

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ (экспериментальное исследование)

Д. А. Еникеев, Е. А. Нургалеева, Л. Т. Идрисова,
А. Ф. Самигуллина, Р. М. Губайдуллин, О. В. Лаптев

ГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет, Уфа;
кафедра патологической физиологии

Postresuscitative Morphofunctional Changes in the Brain and Retina (Experimental Study)

D. A. Yenikeev, Ye. A. Nurgaleyeva, L. T. Idrisova,
A. F. Samigullina, R. M. Gubaidullin, O. V. Laptev

Department of Morbid Physiology, Bashkir State Medical University, Ufa

Цель исследования. Изучить изменения в микроциркуляторном русле и содержании оксида азота в головном мозге и сетчатке глаза крыс на протяжении длительного постреанимационного периода (35 суток). **Материал и методы.** На модели клинической смерти от острой остановки кровообращения оценивалось состояние мозговых и ретинальных микро-сосудов в гистологических препаратах (окраска гематоксилин-эозином, контрастирование тушью) коры головного мозга и сетчатки глаза крыс, а также регистрировалось содержание стабильных конечных метаболитов оксида азота (нитритных ионов) с помощью реакции Грисса в изучаемых органах. **Результаты.** Характер изменений мозгового кровотока выражался значительным нарушением проходимости сосудов, снижением плотности капиллярной сети, а также уменьшением диаметра капилляров, максимально выраженным в первые сутки после оживления. Микроциркуляторные нарушения ретинального кровотока характеризовались фазностью течения: вазодилатация и снижение плотности капиллярной сети в первые сутки после оживления, с 14-х суток сменялись прогрессивным нарастанием плотности капиллярной сети по сравнению с контролем и нормализацией диаметра капилляров. Исследование метаболитов оксида азота в коре головного мозга и сетчатке глаза экспериментальных животных выявило увеличение их накопления, статистически значимо превышающее контрольные значения в 1,5 и более раза на протяжении 5 недель постреанимационного периода. **Заключение.** В динамике длительного постреанимационного периода (35 суток) было показано разнонаправленное изменение калибра и плотности микроциркуляторной сети головного мозга и сетчатки глаза на фоне параллельного нарастания уровня метаболитов оксида азота в тканях коры головного мозга и сетчатки глаза крыс. **Ключевые слова:** постреанимационная болезнь, микроциркуляция мозга, микроциркуляция глаза, нитритные ионы.

Objective: to study changes in the microcirculatory bed and in the levels of nitric oxide in the rat brain and retina during a long (35-day) postresuscitative period. **Materials and methods.** A model of clinical death from acute circulatory arrest was used to evaluate the cerebral and retinal microvessels in the rat brain and retinal histological specimens (stained with hematoxylin-eosin and Indian ink) and to record the content of stable end metabolites of nitric oxide (nitric ions) in the study organs, by employing the Griss reaction. **Results.** The cerebral circulatory changes were characterized by significantly impaired vascular patency, decreased capillary network density, and a lower capillary diameter, which was most pronounced within the first 24 hours after resuscitation. The microcirculatory retinal circulatory disorders featured the staging of the course: vasodilatation and decreased capillary network density within the first 24 hours after resuscitation, followed by a progressive increase in the density of the capillary network from day 14, as compared with the control, and capillary diameter normalization. The study of nitric oxide metabolites in the cerebral cortex and retina of the experimental animals revealed their accumulation increase, that was statistically significantly 1.5 times greater or more than the control values, within 5 postresuscitative weeks. **Conclusion.** The long (35-day) postresuscitative period exhibited a heterodirectional change in the size and density of the cerebral and retinal microcirculatory network along with a parallel increase in the level of nitric oxide metabolites in the tissues of the rat cerebral cortex and retina. **Key words:** postresuscitation disease, cerebral microcirculation, ocular microcirculation, nitric ions.

Проблема восстановления функций нервной системы у пациентов, перенесших гипоксическую агрессию различной этиологии, по-прежнему остается актуальной [1]. Особого внимания заслуживают случаи внешне полной нормализации неврологического статуса после клинической смерти, поскольку клиника много лет сталкивается с феноменом отсроченных

постгипоксических, в том числе и постреанимационных, энцефалопатий [2]. В экспериментах на животных и в клинике описано большое разнообразие клинико-физиологических и биохимических изменений нервной системы в постреанимационном периоде [2, 3], в то же время остается весьма актуальной диагностика постреанимационных расстройств. Учитывая

Таблица 1

**Показатели ориентировочно-исследовательской деятельности
у крыс в постреанимационном периоде ($M \pm m$)**

Показатель	Контроль (n=16)	Значения показателей в постреанимационном периоде (сутки)								
		1-е (n=16)	3-и (n=17)	5-е (n=14)	7-е (n=19)	10-е (n=18)	14-е (n=20)	21-е (n=15)	28-е (n=16)	35-е (n=13)
Латентный период (сек)	4,6±0,2	10,3±0,9 [#]	6,6±0,4**	5,1±0,4	3,5±0,1**	4,0±0,6	13,4±1,2 [#]	6,7±0,3*	5,9±0,6	5,1±0,5
Горизонтальная активность (колич.)	38,5±1,6	18,2±1,8 [#]	46,8±2,3**	32,1±1,5*	39,4±3,0	36,8±3,5	28,6±1,9**	46,7±2,5**	40,2±3,1	30,5±2,2*
Вертикальная активность (колич.)	8,4±0,3	4,3±0,3 [#]	13,6±1,1 [#]	11,7±0,9**	10,6±0,7*	8,2±0,7	6,8±0,4*	7,5±0,8	8,0±0,6	8,8±0,6
Норки (число)	7,1±0,3	8,8±0,5*	8,0±1,4	7,4±0,9	6,2±0,6	6,5±0,8	3,6±0,5**	6,4±1,0	7,7±1,3	7,9±0,8
Неподвижность (сек)	1,8±0,1	2,6±0,2*	1,3±0,1*	2,0±0,2	2,3±0,2*	2,0±0,2	2,8±0,3*	2,2±0,5	1,6±0,1	2,0±0,2
Груминг (сек)	5,6±0,8	12,4±1,9**	18,7±2,9 [#]	14,5±3,2**	17,3±2,6 [#]	15,8±2,4**	7,2±1,5	14,3±2,8**	12,8±2,2**	8,9±0,7*

Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, [#] – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с контролем; n – количество обследованных животных.

Таблица 2

**Морфометрическая характеристика сосудов микроциркуляции коры головного мозга и сетчатки глаза
в разные сроки постреанимационного периода (с использованием критерия Манна-Уитни)**

Показатель		Контроль (n=10)	Значения показателей в постреанимационном периоде (сутки)					
			1-е (n=12)	3-и (n=9)	7-е (n=11)	14-е (n=10)	21-е (n=9)	35-е (n=8)
			Плотность сосудистой сети мозга (ед/мм ²)	Me	703,0	446,0	480,0	592,0
	U		14	11	27	24	18	27
	p-level		0,0024	0,0055	0,048	0,049	0,027	0,26
Диаметр капилляров мозга (мкм)	Me	5,25	4,00	4,20	5,10	4,40	6,10	5,35
	U		25	19	51	19	14,5	34,5
	p-level		0,02	0,03	0,77	0,019	0,012	0,62
Плотность сосудистой сети сетчатки (ед/мм ²)	Me	234,0	183,0	241,0	243,0	284,5	341,0	319
	U		24	43	54,5	18,5	13	11
	p-level		0,017	0,87	0,97	0,017	0,01	0,01
Диаметр капилляров сетчатки (мкм)	Me	5,0	7,05	6,20	5,40	4,60	4,70	5,25
	U		24	19,5	45,5	20,5	20	38,5
	p-level		0,017	0,037	0,5	0,025	0,04	0,89

Примечание. Me – медиана; U – критерий знаков рангов; p-level – уровень статистически значимой разности по сравнению с контролем; n – количество обследованных животных.

анатомо-физиологическую общность кровоснабжения головного мозга и глазного яблока рядом исследователей [4, 5], проводили попытку диагностировать микроциркуляторные расстройства головного мозга по состоянию кровоснабжения сетчатки. Были отмечены однотипные качественные нарушения микроциркуляции, а в отношении изменений диаметра микрососудов – корреляция не выявлена [6, 7], в связи с чем, представляется актуальным дальнейшее исследование изменений в сетчатке и в головном мозге в сравнительном аспекте.

Цель исследования – изучить изменения в микроциркуляторном русле и содержании оксида азота в головном мозге и сетчатки глаза у крыс на протяжении длительного постреанимационного периода (35 суток).

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 156 половозрелых небредных крысах-самцах массой 150–180 г. Контрольную группу составили 8 животных, подвергшихся наркозу, поскольку животных основной группы до моделирования

клинической смерти наркотизировали. Клиническую смерть от острой остановки кровообращения моделировали без вскрытия грудной клетки путем полного пережатия сосудистого пучка сердца интраторакально [8]. Комплекс реанимационных мероприятий включал в себя наружный массаж сердца в сочетании с искусственной вентиляцией легких. Наблюдение за динамикой общего состояния животных проводили в течение 5 недель эксперимента. Для более полного клинического исследования состояния животных в постреанимационном периоде использовали балльную оценку восстановления неврологического статуса [9], изучали поведенческую деятельность по уровню ориентировочно-исследовательской активности и эмоционально-психических реакций (тест «открытое поле») [10]. Для оценки выраженности микроциркуляторных нарушений, проводили забор материала (головной мозг и глазные яблоки) на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 14-е, 21-е, 28-е и 35-е сутки постреанимационного периода с предварительной наливкой тушью сосудистого русла и последующей фиксацией в 10% нейтральном формалине. Световую микроскопию срезов, окрашенных гематоксилин-эозином, проводили с помощью винтового микроскопа «PZO WARSZAWA» при увеличении объектива $\times 40$, окуляра – $\times 12$. На фотографиях, полученных с фронтальных срезов при помощи компьютерной программы Photoshop 6.0, проводили морфометрическую оценку микроциркуляторного русла [11].

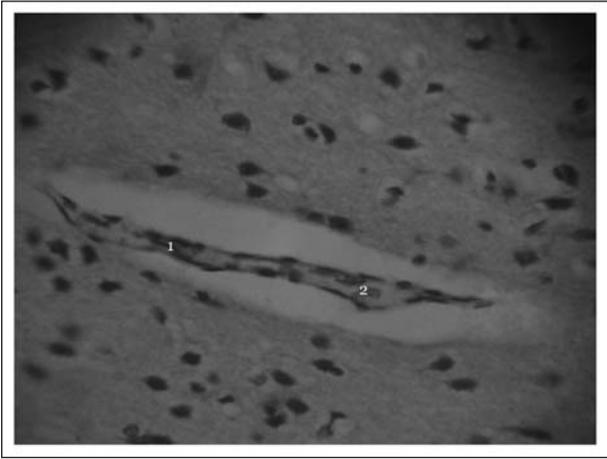


Рис. 1. Головной мозг крысы, 3-и сутки постреанимационного периода.

Сужение венулы, неравномерность ее калибра (1), ампулярные расширения (2). Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение: ок $\times 12$, об $\times 40$.

В гомогенатах головного мозга и сетчатки глаза определяли уровень содержания оксида азота в указанные сроки постреанимационного периода. Поскольку оксид азота является короткоживущей молекулой, его определение основывается на регистрации стабильных конечных метаболитов (нитритных ионов) с помощью реакции Грисса [12]. Результаты обработаны статистически с использованием средней арифметической (M), ее стандартной ошибки ($\pm m$), оценку достоверности различий сравниваемых показателей проводили с использованием t -критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

У опытной группы животных после перенесенной 7-и минутной клинической смерти в течение 3-х суток наблюдалось постепенное восстановление неврологического статуса. Неврологический дефицит был максимально выражен в первые сутки после оживления и проявлялся в виде атаксии, нарушения тонуса мышц конечностей, учащения сердечной деятельности и ритма дыхания, а также индифферентностью к пище и воде. У части реанимированных животных ($n=12$) на 1–3-и сутки возникал приступ психомоторного возбуждения на звуковой, либо болевой раздражитель, характеризовавшийся резкой хаотичной двигательной активностью и приступами тонико-клонических судорог, свидетельствующих о повышенной судорожной готовности мозга к спонтанным и вызванным судорожным пароксизмам. Вместе с тем на фоне восстановления неврологического статуса длительно наблюдался ряд изменений в поведенческой активности крыс. Ориентировочно-исследовательская деятельность реанимированных крыс в тесте «открытое поле» характеризовалась длительным нарушением ее составляющих с чередованием процессов торможения (1-е, 14-е сутки), возбуждения (3-и, 21-е сутки), свидетельствующих о нарушении процессов адаптации и пространственной ориентации животных и частичной нормализации высшей нервной

деятельности (10-е, 35-е сутки) (табл. 1). Выявленная минимизация функций на 14-е сутки постреанимационного периода может свидетельствовать о прогрессировании постишемического и реперфузионного повреждения нервной системы. Большой вклад в нарушения поведенческой деятельности животных вносили расстройства в эмоциональной сфере, прослеживающиеся на протяжении всего срока наблюдения (35 суток). Наблюдалось усиление интенсивности и продолжительности груминговых движений, выраженность которых, согласно Н. В. Орловой [13], составляет фактор «тревожности» в поведении животных.

Обнаруженные в ходе эксперимента изменения в системе микроциркуляции коры головного мозга и сетчатки глаза носили фазный характер на протяжении всего восстановительного периода (табл. 2). В ранние сроки постреанимационного периода в коре головного мозга (первые трое суток) степень нарушения микроциркуляции достигала выраженных значений — до формирования зон частичного и полного отсутствия кровотока с появлением некротических очаговых изменений нейронов, нейропиля и выраженным снижением плотности микрососудистой сети. Наблюдалось множественные выраженные нарушения проходимости сосудов микроциркуляторного русла. Сосуды на протяжении выглядели деформированными, становились извитыми, появлялись перетяжки по ходу сосудов. В капиллярном звене микроциркуляторного русла выявлялось распространенное сужение просвета сосудов. В приносящем звене выделялись артериолы со значительной их дилатацией, венулы характеризовались выраженным низким наполнением контрастной массой, форма их была изменена (выявлялись множественные расширения, неравномерность просвета) (рис. 1).

Первоначальной реакцией сети капилляров сетчатки было значительное расширение их калибра с выключением части сосудов из числа функционирующих. В последующие сроки наблюдения (3-и, 5-е, 7-е сутки), изменения в калибре сосудов и плотности сети нивелировались, исследуемые параметры приближались к нормальным величинам. В то же время сохранялась неравномерность просвета части сосудов, выявлялись участки микрососудистой сети с неполным наполнением капилляров, по типу «плазматических», микрососуды характеризовались значительной извилистостью, неравномерными контурами.

В более поздние сроки в головном мозге отмечалось улучшение проходимости микрососудов, увеличение среднего диаметра капилляров. Частичное восстановление плотности функционирующей сосудисто-капиллярной сети мозга и ее кровенаполнение развивалось, по-видимому, вследствие включения в кровотоки ранее окклюзированных капилляров при снижении выраженности отека периваскулярных отростков астроглии. В то же время, несмотря на существенное восстановление плотности микрососудис-

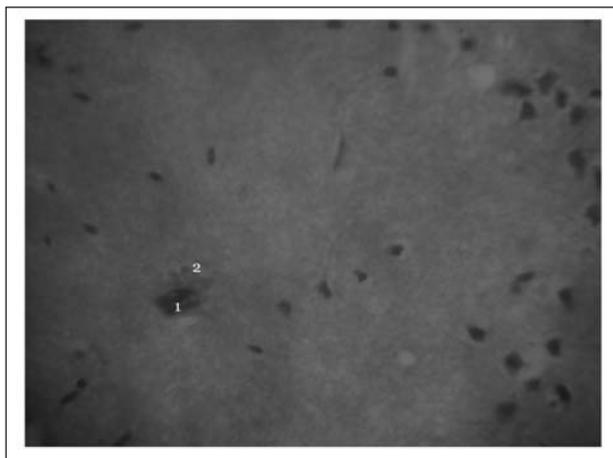


Рис. 2. Головной мозг крысы, 14-е сутки постреанимационного периода.

Нарушение проходимости сосудов микроциркуляторного русла головного мозга, микрогеморрагии. Просвет капилляра сужен (1), наблюдается выход форменных элементов за пределы сосудистого русла (2). Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение: ок $\times 12$, об $\times 40$.

той сети, обнаруживались участки с резко суженным просветом капилляров, уменьшением их калибра, также встречались мелкие очаги некроза и микрогеморрагий (рис. 2). В системе микрососудов сетчатки в позднем постреанимационном периоде наблюдалось увеличение показателя плотности микрососудистой сети наряду со снижением диаметра капилляров ($p=0,04$). Часть капилляров находилась в спазмированном состоянии, в то же время выявлялись участки расширения просвета по типу микроаневризм.

Таким образом, на протяжении всего периода наблюдения были выявлены изменения в системе микроциркуляции сетчатки и коры головного мозга. К окончанию эксперимента сохранялись качественные нарушения со стороны микрососудистой сети (извитость сосудов, неравномерность контуров стенок с их утолщением).

В регуляции микроциркуляции важнейшим звеном является эндотелий-зависимая гуморальная регуляция. Поэтому, параллельно с изучением состояния микроциркуляции, проводили исследование оксида азота и нитритных ионов, играющих роль в регуляции регионарного кровотока. По нашим данным, на протяжении всего постреанимационного периода наблюдали повышение содержания стабильных метаболитов оксида азота в тканях головного мозга и сетчатки глаза в 2 и более раза ($p<0,05$). Максимальные подъемы уровня показателя регистрировали на 3-и и 14-е сутки после оживления, остальные сроки наблюдения характеризовались постепенным снижением концентрации метаболитов оксида азота с минимальными значениями на 10-е и 35-е сутки постреанимационного периода, в то же время сохранявшимися на повышенном уровне по сравнению с контролем (рис. 3).

Известно, что при восстановлении кровотока после ишемии происходит значительное изменение метаболической активности эндотелия в результате механического воздействия на него: повышение давления крови в со-

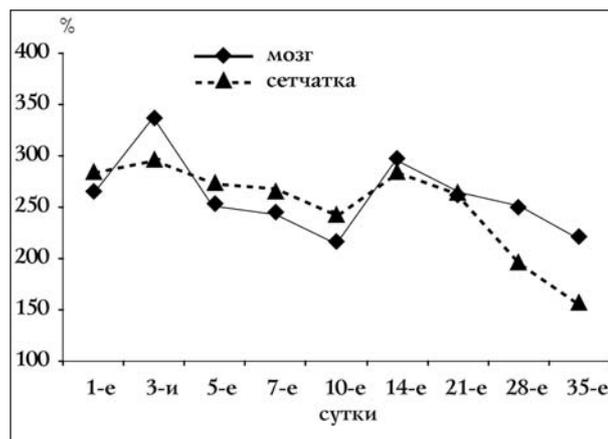


Рис. 3. Динамика содержания оксида азота в сетчатке глаза и головном мозге в различные сроки постреанимационного периода (% от контроля).

суде, растяжение эндотелия, напряжение сдвига, в результате механического воздействия на цитоскелет клеток [14]. В результате такой суммации в эндотелии происходит увеличение активности эндотелиальной NO-синтазы, повышение синтеза оксида азота, результатом чего является вазодилатация [15]. Вероятно, эти механизмы, а также чередование деструктивных изменений в капиллярах со стимуляцией неповрежденных эндотелиальных клеток в постишемическом периоде объясняет выявленное неравномерное сужение и расширение сосудов головного мозга экспериментальных животных.

Наряду с положительным эффектом действия оксида азота за счет NO-опосредованной вазодилатации, усиленное образование оксида азота при реперфузии может иметь патогенетическое значение [16]. В условиях ишемической патологии при значительном увеличении продукции NO, его цитотоксичность определяется преимущественно способностью превращаться в новые вторичные оксиданты. Помимо этого, нитрирование белков увеличивает их антигенность, что способствует развитию аутоиммунных процессов в нервной системе.

Поскольку ретинальное сосудистое русло носит концевой характер (отсутствие внутри- и межсистемных анастомозов), то степень восстановления кислородного статуса и метаболизма в тканях напрямую зависит от степени восстановления микрососудов на каждом конкретном участке сетчатки. Наряду с этим, астроциты, являющиеся сенсорами уровня кислорода, начинают вырабатывать вазопротрофические факторы, одним из которых является оксид азота, стимулируя ретинальный ангиогенез [17]. Однако выявленную сосудистую пролиферацию отличает неупорядоченная архитектура, дисбаланс микроциркуляторных звеньев, снижение барьерных свойств капиллярной стенки [18].

Заключение

Таким образом, несмотря на параллельное нарастание уровня стабильных метаболитов оксида азота

в тканях коры головного мозга и сетчатки глаза были выявлены разнонаправленные изменения в микрососудах сетчатки и коры головного мозга. Выявленное уменьшение диаметра церебральных капилляров в ранние сроки постреанимационного периода связано, вероятно, с развитием периваскулярного отека, а также деструктивными повреждениями эндотелиальных клеток сосудов. В результате чего, выявленная вазодилатация артериального звена микрососудов коры головного мозга на фоне значительного нарушения проходимости церебральных капилляров, может способствовать формированию областей невосстановленного кровообращения, а также областей гиперемии, ведущих к усилению отека и увеличению зон пораже-

ний коры головного мозга. Развитие вазодилатации ретинальных капилляров в ранние сроки постреанимационного периода, являющейся компенсаторной реакцией, обеспечивающей хорошее кровоснабжение и поддержание гомеостаза в тканях, по-видимому, не только под воздействием значительно повышенного уровня оксида азота в сетчатке глаза, но и при участии других эндотелий-производных факторов релаксации. Наряду с этим, в силу отсутствия внутри- и межсистемных анастомозов в микроциркуляторном русле сетчатки выключение части сосудов из числа функционирующих, неравномерность калибра и извитость просвета части сосудов способствует дальнейшему прогрессированию ишемии ретины.

Литература

1. *Неговский В. А., Мороз В. В.* Актуальные проблемы реаниматологии на рубеже XXI века. Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы. В кн.: Тез. докл. 2-го Росс. Конгр. по патофизиологии. М.; 2000; 302.
2. *Алексеева Г. В.* Особенности клинического течения постгипоксических энцефалопатий. Анестезиология и реаниматология 2000; 6: 15–20.
3. *Семченко В. В., Степанов С. С., Алексеева Г. В.* Постаноксическая энцефалопатия. Омск; 1999.
4. *Wong T. Y., Klein R., Marino E. K. et al.* Retinal microvascular abnormalities and blood pressure in older people: the Cardiovascular Health Study. Br. J. Ophthalmol. 2002; 86 (9): 1007–1013.
5. *Cooper L. S., Wong T. Y., Klein R. et al.* Retinal microvascular abnormalities and MRI-defined subclinical cerebral infarction: the atherosclerosis risk in communities study. Stroke 2006; 37 (1): 82–86.
6. *Еникеев Д. А., Нургалиева Е. А., Идрисова Л. Т.* Влияние предварительной сенсибилизации и перенесенной клинической смерти на динамику морфофункциональных параллелей ретинального и мозгового кровотока. Патол. физиология и эксперим. терапия 1999; 2: 21–23.
7. *Еникеев Д. А., Идрисова Л. Т., Еникеева С. А. и соавт.* Микроциркуляция мягкой мозговой оболочки и сетчатки глаза в постреанимационном периоде. Уфа; 2004.
8. *Корпачев В. Г., Лысенков С. П., Тель Л. З.* Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. Патол. физиология и эксперим. терапия 1982; 3: 78–80.
9. *Идрисова Л. Т., Еникеев Д. А., Байбурина Г. А.* Балльная оценка неврологического статуса крыс при алкогольной коме и влияние на нее лазерной физиотерапии. Клинич. медицина и патофизиология 1999; 2: 75–79.
10. *Волчегорский И. А., Долгушин И. И., Колесников О. Л.* Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск; 2000.
11. *Бликов С. Н., Моисеев Ф. Л.* Определение плотности капиллярной сети в органах и тканях человека и животных независимо от толщины микротомного среза. Докл. АН СССР 1961; 2: 465–468.
12. *Горбачев В. И., Ковалев В. В.* Соответствие уровня метаболитов истинному содержанию оксида азота при проведении клинических исследований. Лаб. диагностика 2005; 2: 28–30.
13. *Орлова Н. В., Фоломкина А. А., Базян А. С.* Поведение крыс в «открытом поле» на следующий день после инъекции галоперидола: зависимость от условий эксперимента. Журн. высш. нервной деятельности 2003; 2: 243–244.
14. *Traub O., Berk B. C.* Laminar shear stress. Mechanism by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. Ather. Thromb. Vasc. Biol. 1998; 18 (5): 677–685.
15. *Tooper J. N., Gimbrone M. A. Jr.* Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. Rev. Mol. Med. Today 1999; 5 (1): 40–46.
16. *Зотова И. В., Затеищиков Д. А., Сидоренко Б. А.* Синтез оксида азота и развитие атеросклероза. Кардиология 2002; 4: 58–65.
17. *Beauchamp M. H., Sennlaub F., Speranza G. et al.* Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy. Free Radic. Biol. Med. 2004; 37 (11): 1885–1894.
18. *Федоров А. А.* Пренатальное развитие сосудов сетчатой оболочки глаза человека. Вестн. офтальмологии 2003; 4: 59–63.

Поступила 28.05.07