



ЛИТЕРАТУРА

1. Ерюхин И.А. Хирургия гнойного перитонита / И.А. Ерюхин // Consilium Medicum (Хирургия). – 2008. – № 1. – С. 43-48.
2. Плоткин И.И. Релапаротомия у пациентов с разлитым гнойным перитонитом, аспекты агрессивности / И.И. Плоткин // Вестник хирургии. – 2008. – № 3. – С. 11-14.
3. Arioli D. Bile peritonitis: a case report and a review of literature about postcholecystectomy damages / D. Arioli, E. Amateis, C. Morandi et al. // Recenti Prog. Med. – 2005. – Vol. 96, № 7-8. – P. 357-61.
4. Савельев В.С. Программируемая релапаротомия в лечении распространенного перитонита / В.С. Савельев, М.И. Филимонов, Г.В. Подачин // Анналы хирургии. – 2004. – № 2. – С. 42-48.
5. Пахомова Г.В. Динамика накопления и связывания продуктов эндогенной интоксикации при распространенном перитоните в ранний послеоперационный период / Г.В. Пахомова, П.П. Голиков, С.Б. Матвеев и др. // Вестник интенсивной терапии. – 2003. – № 1. – С. 34-36.
6. Anaya D.A. Risk factors for severe sepsis in secondary peritonitis / D.A. Anaya, A.B. Nathens // Surgical Infections. – 2003. – Vol. 4. – No 4. – P. 335-362.
7. Багненко С.В. Оценка регионарной микроциркуляции кишечника при воспалительных заболеваниях матки и придатков, осложненных разлитым перитонитом / С.В.Багненко, Б.В.Аракелян, Н.Н.Рухляда и др. // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2006. – № 2. – С. 27-31.
8. Власов А.П. Системный липидный дистресс-синдром в хирургии/А.П. Власов, В.А. Трофимов, В.Г. Крылов. – М.: Наука, 2009. – 224 с.
9. Хрупкин В.И. Синдром энтеральной недостаточности у больных с распространенным перитонитом: оценка степени тяжести и исхода процесса / В.И. Хрупкин, С.А. Алексеев // Вестник хирургии. – 2004. – Т. 163. – № 2. – С. 46-49.
10. Петросян Э.А. Влияние комплексного применения натрия гипохлорита и α -токоферола на состояние про- и антиоксидантной систем крови при экспериментальном перитоните / Э.А. Петросян, В.И. Сергиенко, А.А. Сухинин и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 139. – № 4. – С. 391-394.

ПОСТУПИЛА 13.11.2014

УДК: 615.21:616.831-005.4

Е.В. Ганцгорн, Д.П. Хлопонин, П.А. Хлопонин

МОРФО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ НООТРОПОВ И МЕЛАКСЕНА ПРИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

Ростовский государственный медицинский университет

Кафедра фармакологии и клинической фармакологии,

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии

Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: gantsgorn@inbox.ru.

Цель: с помощью морфо-фармакологического анализа оценить эффекты ноотропов, в том числе в комбинации с мелаксеном, у крыс с экспериментальной острой ишемией головного мозга.

Материалы и методы: проведен комплексный морфологический (свето-, электронномикроскопический и морфометрический) анализ экспериментального материала (фронтальная кора и гиппокамп), а также изучена летальность на 21 белой крысе с индуцированной посредством двусторонней перевязки общих сонных артерий острой церебральной ишемией и прошедших превентивный курс приема ноотропов (винпоцетин, пирацетам) и мелаксена.

Результаты: превентивное применение комбинации винпоцетина с мелаксеном значительно уменьшает летальность животных и выраженность ишемического повреждения головного мозга, свидетельствуя, таким образом, об очевидной нейропротекторной активности применявшихся препаратов.

Выводы: полученные результаты говорят в пользу потенциальной значимости использования лекарственных препаратов мелатонина для расширения возможностей нейропротекторной терапии при церебральной ишемии.

Ключевые слова: церебральная ишемия, нейропротекция, ноотропы, мелаксен, ультраструктура.



E.V. Gantsgorn, D.P. Khloponin, P.A. Khloponin

NOOTROPICS AND MELAXEN' NEUROPROTECTONAL ACTIVITY MORPHOPHARMACOLOGICAL ANALYSIS IN RATS' ACUTE CEREBRAL ISCHEMIA

*Rostov State Medical University,
Pharmacology and Clinical Pharmacology Department,
Histology, Cytology and Embryology Department
29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: gantsgorn@inbox.ru*

Purpose: on the base of complex morpho-pharmacological analysis to evaluate nootropics and its combinations with melaxen effects in rats experimental acute cerebral ischemia.

Materials and methods: morphological (light-, electron microscopic and morphometric) analysis of the experimental material (frontal cortex and hippocampus) and lethality was studied on 21 white rats with induced by the ligation of bilateral common carotid arteries of acute cerebral ischemia and used a preventive course of nootropics (vinpocetine, piracetam) and melaxen.

Results: it was established that preventive combined vinpocetine and melaxen usage significantly reduces rat's lethality and brain ischemic damage degree, indicating obvious neuroprotective activity.

Summary: the results obtained indicate significant potential importance of melatonin-based drugs usage for neuroprotection therapy improvement in cerebral ischemia.

Keywords: cerebral ischemia, neuroprotection, nootropics, melaxen, ultrastructure.

На сегодняшний день из-за значительной распространенности и тяжелых последствий для состояния здоровья населения сосудистые заболевания головного мозга (ГМ) представляют собой одну из важнейших медико-социальных проблем [1]. В связи с этим разработка методов защиты ГМ от повреждающего воздействия ишемии является приоритетным направлением современной фармакологии.

Особый интерес для лечения нейродеструктивных заболеваний ГМ представляет гормон эпифиза мелатонин, обладающий выраженным и проявляющимся повсеместно в организме (так как способен проникать во все органы и ткани) антиоксидантным действием [2, 3]. Потенциально велика роль мелатонина и в осуществлении защиты ГМ от инсульта [4]. Следует подчеркнуть, что ишемические повреждения, а равно и протекторное действие гормона распространяются, в первую очередь, на структуры ГМ, участвующие в организации познавательной деятельности [5].

Для полноценного анализа патологических изменений в органах и тканях животных, подвергшихся воздействию различных аверсивных факторов, в том числе ишемической природы, а также в целях объективизации оценки нейропротекторной активности лекарственных препаратов (ЛП) обязательным является проведение комплексного фармакологического (в т.ч. морфологического) анализа [6, 7].

Цель исследования - изучить посредством световой и электронной микроскопии эффекты пирacetama, винпoцетина, мелатонин-содержащего ЛП мелаксена и их комбинаций при экспериментальной ишемии ГМ (ЭИГМ) у крыс.

Материалы и методы

Исследование выполнено на крысах-самцах (21) массой 250–300 г. За 14 дней до моделирования ИГМ живот-

ные были разделены на группы (гр.) контроля (ложноперированные (гр. ЛО) и подвергшиеся ИГМ (гр. ИШ)), получавшие физиологический раствор в дозе 0,2 мл/сут внутривенно (в/в), и 5 опытных гр., которым производилась ИГМ путем двухсторонней окклюзии общих сонных артерий (ОСА) по окончании 2-х недельного курса введения изучаемых ЛП: мелаксена в дозе 0,25 мг/кг/сут в/б; пирacetama в дозе 300 мг/кг/сут в/б и винпoцетина в дозе 5 мг/кг/сут в/б, а также их комбинаций с мелаксеном. 24 часа спустя после ИГМ выжившие крысы подвергались эвтаназии, забор экспериментального материала (образцы лобной коры ГМ и гиппокампа) производился у 3-х крыс из каждой гр. Обработка материала проводилась согласно общепринятым протоколам. Извлеченные ткани промывали в холодном 0,1 моль/л буферном растворе фосфата натрия (рН = 7,4). Далее в форме кусочков размером 1x1 мм они фиксировались в холодном 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН = 7,4) с последующей постфиксацией 1% раствором тетраоксида осмия. Материал промывали в холодном растворе фосфатного буфера, обезжировали в спиртах восходящей концентрации и заливали в аралдит. Полимеризацию блоков производили ступенчато при $t^0 = 48^{\circ}\text{C}$, 59°C и 80°C . После прицельной заточки блоков ультратонкие срезы (50 – 90 нм) изготавливали на ультратонкотоме LKB-8800. Срезы контрастировали в 2,5% спиртовом растворе уранил-ацетата [8,9] и растворе цитрата свинца [10], а затем просматривали в просвечивающем электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit Bio TWIN с системой фотосъемки Tecnai Plate Camera System и цифровой видеокамерой высокого разрешения SIS MegaView III.

Результаты и их обсуждение

Проведенный анализ выживаемости крыс (табл. 1) показал, что в группе ЛО 24-часовую двухстороннюю ок-



кклюзию ОСА переживали 100% крыс. В группе ИШ (контроль II уровня) с предварительным введением физ. р-ра суточная выживаемость была минимальной и составила всего 34,8%. В течение 24 часов постischemического периода процент выживаемости в группе животных, получавших пирарцетам, отличался от группы контроля на 9,6%,

составив 44,4%. На фоне введения мелаксена и винпоцетина показатель выживаемости через сутки после ЭИГМ был выше и равнялся 50% и 61,5%, соответственно. При превентивном введении комбинации пирарцетама и мелаксена выживаемость крыс составила 53,3%, а при совместном введении винпоцетина с мелаксеном – 80,0%.

Таблица 1

Влияние изучаемых ЛП на показатели выживаемости крыс при ЭИГМ

Группы животных	Количество прооперированных животных	Количество животных, переживших 24-часовую двухстороннюю окклюзию ОСА	Количество животных, умерших после 24-часовой двухсторонней окклюзии ОСА	Выживаемость, %
ИШ	46	16	30	34,8
П _{иш}	36	16	20	44,4*
М _{иш}	32	16	16	50,0*
В _{иш}	26	16	10	61,5**
ПМ _{иш}	30	16	14	53,3**
ВМ _{иш}	20	16	4	80,0**

Примечание: * – статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,05$; ** – статистически значимые отличия по сравнению с ИШ при $p \leq 0,01$.

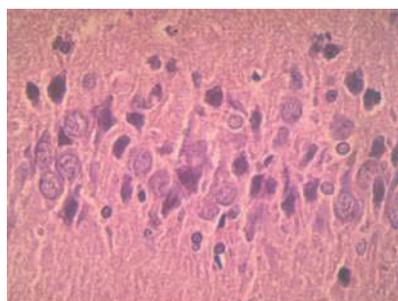
При световой и электронной микроскопии тканевых элементов ГМ крыс через 24 часа после окклюзии ОСА (рис. 1) установлены отчетливые изменения, характерные для острого ишемического состояния нервных клеток и, прежде всего, их четкая дифференциация на «светлые» и «темные», связанная с выраженным полиморфизмом нейронов по составу, характеру распределения и объему структурных элементов белок-синтезирующей системы.

Также наиболее очевидными морфологическими проявлениями ИГМ были явления хроматолиза, вакуолизация цитоплазмы, набухание и сморщивание тел и отростков нейронов, активация фагоцитоза.

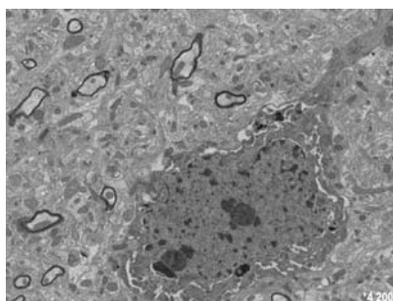
Несомненными были изменения структурно-функционального состояния ядра нейрона – модификация его формы; величины, структуры и топологии ядрышка; воз-

растание количества конденсатов хроматина; выявление множества пор в кариотеке. Количественные изменения характерны и для внутриклеточных ультраструктур цитоплазмы – они обусловлены соответствующим уровнем развития элементов гранулярной эндоплазматической сети, комплекса Гольджи, содержанием свободных рибосом и распределением их в различных локусах нейроплазмы.

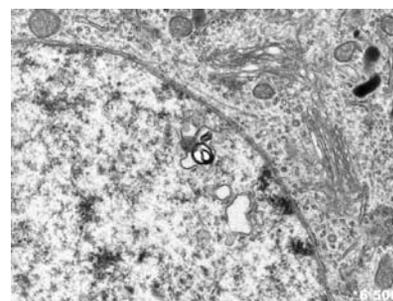
Нарушалось при ИГМ и структурно-функциональное состояние гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Наиболее типичными в этом отношении были выраженные явления отека и снижение электронной плотности цитоплазмы астроцитов (в том числе за счет обеднения последних органеллами – митохондриями, элементами аппарата Гольджи и гранулярной эндоплазматической



а



б



в

Рис. 1. Кора ГМ и гиппокамп. 24-часовая ЭИГМ (экспериментальный контроль).

а – Световая микроскопия, окраска гематоксилином-эозином. Ув. х 400. Гиперхроматоз нейронов поля СА3 гиппокампа; б, в – Ультраструктура. Электронная микроскопия. Ув. б) 4.200 («темный» нейрон); в) 6.500 (деструктивные изменения в кариоплазме нейрона).



сети). Для ядер астроцитов, как и для нейронов, были свойственны признаки конденсации хроматина. В целом, в сосудах микроциркуляторного русла очевидны признаки замедления и даже полного выключения кровотока.

Проведенный сравнительный морфологический анализ изученного интактного (обычный контроль) и экспериментального (контрольного) материала ГМ показал, что в условиях его ишемии отмечены выраженные дистрофические и дегенераторные изменения нервных и нейроглиальных клеток, но наиболее чувствительными к ишемии оказались пирамидные клетки 3-го слоя коры ГМ и СА1-поля гиппокампа, так как именно среди них регистрировалось не только большее число поврежденных нейронов, но и более глубокая степень повреждения последних.

Анализ морфологических эффектов исследуемых нами ЛП продемонстрировал ряд особенностей их влияния на элементы нервной ткани в условиях нормы и при ишемии ГМ.

Так, введение мелаксена перед моделированием ЭИГМ (рис. 2) улучшало морфо-функциональное состояние и нейронов, и глиоцитов, хотя и не было лишено ряда негативных проявлений влияния на ГМ, к которым можно отнести набухание ядер нейроцитов (особенно выраженное в гиппокампе), поскольку свидетельствовало о нарастании гидрофильности кариоплазмы и говорило в пользу способности этого ЛП в условиях гипоксии повышать проницаемость клеточных мембран, а также ядерной оболочки.

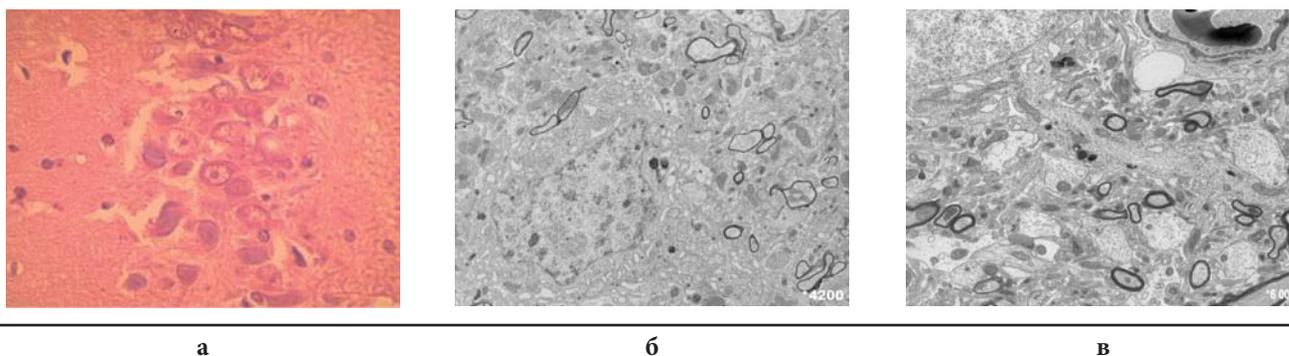


Рис. 2. Кора ГМ и гиппокамп. 24-часовая ЭИГМ, мелаксен.

а – Световая микроскопия, окраска гематоксилином-эозином. Ув. х 400. Гиперхромные нейроны поля СА1; **б, в** – Ультраструктура. Электронная микроскопия. Ув. **б)** 4.200 (конденсация хроматина в кариоплазме «темнеющего» нейрона); **в)** 6.000 («светлый» нейрон).

Минимальное повреждение тканей ГМ после ишемии было отмечено нами на фоне введения комбинации винпоцетина с мелаксеном (рис. 3), которое очевидно повы-

шало толерантность нейронов к ишемическому повреждению.

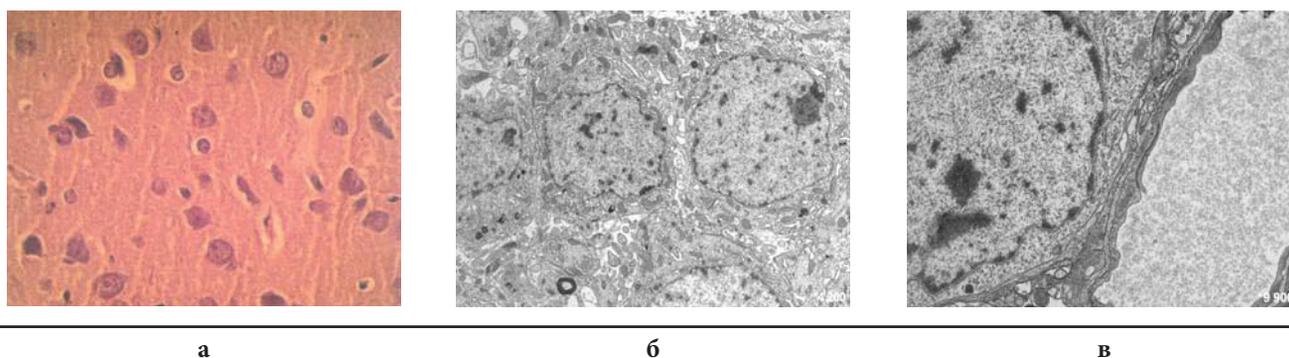


Рис. 3. Кора ГМ и гиппокамп. 24-часовая ишемия ГМ, винпоцетин+мелаксен.

а – Световая микроскопия, окраска гематоксилином-эозином. Ув. х 400. «Светлые» и гиперхромные нейроны коры. **б, в** – Ультраструктура. Электронная микроскопия. Ув. **б)** 4.200(4 «светлых» нейрона – обзорная микрофотография); **в)** 9.900 («светлый» нейрон и капилляр).

Основными составляющими нейропротекторного эффекта при ИГМ (и, по всей видимости, в условиях гипоксически-ишемических состояний в целом) этой комбинации ЛП являлись: уменьшение демонстративности

гиперхроматоза и цитолиза нейронов в сочетании со стимуляцией их функциональной активности и увеличением числа и/или объема ядрышек. Винпоцетин и мелаксен, видимо, стабилизировали и предохраняли структуру ос-



новых мембранных систем нейронов (ядра, митохондрий, ЭПС, комплекса Гольджи) от повреждения, способствуя тем самым предупреждению и «отсрочиванию» вероятного апоптоза.

Безусловны были коррективы и в структуре ГЭБ. Именно следствием явного протекторного эффекта винпоцетина с мелаксеном можно считать изменения в микроциркуляторном русле, характеризовавшиеся, прежде всего, спецификой морфологической реакции выстилающего сосуда эндотелия. Это менее выраженная гетероморфность эндотелиоцитов; явное снижение числа их в состоянии внутриклеточного отека; значительное нивелирование проявлений перикапиллярного отека.

Наконец, введение винпоцетина и мелаксена способствовало улучшению кровоснабжения ГМ за счёт увеличения количества функционирующих тонкостенных сосудов и улучшения реологических свойств крови.

Для объективизации структурно-функционального состояния ГМ нами было проведено определение соотношения числа нейронов и глиоцитов (коэффициента нейроны / глиоциты (Н/Г)) в ГМ контрольных и экспериментальных групп животных – ключевого интегративного показателя, характеризующего тип структурно-функциональных взаимоотношений в ЦНС (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние изучаемых ЛП на показатель коэффициента Н/Г

№№	Группа (маркировка)	Коэффициент Н/Г
1	ЛО	2
2	ИШ	1,31
3	Миш	2
4	ПМиш	2
5	ВМиш	2,08

Из представленных в табл. 2 данных видно, что минимальным коэффициент Н/Г был при ишемии. Использование же изучавшихся ЛП, и особенно комбинации винпоцетин + мелаксен, сохраняло в норме соотношение между основными клеточными элементами нервной ткани (нейро- и глиоцитами) и подтверждало сделанный по итогам светооптического и ультраструктурного анализа вывод о благоприятном их влиянии на выживаемость нейронов в условиях ишемии ГМ.

Выводы

На основании сравнительного анализа результатов и фактограмм, полученных из исследованного нами материала при моделировании ЭИГМ, установлены проявления нейропротекторного влияния ноотропных средств и мелаксена на тканевые элементы коры ГМ и гиппокампа. Они более всего выражены у комбинации винпоцетина с мелаксеном. Подтверждением данному заключению является не только более выраженная сохранность структурных характеристик исследованных отделов ГМ, но и очевидное снижение гетероморфности нейронов с изменением степени гиперхроматоза их ядер и цитолиза с увеличением числа или объема ядрышек; улучшение кровоснабжения ГМ за счёт увеличения количества функционирующих тонкостенных сосудов; улучшение гемореологии.

Комбинация винпоцетина с мелаксеном при ИГМ способна поддерживать на уровне, близком к норме, соотношение между нейронами и нейроглиоцитами – ключевой интегративный показатель, характеризующий тип структурно-функциональных взаимоотношений в ЦНС. Результаты применения всего комплекса морфо-фармакологических методов исследования в целом позволяют позиционировать выраженность нейропротекторной активности изучавшихся ЛП и их комбинаций по вектору: пирацетам < мелаксен < пирацетам + мелаксен < винпоцетин < винпоцетин + мелаксен.

ЛИТЕРАТУРА

- Котова, О.В. Профилактика инсультов: неучтенные возможности / О.В. Котова // Рус. мед. журн. – 2012. – № 10. – С. 514-516.
- Cardinali, D.P. Melatonin, aging, and Alzheimer's disease. In: Principles and practice of geriatric sleep medicine (pp. 97-107) / S.R. Pandi-Perumal, Monti J.M., Monjan A.A. – Cambridge University Press, 2010. – 448 p.
- Watson, R.R. Melatonin in the promotion of health / R.R. Watson. – 2nd Ed. – Taylor & Francis Group LLC, 2012. – 582 p.
- Lapi, D. Rat pial microvascular responses to melatonin during bilateral common carotid artery occlusion and reperfusion / D. Lapi, S. Vagnani, E. Cardaci, M. Paterni, A. Colantuoni // J. Pineal. Res. – 2011. – Vol. 51. – P. 136-144.
- Арушанян, Э.Б. Защитная роль мелатонина при нарушении мозгового кровообращения / Э.Б. Арушанян // Рус. мед. журн. (Неврология). – 2010. – Т. 18. – № 6. – С. 57-61.
- Онищенко, Л.С. Нейропротективная терапия острой стадии ишемического инсульта у белых крыс (светооптическое и электронномикроскопическое исследование) / Л.С. Онищенко, О.Н. Гайкова, С.Н. Янишевский // Морфология. – 2006. – № 6. – С. 40-46.
- Руководство по гистологии. Т. 1-2. Санкт-Петербург, 2011. Спецлит.
- Watson M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals // J. Biophys. And Biochem. Cytol. – 1958. – Vol. 4. – P. 475-478
- Watson M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals: II. Application of solutions containing lead and barium // J. Biophys. And Biochem. Cytol. – 1958. – Vol. 4. – P. 727-730
- Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. – 1963. – V. 17, № 1. – P. 208-212

ПОСТУПИЛА 07.07.2014