 1000 населения, а смертность – от 8 до 11–12 на 100000 населения. В нашей республике эти цифры находятся в верхних пределах (4 и 11 соответственно) [1, 2].

Курс лечения ЧМТ зависит не только от степени повреждения, но и от типа и тяжести вторичных интра- и экстракраниальных поражений (например, вызванных инфекцией или гипоксией), которых, по сути, можно избежать. Таким образом, снижение частоты осложнений и смертности при тяжелой ЧМТ может быть достигнуто путем предотвращения вторичных поражений головного мозга с помощью адекватного лечения и соответствующего ухода.

Одной из терапевтических стратегий в терапии ЧМТ является ограничение распространенности первичного поражения, раннее определение возможных вторичных осложнений, их предотвращение и лечение. Необходимые терапевтические мероприятия для данной стратегии могут быть охарактеризованы как нейропротекторные.

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 [3–8]. Терапия травматического повреждения мозга должна быть максимально ранней, активной и должна рассматриваться как комплексная церебропротекторная стратегия [9, 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 препаратов, обладающих нейропротекторными свойствами, является Церебролизин. Его мультимодальное нейроспецифическое действие установлено в экспериментальных исследованиях, а клиническая эффективность препарата подтверждена в ходе проспективных рандомизированных двойных слепых клинических испытаний [11–16]. Экспериментальные данные позволяют предположить, что Церебролизин способен увеличивать плотность синапсов и индуцировать нейрогенез в области гиппокампа [15–18], при этом у экспериментальных животных отмечено существенное

улучшение выполнения тестов, оценивающих мнестические функции и навыки к обучению.

Данный препарат был допущен к применению во многих странах. Высокая частота ЧМТ, высокий уровень смертности и большое количество посттравматических явлений на фоне высокой стоимости терапии обуславливает необходимость введения новых эффективных терапевтических стратегий. Изучение терапии с использованием Церебролизина при ЧМТ представляет интерес, поскольку препарат хорошо переносится и эффективен при ряде других заболеваний.

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 исследования. Эксперименты выполнены на 72 беспородных половозрелых белых крысах массой от 180 до 220 г в стандартных условиях вивария с учетом требований к работе с экспериментальными животными. В ходе эксперимента соблюдались все правила работы с лабораторными животными (приказ МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 года «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»).

Для моделирования ЧМТ применяли пружинный ударник, который экспериментальным путем (по последствиям) откалиброван для нанесения крысам легкой, среднетяжелой и тяжелой ЧМТ.

В момент нанесения травмы животное временно прижимали к поролоновой прокладке, чем добивались горизонтального расположения поверхности свода черепа. Животным с помощью ударника наносили легкую, среднетяжелую и тяжелую ЧМТ в теменно-затылочной области правого полушария головного мозга.

1. При легкой ЧМТ (12 крыс) после нанесения удара крысы, как правило, впадали в легкое бессознательное состояние в течение промежутка времени до 30 секунд или сознание вообще не нарушалось. В течение нескольких минут крысы оставались заторможенными, дезориентированными, вялыми. Затем, в течение первого часа их состояние улучшалось.

2. При среднетяжелой ЧМТ (12 крыс) после нанесения удара крысы падали на бок с выпрямленными конечностями и отмечались тонико-клонические судороги продолжительностью 10–30 сек, наблюдалось бессознательное состояние в течение промежутка времени от 30 сек до 3 минут. Затем крысы поднимались, в половине случаев

имел место левосторонний гемипарез. В течение нескольких минут крысы оставались заторможенными, дезориентированными, вялыми. Затем, в течение первых суток их состояние улучшалось.

3. При тяжелой ЧМТ (12 крыс) животные тяжело переносили полученную травму. В момент нанесения черепно-мозговой травмы в 25 % случаев отмечалась кратковременная остановка дыхания. У 20 % животных наблюдались непровольные акты дефекации и мочеиспускания. В 21 % случаев после травмы наблюдались тонико-клонические судороги, отсутствовали корнеальные и роговичные рефлексы, в 27 % случаев отмечалось угнетение дыхания вплоть до полной остановки. У 90 % животных наблюдалась очаговая симптоматика в виде левостороннего гемипареза. У выживших животных наблюдалось глубокое нарушение сознания от нескольких минут до нескольких часов. Затем у выживших животных в течение первых трех суток их состояние постепенно улучшалось.

В качестве контроля служили крысы с аналогичными параметрами черепно-мозговой травмы (36 крыс).

Для гистологического исследования мозг после декапитации осторожно извлекали из полости черепа, макроскопически оценивали состояние мозговых оболочек, рельефа, наличие кровоизлияний, локализацию видимых очагов ушиба.

Животным контрольной группы в течение 10 дней один раз в день утром внутрибрюшинно (в/б) вводили 0,1 мл 0,9%-ного физиологического раствора. Животным основной группы (n = 12) с ЧМТ в течение тех же 10 дней в/б вводили Церебролизин в дозе 0,1 мл (Ever Neuro Pharma, Австрия) так же, как и животным контрольной группы 1 раз в день утром. Церебролизин вводился через 30 минут после нанесения травмы.

Мозг забирали у контрольных крыс и крыс экспериментальной группы через 1, 7, 14 и 21 сутки после травмы. Забой животных осуществляли внутрибрюшинным введением тиопентала натрия (100 мг/кг).

Извлеченный из полости черепа целый мозг фиксировали в 20%-ном растворе формалина. Из фиксированного мозга вырезали фронтальные блоки, которые обрабатывали по стандартной методике. Из полученных блоков готовили серийные срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином. Окрашенные препараты просматривали на светооптическом микроскопе «Zeiss» (Германия). Для электронно-микроскопического исследования после умерщвления животных (в течение 5 минут) забирали кусочки ткани головного мозга из поврежденного и контрлатерального полушарий. Кусочки ткани фиксировали

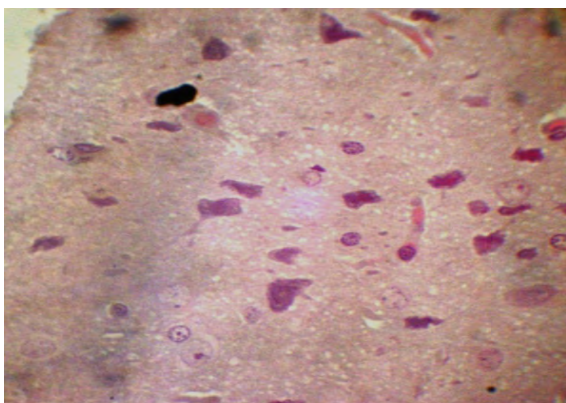


Рисунок 1 – Кора головного мозга крысы. ЧМТ тяжелой степени. 21-е сутки. Контроль (без лечения). Нейроны с темно-окрашенной цитоплазмой, уменьшены в размере. Ядра нейронов с выраженной конденсацией хроматина. Клетки глии сохранены. Полутонкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 480$

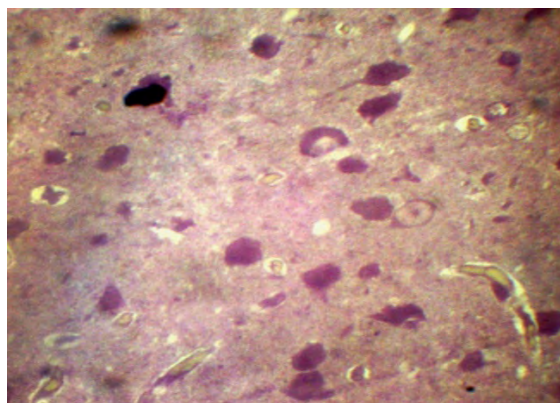


Рисунок 2 – Кора головного мозга крысы. ЧМТ тяжелой степени. 21-е сутки. Основная группа (Церебролизин). Нейроны имеют более светлую цитоплазму с четко выраженными ядрами. Структура астроцитов и клеток глии сохранена. Полутонкий срез. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 480$

в 2,5%-ном растворе глутаральдегида с последующей фиксацией в 1%-ном растворе осмиевой кислоты на фосфатном буфере при pH 7,4. Материал обезживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в аралдит. Из эпоксидных блоков готовили ультратонкие срезы на ультратомах "TeslaBS-490" и ХКВ (Швеция). Ультратонкие срезы после контрастирования цитратом свинца и уранилацетатом просматривали на электронном микроскопе ПЭМ-100. Для прицельного ультрамикротомирования и углубленной оценки процессов, происходящих в ткани мозга, из эпоксидных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, которые окрашивали толуидиновым синим и гематоксилин-эозином и просматривали их на светооптическом микроскопе.

Результаты исследования и их обсуждение.

У крыс, перенесших черепно-мозговую травму, с 1 по 21 сутки на значительном протяжении мозга обнаруживалось отслоение мягких мозговых оболочек, их набухание за счет скопления массы эритроцитов. По ходу мягких мозговых оболочек выявлялись субарахноидальные кровоизлияния.

При светооптическом морфологическом исследовании фронтальных срезов коры мозга у крыс оценивали реактивные, дистрофические, некротические, компенсаторно-восстановительные явления и признаки апоптоза (программированной клеточной смерти – ПКС).

У животных с тяжелой ЧМТ, не получавших лечение Церебролизинем на протяжении всего изученного посттравматического периода (1–21 сутки) преобладали дистрофические изменения нейронов

(острое набухание нейронов, гидропическая дистрофия нервных клеток с умеренной вакуолизацией цитоплазмы, очаговый и тотальный хроматолиз, гиперхроматоз и гомогенизация цитоплазмы).

Вокруг очагов травматического повреждения и в отдаленных отделах вещества мозга имели место следующие изменения: вакуолизация и расширение периваскулярных и перинейрональных пространств, которые отражали явления диффузного отека мозга.

Признаки гидропического набухания выявляли также в цитоплазме астроцитов и олигодендроцитов.

Кроме того, на всем протяжении ткани головного мозга обнаруживались признаки расширения сосудов микроциркуляторного русла с наполнением их форменными элементами крови.

В большинстве нейронов дистрофические изменения выражались в виде гомогенизации и сморщивания цитоплазмы, редукции отростков, гипохромии ядер с краевой конденсацией хроматина (рисунок 1).

Морфологическое исследование ткани мозга животных на фоне лечения Церебролизинем на 14–21-е сутки по сравнению с нелечеными животными показало, что структурные изменения были менее выраженными, мягкие оболочки мозга сохраняли обычное строение, лишь местами имелось их небольшое отслоение с пропитыванием незначительным количеством эритроцитов. Общая микроструктура коры и вещества мозга сохраняла характерную архитектонику. При отсутствии распространенных очагов деструкции и геморрагического



Рисунок 3 – Кора головного мозга крысы. ЧМТ среднетяжелой степени. Контроль (без лечения). 1-е сутки. Нейрон имеет ядро и цитоплазму повышенной электронной плотности. Отмечается образование крупных гидропических вакуолей в нейропиле астроцита с конденсированным и диффузным хроматином. В нейропиле видны миелинизированные аксоны. Электроннограмма. Негатив. Увеличение $\times 10000$

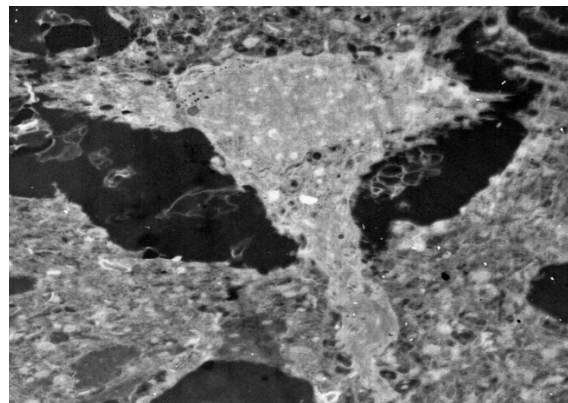


Рисунок 4 – Кора головного мозга крысы. ЧМТ среднетяжелой степени. 7-е сутки. Контроль (без лечения). Нейрон имеет темно-окрашенное ядро и цитоплазму. Отмечается вакуолизация цитоплазмы. Ядро нечетко выражено. Хроматин конденсирован. Вокруг нейрона и в нейропиле имеются крупные вакуоли с электронно-плотным содержимым. Электроннограмма. Негатив. Увеличение $\times 10000$

инфартирования лишь местами обнаруживались небольшие очаги размягчения вещества мозга. Но тем не менее, встречались нейроны с гиперхромией ядер и гомогенизацией цитоплазмы, что отражает наличие признаков апоптоза (рисунок 2).

Электронно-микроскопическое исследование показало, что при среднетяжелой ЧМТ, начиная с первых по 7-е сутки в значительной части нейропиля отмечаются гидропические вакуоли (рисунки 3, 4).

В значительной части нейронов наблюдались выраженные изменения внутриклеточных оргanelл в виде деструкций митохондрий, вакуолизации эндоплазматического ретикулума, уменьшения свободных и фиксированных рибосом, отражающие снижение белоксинтезирующей и энергопродуцирующей функций нервных клеток у животных, получавших лечение Церебролизином.

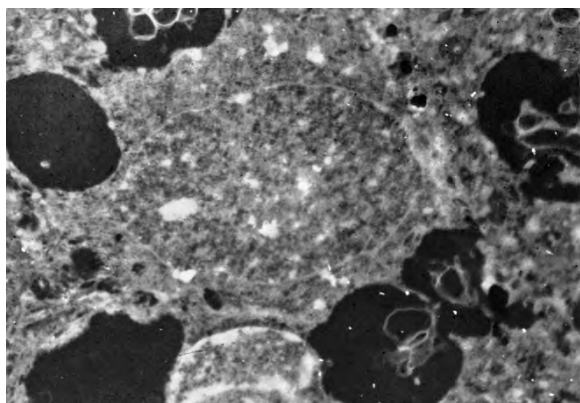


Рисунок 5 – Кора головного мозга крысы. ЧМТ среднетяжелой степени. 21-е сутки. Основная группа (Церебролизин). Отмечается увеличение количества рибосом в цитоплазме нейрона. Ядро с диффузным хроматином и отчетливо выраженным ядрышком. Электроннограмма. Негатив. Увеличение $\times 10000$

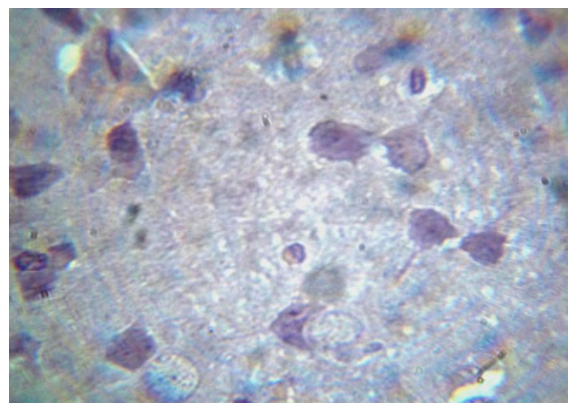


Рисунок 6 – Кора головного мозга крысы. ЧМТ средней степени. 14-е сутки. Контроль (без лечения). Ядра нейронов четко выражены. Диффузный и конденсированный хроматин без заметных изменений. Олигодендроциты и клетки глии без заметных изменений. Полутоновый срез. Окраска толуидиновым синим. Увеличение $\times 480$

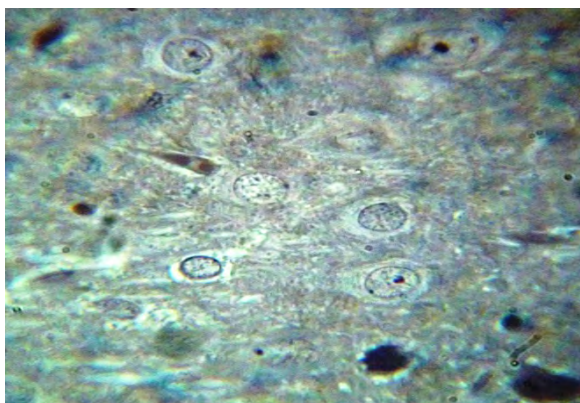


Рисунок 7 – Кора головного мозга крысы. ЧМТ легкой степени. 7-е сутки. Основная группа (Церебролизин). Нейроны с хорошо выраженными ядрами и ядрышками. Клетки глии сохранены. Интерстициальный отек вещества мозга выражен незначительно. Окраска толуидиновым синим. Увеличение $\times 480$

Уже на 14–21-е сутки после травмы в значительной части нейронов наблюдали процессы регенеративной репарации различной степени выраженности. Отмечались гиперплазия аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума, активация рибосом и полисом, увеличение количества митохондрий. Наиболее активные процессы репаративной регенерации наблюдали в контрлатеральном полушарии и в зонах восстановления внутримозгового кровообращения (рисунок 5).

У животных со средней тяжестью ЧМТ без лечения имелись структурные изменения в нейронах, которые были менее выраженными по сравнению с животными с тяжелой степенью ЧМТ. У животных после лечения Церебролизином явления регенерации отмечались на 14-е сутки (рисунок 6).

При легкой степени ЧМТ структурные изменения в нейронах были незначительно выражены. У животных, получавших Церебролизин, явления репаративной регенерации отмечались начиная с 7-х суток (рисунок 7).

Проведенные патоморфологические исследования показали, что лечение Церебролизином у экспериментальных животных с различной степенью тяжести ЧМТ в ранние сроки оказывает протекторное действие на сосудистую систему и паренхиму мозга, предотвращая образование зон вторичной дезинтеграции в травмированном мозге. Они выражались в уменьшении признаков повышения проницаемости стенки капилляров и повреждения структуры нейроцитов ткани мозга. Оценка эффективности использованного метода лечения Церебролизином основана на анализе морфометрических изменений в головном мозге в ответ на экспериментальную че-

репно-мозговую травму. В этих условиях излившаяся кровь и механическое повреждение поверхности мозга обуславливает возникновение воспалительных некротических изменений, завершающихся глиозом и формированием кистозных полостей [2]. Кроме того, через некоторое время после ЧМТ отмечается гибель нейронов в значительном удалении от места первичной травмы [3]. Исследования последних десятилетий показали, что вторичные повреждения нейронов обусловлены апоптозом этих клеток, т. е. морфологическими проявлениями процесса программированной клеточной гибели (ПКС). ПКС в нейронах, удаленных от очага первичного повреждения, подтверждает важную роль апоптоза в формировании вторичного повреждения и дисфункции мозга после экспериментальной ЧМТ [7, 9, 10].

Результаты наших исследований показывают, что применение Церебролизина у экспериментальных животных при ЧМТ способно предотвратить прогрессирование и углубление повреждений мозга, обеспечивая регресс как структурных изменений, так и обусловленных ими функциональных нарушений.

Выводы

1. Показано, что в результате лечения Церебролизином у крыс с ЧМТ объем некротических изменений и количество дистрофированных нейронов и клеток глии в коре травмированного полушария меньше, чем у контрольных крыс, не получавших лечения нейропротектором.

2. Наряду с деструктивными процессами в посттравматическом периоде продолжают протекать репаративные процессы, которые более активно протекали в основной группе. Репарация частично пораженного нейрона, глиальных клеток и аксона осуществляется путем внутриклеточной регенерации. В основе усиленного функционирования этих систем лежат гипертрофия нейронов и гиперплазия глии.

Литература

1. Мамытов М.М. Оптимизация способов хирургического лечения травматической назальной ликворреи / М.М. Мамытов, К.Т. Мендибаев // Наука и новые технологии. 2001. № 3. С. 60–61.
2. Caroli M., Locatelli M., Campanella R. Multiple intracranial lesions in head injury: clinical considerations, prognostic factors, management, and results in 95 patients // *Surgical Neurology*. 2001 Aug; 56 (2): 82–88.
3. Donkin J.J., Vink R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments // *Curr. Opin. Neurol.* 2010; 23 (3): 293–299.
4. Erzigkeit H. SKT, ein Kurztest zur Erfassung von Gedächtnis und Aufmerksamkeitsstörungen. Manual. 4. Aufl. Beltz, Weinheim, 1989.

5. Golden Z., Golden C.J. Impact of brain injury severity on personality dysfunction // *Int J Neurosci* 2003; 113:733–45.
6. Markgraf C.G., Velayo N.L., Johnson M.P., McCarty D.R., Medhi S., Koehl J.R., Chmielewski P.A., Linnik M.D., Clemens J.A. Six-hour window of opportunity for calpain inhibitors in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1998; 29: 152–8.
7. Meierhans R., Bechir M., Ludwig S. et al. Brain metabolism is significantly impaired at blood glucose below 6 mM and brain glucose below 1 mM in patients with severe traumatic brain injury // *Crit. Care*. 2010; 14 (1): R 13.
8. National Institute of Mental Health. 12-CGI. Clinical global impressions. In: Guy W (ed.). *EDCEU Assessment in psychopharmacology*. Rev ed. Chevy Chase, Rockville, Maryland, 1970; 217–22.
9. Overall J.E., Schaltenbrand R. The SKT neuropsychological test battery // *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1992; 5:220–7.
10. Ponsford J., Olver J., Ponsford M., Nelms R. Long-term adjustment of families following traumatic brain injury where comprehensive rehabilitation has been provided. *Brain Inj* 2003; 17: 453–68
11. Pretto Flores L., De Almedia C.S., Casulari L.A. Positive predictive values of selected clinical signs associated with skull base fractures // *J Neurosurg Sci*, 2000 Jun; 44 (2): 77-82.
12. Sosin D.M., Sniezek J.E., Thurman D.J. Incidence of mild and moderate brain injury in the United States, 1991. *Brain Inj* 1996; 10: 47–54.
13. Stahel P.F., Smith W.R., Moore E.E. Hypoxia and hypotension, the “lethal duo” in traumatic brain injury: implications for prehospital care // *Intensive Care Med*. 2008; 34(3): 402–404.
14. Timofeev I., Carpenter K.L., Nortje J. et al. Cerebral extracellular chemistry and outcome following traumatic brain injury: a microdialysis study of 223 patients // *Brain*. 2011; 134 (Pt 2): 484–494.
15. Vilalta A., Sahuquillo J., Merino M.A. et al. Normobaric hyperoxia in traumatic brain injury: does brain metabolic state influence the response to hyperoxic challenge? // *J. Neurotrauma*. 2011; 28 (7): 1139–1148.
16. Wagner A.K., Bayir H., Ren D., Puccio A., Zafonte R.D., Kochanek P.M. Relationships between cerebrospinal fluid markers of excitotoxicity, ischemia, and oxidative damage after severe TBI: the impact of gender, age, and hypothermia // *J. Neurotrauma*. 2004; 21 (2): 125–136.
17. Walcott B.P., Kahle K.T., Simard J.M. Novel treatment targets for cerebral edema // *Neurotherapeutics*. 2012; 9 (1): 65–72.
18. Xu Y., McArthur D.L., Alger J.R. et al. Early nonischemic oxidative metabolic dysfunction leads to chronic brain atrophy in traumatic brain injury // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2010; 30 (4): 883–894.