

Нечипуренко Н.И., Жук Н.И., Маслова Г.Т., Пашковская И.Д., Вашкевич Е.И.
РНПЦ неврологии и нейрохирургии,
Институт физиологии НАН Беларуси,
Белорусский государственный университет

Влияние лазерной гемотерапии на ультраструктуру нейронов и гематоэнцефалического барьера коры больших полушарий, водно-электролитный баланс и перекисное окисление липидов при ишемии головного мозга

■ ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания ишемического генеза имеют тенденцию к омоложению, сопряжены с тяжелым клиническим течением, высокими показателями инвалидности и смертности [6, 11]. Так, по данным ВОЗ, инсульт – вторая по частоте (8–20%) причина смертности среди населения различных стран. Во всем мире ежегодно регистрируется около 7 млн. случаев мозгового инсульта. В Беларуси показатель заболеваемости инфарктом мозга на 100 тыс. населения в 2007 г. составил 276,5 (21692 заболевших), в 2006 г. – 287,3 и 22457 соответственно. По данным европейских исследований, на каждые 100 тыс. населения приходится 600 больных с последствиями инсульта, из них 360 (60%) являются инвалидами.

За последнее десятилетие достигнуты большие успехи в повышении эффективности лечения ишемического инсульта, однако эти успехи сопровождались и значительным количеством неудач при клинической апробации нейропротективных средств. Это позволяет считать поиск новых подходов к терапии острого ишемического инсульта одной из актуальных проблем экспериментальной и клинической неврологии.

Для достижения эффективной коррекции ишемических состояний необходимо изучение динамики взаимосвязанных морфофункциональных и метаболических изменений, определяющих сложность патогенетической структуры ишемии головного мозга. Стимулирующее действие лазерного света зависит в большой степени от спектральных параметров лазерных источников [9, 24]. Показано, что наиболее эф-

В настоящее время активно развиваются теоретические и практические аспекты целого научного направления, основанного на данных квантовой физики и связанного с применением низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в клинике нервных болезней.

фактивно взаимодействие излучения с кровью при $\lambda = 0,6\text{--}1,0$ мкм [12]. Это в полной мере относится к инфракрасному лазерному излучению с $\lambda = 0,86$ мкм.

В основе позитивного клинического эффекта НИЛИ лежит его способность стимулировать разнообразные процессы защиты, адаптации и репарации, т.е. механизмы саногенеза. Адаптагенное действие НИЛИ реализуется на клеточном, тканевом и системном уровнях организации живых систем по следующим направлениям: активация фермента теломеразы, что увеличивает митотический потенциал клеток (клеточный уровень); активация основных ферментов антиоксидантной системы (АОС) – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, церулоплазмينا (ЦП) (клеточно-тканевой уровень); повышение синтеза АТФ при увеличении эффективности клеточного дыхания; увеличение биосинтеза ферментов и ДНК на уровне хромосом; стимуляция синтеза белков теплового шока – внутриклеточных ремонтных белков (шаперонов), например HSP-70, которые обеспечивают восстановление структуры частично денатурированных белковых молекул и поврежденных органелл; активация лейкоцитов – наиболее фотореактивных клеток с возрастанием функции макрофагов (фагоцитоз – киллинг микробов), продукции цитокинов, презентации антигенов, межклеточной кооперации. Вследствие этого на тканевом уровне происходит улучшение микро- и гемодинамики, а на системном – улучшение обеспечения тканей кислородом, мобилизация механизмов общего адаптационного синдрома – реакций стресса [1, 4, 5, 10, 13, 15, 19, 21, 23].

В сложной цепи патогенеза ишемии головного мозга можно выделить ряд звеньев, являющихся одновременно и точками приложения лазерного излучения. К ним относятся такие факторы, как реологические показатели крови, процессы генерации активных форм кислорода, реакции перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, микрогемодинамика, что позволяет считать воздействие НИЛИ при ишемическом повреждении головного мозга патогенетически обоснованным. Однако многие механизмы действия и пути реализации лечебного эффекта внутривенного лазерного облучения крови (ВЛОК) – одного из способов воздействия НИЛИ остаются до сих пор нераскрытыми и обсуждаются на уровне гипотез. В частности, недостаточно исследованы ультраструктурные изменения коры головного мозга и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), гидроионные изменения и процессы свободнорадикального окисления после моделирования церебральной ишемии в условиях воздействия ВЛОК излучением инфра-красного (ИК) лазера.

Современные исследования направлены также на изучение процессов межклеточного взаимодействия в ГЭБ и объяснение функционирования морфологически разнородных элементов этой барьерной системы, т.к. нарушение проницаемости клеточной системы ГЭБ приводит к изменению нейронального метаболизма, функциональным расстройствам, а в дальнейшем – и к органическому поражению ЦНС [2].

■ ЦЕЛЬ

Изучение ультраструктуры нейронов теменной области коры головного мозга и компонентов ГЭБ, состояния перекисного окисления ли-

пидов (ПОЛ), антиоксидантной системы (АОС) и водно-электролитного баланса в норме и в постишемическом периоде в условиях ВЛОК излучением ИК лазера ($\lambda = 0,86$ мкм).

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 46 половозрелых белых кроликах обоего пола массой 2,5–3,2 кг, содержащихся в стандартных условиях вивария при смешанном типе кормления в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Локальную ишемию головного мозга (ЛИГМ) создавали в остром эксперименте путем окклюзии обеих общих сонных артерий под внутривенным тиопенталовым наркозом (50–70 мг/кг) продолжительностью 3 ч. Верификация модели ЛИГМ представлена в работе [20]. ВЛОК проводили с помощью световода типа кварц-полимер, вводимого в краевую вену уха кролика через иглу для внутривенных инъекций. Мощность излучения составляла 2 мВт. Лечение ВЛОК кроликов с ЛИГМ начинали через 30 мин после снятия зажимов с сонных артерий и выполняли по одной 10-минутной процедуре в течение 5 суток. Были проведены следующие экспериментальные серии: ВЛОК излучением ИК лазера интактных кроликов – 9 животных; ЛИГМ без лечения – 8; ЛИГМ, курсовое воздействие ВЛОК – 7; интактные кролики – 22 животных.

Объектом электронно-микроскопического исследования являлась теменная доля коры больших полушарий кроликов. Мозг извлекали, фиксировали вначале в 3%-ном забуференном растворе глутарового альдегида, затем выделенный участок коры измельчали и фиксировали в 1%-ном растворе четырехоксида осмия. После дегидратации в спиртах восходящей крепости материал заключали в аралдит [3]. Ультратонкие срезы готовили на микротоме LKB III (Швеция), контрастировали цитратом свинца и анализировали на электронном микроскопе JEM-100 В (Япония).

Содержание калия и натрия в плазме крови и структурах головного мозга определяли методом пламенной фотометрии, уровень воды в различных отделах мозга – гравиметрически. Активность процессов ПОЛ измеряли по содержанию их вторичных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [17]. Содержание ЦП в плазме крови изучали модифицированным методом Ревина [16], восстановленный глутатион (ГSH) – спектрофотометрически [25]. Активность глутатионпероксидазы (ГП) исследовали в гемолизатах эритроцитов методом [8]. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью t-критерия Стьюдента.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ состояния водно-электролитного баланса в организме на 5-е сутки после моделирования ЛИГМ с применением ВЛОК показал его нормализующее влияние на содержание натрия в плазме крови, структурах головного мозга и уровень воды во всех исследованных областях мозга. Полное разрешение отека церебральных структур после применения ВЛОК сочеталось с характерным для этого патологического состояния и непосредственным действием лазерного света уменьшением содержания калия, преимущественно в зоне ишемизации (табл. 1).

Таблица 1

Содержание калия, натрия и воды в головном мозге интактных кроликов и после моделирования ЛИГМ в условиях ВЛОК излучением ИК лазера, $\bar{X} \pm s_x$

Показатель	Объект исследования	Интактные кролики	ЛИГМ, без лечения	ЛИГМ+ курс ВЛОК
Калий, ммоль/кг массы сухого вещества	ЛТД	430,24±18,5 (21)	373,1±20,9 (16) P1<0,05	375,6±13,6 (18) P1<0,05
	ЗД	358,2±10,4 (11)	385,6±24,6 (13)	385,7±24,8 (13)
	ВМ	153,1±11,4 (8)	213,38±30,1 (8)	160,0±24,9 (7) P2<0,01
	Мозжечок	278,8±37,2 (8)	312,4±26,4 (7)	307,1±61,7 (7)
Натрий, ммоль/кг массы сухого вещества	ЛТД	308,2±13,1 (17)	289,2±15,3 (16)	296,7±20,2 (12)
	ЗД	260,0±11,1 (7)	262,2±14,7 (16)	300,8±21,0 (13)
	ВМ	128,33±9,9 (7)	151,0±14,9 (8)	115,7±12,9 (7)
	Мозжечок	203,8±23,6 (8)	201,6±16,8 (7)	217,1±47,7 (7)
Вода, г/1000 г сырой ткани	ЛТД	776±4 (23)	805±3 (17) P1<0,001	784±3 (17) P2<0,001
	ЗД	770±7 (12)	801±3 (16) P1<0,001	772±4 (13) P2<0,001
	ВМ	695±8 (9)	737±8 (8) P1<0,01	698±11 (7) P2<0,01
	Мозжечок	760±7 (9)	786±7 (8) P1<0,05	768±9 (7)

Примечание: ЛТД – лобно-теменная доля; ЗД – затылочная доля; ВМ – варолиев мост. P1 – достоверность различий по сравнению с интактными кроликами; P2 – то же между группами с моделированием ЛИГМ без лечения и в условиях ВЛОК. В скобках указано число определений.

ВЛОК интактных животных излучением ИК лазера вызывало значительное повышение активности ГП при снижении уровня ГSH. Значения ЦП и ТБК-продуктов не менялись по сравнению с нормальными показателями. После проведения пяти сеансов ВЛОК кроликам с ЛИГМ отмечалось снижение ГSH, реактивация ГП и нормализация уровня ТБК-продуктов. У животных контрольной группы сохранялась тенденция к возрастанию содержания вторичных продуктов ПОЛ при нормализации показателей АОС в эти же сроки наблюдения (табл. 2).

После проведения пяти сеансов ВЛОК интактным кроликам значительного изменения ультраструктуры клеток теменной области коры больших полушарий не выявлено. Нейроны, как правило, имели округлое с ровными контурами ядро со светлой кариоплазмой, характерным расположением ядрышка, четко выраженными наружной и внутренней мембранами. Однако в некоторых нейронах наблюдались конденсация ядерного хроматина у внутренней мембраны ядра, расширение канальцев гранулярной сети, просветление цитоплазмы. Наличие по-

Таблица 2

Показатели ПОЛ в норме и после моделирования ЛИГМ без лечения и в условиях ВЛОК излучением ИК лазера, $\bar{X} \pm s_x$

Экспериментальная серия	ГSH, ммоль/л	ГП, ммоль/мин.л	ЦП, мг/л	ТБК, мкмоль/л
Интактные кролики	69,8±2,1 (14)	63,9±3,3 (10)	339±41 (12)	2,9±0,2 (8)
Интактные кролики (5 сеансов ВЛОК)	49,2±4,9 (7) P1<0,01	85,9±5,3 (5) P1<0,01	396±38(5)	3,1±0,4 (4)
ЛИГМ, без лечения, 5 сут.	67,7±1,9 (7)	75,7±4,2 (7) P1<0,05	407±43 (7)	3,3±0,3 (7)
ЛИГМ + 5 сеансов ВЛОК	35,8±0,9 (7) P1<0,001 P2<0,001	92,4±3,1 (7) P1<0,001 P2<0,01	424±71 (6)	2,7±0,2 (5)

Примечание. P1 – достоверность различий по сравнению с интактными кроликами; P2 – то же между группами с моделированием ЛИГМ без лечения и в условиях ВЛОК через 5 суток. В скобках указано количество кроликов.

добных отклонений свидетельствовало, что мозг интактных кроликов реагирует на ВЛОК структурно-функциональными перестройками части нейрональной популяции (рис. 1). У этих же кроликов просвет капилляров оставался неизменным, эндотелиоциты не имели каких-либо видимых перестроек. Такая картина свидетельствует о том, что ГЭБ морфологически остается резистентным к курсовому воздействию НИЛИ в указанном режиме.

На 5-е сутки постишемического периода без лечения в теменной области коры больших полушарий кролика наблюдали деструктивные процессы во всей нейрональной популяции исследуемой области. Структурные изменения затронули ядра, в которых выявлено образование выпячиваний и углублений, конденсация хроматина у внутренней мембраны ядра, расширение ядерных пор. В цитоплазме отмечено

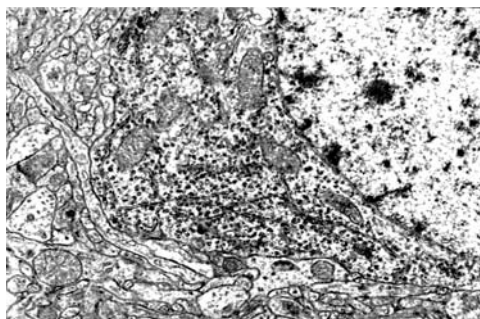


Рисунок 1

Фрагмент нервной клетки теменной доли коры головного мозга интактных кроликов, подвергшихся ВЛОК, на котором представлены основные органеллы без изменений. Ув. 9800.

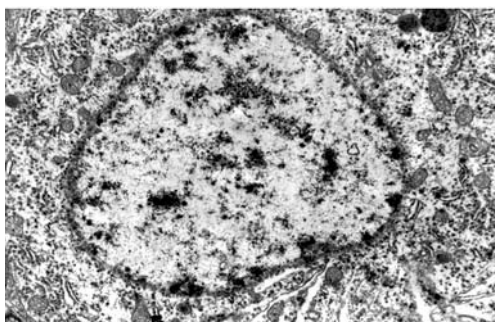


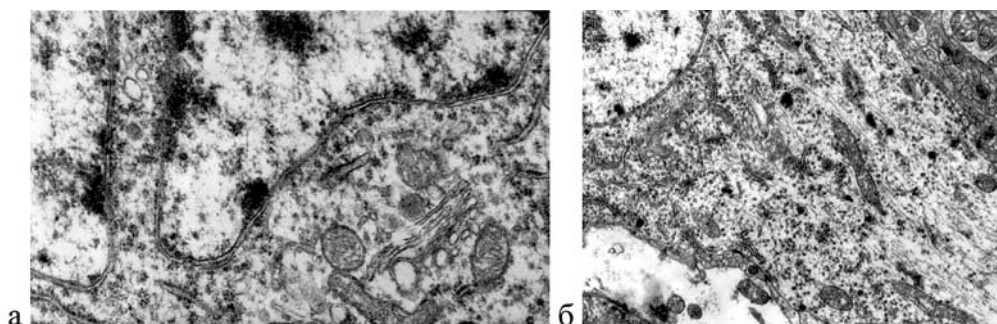
Рисунок 2

Влияние ЛИГМ на ультраструктуру нервных клеток теменной доли коры головного мозга кроликов: реактивные изменения ядра, расширение крист гранулярной сети, набухание митохондрий. Ув. 7200

перераспределение полисом, расширение (вплоть до вакуолизации) гранулярного и агранулярного эндоплазматического ретикулума, набухание митохондрий с разрушением крист. В некоторых нервных клетках наблюдалось почти полное просветление цитоплазмы, разрушение органелл и появление миелиновых телец (рис. 2).

У животных после моделирования ЛИГМ без лечения наблюдали ряд изменений структур ГЭБ. В первую очередь происходило уменьшение просвета капилляров и их окклюзия вследствие набухания эндотелиальных клеток, которые выпячивались в сторону просвета капилляра, а также из-за давления на стенку сосуда набухших астроцитарных отростков. Последние имели пониженную электронную плотность цитоплазмы и редуцированное количество органелл (рис. 4 а). В просветленной цитоплазме астроцитарных «ножек» митохондрии, как правило, были набухшими, а их кристы частично разрушенными. Иногда к поврежденным капиллярам прилегали несколько измененные перicyты и периваскулярные отростки астроцитов с сохраненной ультраструктурной организацией. Базальная пластинка большинства сосудов не претерпевала существенных изменений.

При выраженности деструктивных процессов в капиллярах наблюдалась пролиферация астроцитов вокруг поврежденных микрососудов и погружение патологически измененных частей капиллярной стенки в астроцитарные отростки, что свидетельствует о высокой реактивности перикапиллярных астроцитов и их участии в механизмах быстрой ликвидации поврежденных фрагментов микрососудов. Отмечалась также некоторая пролиферация астроцитарных ножек вокруг частично спавшихся микрососудов (рис. 4 б). Ряд авторов также отмечают подобную реакцию со стороны астроцитов после 5-минутной клинической смерти от кровопотери, выраженное уменьшение объема межклеточных щелей в результате перераспределения воды из вне- во внутриклеточный сектор ткани мозга [22].

**Рисунок 3**

Нервные клетки теменной доли коры головного мозга кроликов, подвергшихся ЛИГМ + курс ВЛОК: образование ядер лопастей и углублений (а), сохранность органелл клетки с повышением плотности полисом (а, б), увеличением количества цистерн гранулярной сети с радиальным направлением (б). Ув.: 14000 (а); 9800 (б)

В постишемическом периоде в группе с использованием ВЛОК не отмечалось развития тяжелых деструктивных изменений исследуемой области коры ГМ кроликов (рис. 3). Ядра у части нейронов имели округлую форму с ровными контурами и светлой кариоплазмой, у других – с некоторой конденсацией хроматина у внутренней мембраны, у третьих ядра имели небольшие выпячивания, у четвертых – углубления с конденсацией полисом в складках ядра. Цитоплазма практически у всех нейронов отличалась повышенной по сравнению с нормой плотностью полисом, увеличением количества цистерн гранулярной и агранулярной сети по всей клетке. Трубочки этой сети у части нейронов располагались радиально либо как бы опоясывая ядро. Наблюдалось увеличение количества мелких митохондрий. В нейропиле обращало на себя внимание наличие значительно большего по сравнению с контрольными сериями количества немиелинизированных отростков. Подобные изменения, очевидно, следует рассматривать как проявление регенеративных процессов. Структура ГЭБ отличалась от таковой нелеченных животных. Периваскулярный отек менее выражен, цитоплазма астроцитарных ножек уплотнена, просвет капилляров выглядел увеличенным, цитоплазма эндотелиоцитов просветлена. Наблюдалось появление у части эндотелиальных клеток цитоплазматических отростков (псевдоподий) (рис. 4 в, г) – свидетельство формирования новых капилляров. Как известно, эндотелиальные клетки, которые в будущем сформируют новый капилляр, выпускают вначале псевдоподии, что позволяет заключить, что под действием ВЛОК происходит образование новых микрососудов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ВЛОК излучением ИК лазера ($\lambda = 0,86$ мкм) с выходной мощностью 2 мВт после моделирования церебральной ишемии

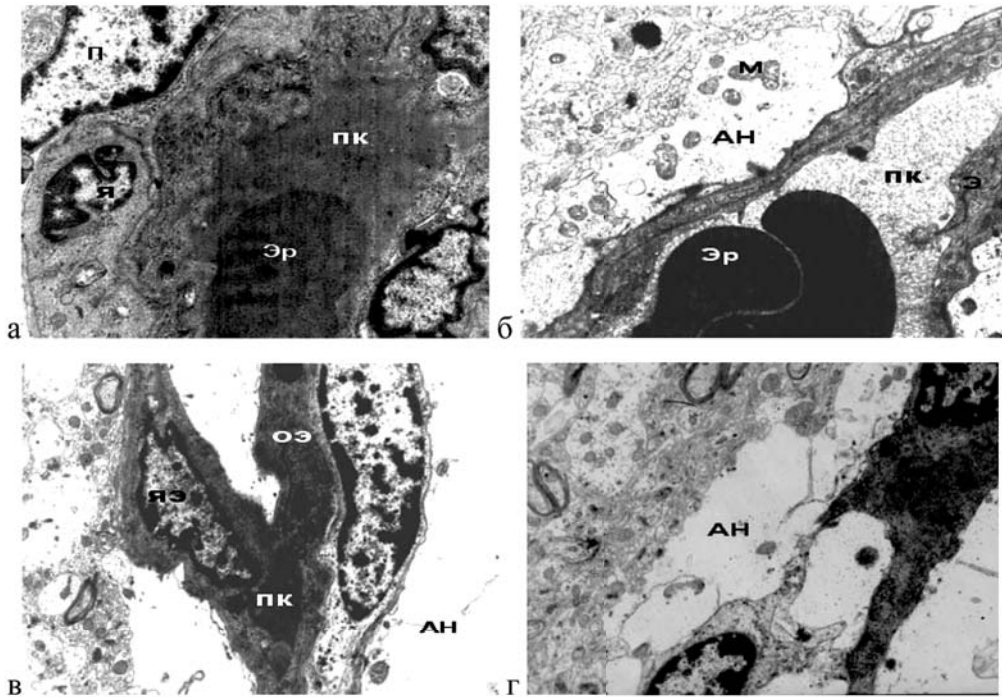


Рисунок 4

Влияние ВЛОК на состояние гемато-энцефалического барьера теменной доли головного мозга кролика при экспериментальной ишемии.

Эр – эритроцит в просвете капилляра; ЯЭ – ядро эндотелиоцита; АН – астроцитарные ножки; ОЭ – отростки эндотелиоцита; ПК – просвет капилляра; М – митохондрии; П – перicyт. а, б – постишемический период, в, г – постишемический период после проведения 5 сеансов ВЛОК. (Ув. а, б, г – 7200, в – 4800)

оказывает благоприятный эффект на состояние процессов липопероксидации и гидроионного баланса в организме, стимулирует антиокислительную систему крови. Как известно, воздействие НИЛИ приводит к увеличению активности каталазы и СОД [7, 9]. Наряду с этим нами выявлена чувствительность тиолдисульфидной системы на воздействие ВЛОК, что проявилось увеличением активности ГП в постишемическом периоде и у облученных интактных животных. К положительному эффекту лазерной гемотерапии относится и нормализация уровня вторичных продуктов ПОЛ. Установленное нами противоотечное действие можно отнести к одному из важнейших эффектов НИЛИ наряду с его влиянием на иммунный статус, процессы ПОЛ, микрогемоциркуляцию и состояние гемостаза [10, 14, 18, 19].

Выявленный эффект снижения степени интерстициального и внутриклеточного отека под действием ВЛОК может быть обусловлен не только повышением антиокислительного потенциала, но и активаци-

ей трансэндотелиального транспорта и восстановлением нарушенной структуры ГЭБ за счет усиления пролиферативной активности эндотелиальных клеток, обеспечивающей формирование новых микрососудов (неоваскулогенез).

Результаты ультраструктурных исследований позволяют заключить, что в условиях данной модели церебральной ишемии ВЛОК излучением ИК лазера мощностью 2 мВт не только предотвращает развитие деструктивных процессов, но и активирует репаративные резервы клеток, стимулируя процессы регенерации. Это можно отнести к одному из важнейших механизмов действия НИЛИ, запускающего процессы внутриклеточной и клеточной регенерации в ЦНС, что имеет большое значение в развитии саногенетических реакций у больных с острой и хронической ишемией головного мозга.

■ РЕЗЮМЕ

Изучены ультраструктура нейронов и ГЭБ теменной области коры головного мозга, состояние перекисного окисления липидов и водно-электролитного баланса в организме на 5-е сутки после моделирования локальной церебральной ишемии у кроликов в условиях внутривенного лазерного облучения крови (ВЛОК) излучением ИК лазера с $\lambda = 0,86$ мкм и выходной мощностью 2 мВт.

Установлено, что ВЛОК излучением ИК лазера в постишемическом периоде приводит к дегидратации мозговых структур, нормализации уровня ТБК-продуктов, реактивации глутатионпероксидазы, стимуляции процессов регенерации нейронов и восстановлению нарушенной структуры ГЭБ за счет усиления пролиферативной активности эндотелиальных клеток, обеспечивающей формирование новых микрососудов – неоваскулогенез. Выявленные эффекты относятся к важнейшим механизмам действия низкоинтенсивного лазерного излучения, способствующим поддержанию структуры и функции биомембран, запускающим процессы клеточной регенерации в ЦНС в постишемическом периоде, что имеет большое значение в развитии саногенетических реакций у больных с острой и хронической ишемией головного мозга.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Бадалян А.В. Применение лазерной гемотерапии в комплексном лечении острых экзогенных отравлений: Автореф. дис. ...канд. мед.наук. – М., 1998.
2. Беляева И.А., Гусев Е.И., Чехонин В.П. и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1999. – № 8. – С. 57–62.
3. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. – М., 1976.
4. Бриль Г.Е., Бугаева И.О. // Современные достижения лазерной медицины и их применение в практическом здравоохранении: Матер. научн.-практ. конф. – М., 2006. – С. 165.

5. Бриль Г.Е., Гаспарян Л.В. // Современные достижения лазерной медицины и их применение в практическом здравоохранении: Матер. научн.-практ. конф. – М., 2006. – С. 166.
6. Виленский Б.С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение. – СПб., 2002.
7. Волотовская А.В. Мембраноклеточные эффекты лазерного облучения крови (эксперим.-клин. исслед.): Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Минск, 2001.
8. Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. // Лаб. дело. – 1987. – № 2. – С. 721–723.
9. Гончарова Л.Л., Покровская Л.А., Ушкова И.Н., Малькова Н.Ю. // Международные медицинские обзоры. – 1994. – № 1. – С. 15–19.
10. Грунина Е.А. Перекисное окисление липидов в оценке эффективности внутрисосудистой лазерной терапии: Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Ярославль, 1994.
11. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. – М., 2001.
12. Джибладзе М.И., Учаншвили С.Г. // Laser and Health 97: 1st Intern. Congr. Limassol, 1997. – P. 14.
13. Кепеть В.А., Катько В.А., Проценко Е.Ю. и др. // Здравоохранение. – 2001. – № 5. – С. 39–42.
14. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В. и др. // Бюл. эксперим. биол. – 1997. – Т. 123. – № 4. – С. 395–398.
15. Козель А.И., Попов Г.К. // Вестн. РАМН. – 2000. – № 2. – С. 41–43.
16. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. – Мн., 1976.
17. Костюк В.А., Потапович А.И. // Вопр. мед. химии. – 1987. – № 3. – С. 115–118.
18. Маслова Г.Т., Нечипуренко Н.И. // Вестн. БГУ. – 2005. – № 2. – С. 37–41.
19. Мусиенко Ю.И. Кислородтранспортная функция крови и показатели гемостаза при церебральной ишемии в условиях лазерной гемотерапии (эксперим.-клин. исслед.): Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Мн., 2005.
20. Нечипуренко Н.И., Власюк П.А., Грибоедова Т.В. Актуальные проблемы неврологии и нейрохирургии: Сб. науч. тр. – Минск, 1999. – Вып. 1. – С. 83–92.
21. Нечипуренко Н.И., Маслова Г.Т. Актуальные проблемы неврологии и нейрохирургии: Сб. науч. тр. – Мн., 2001. – Вып. 3. – С. 104–112.
22. Семченко В.В., Степанов С.С., Алексеева Г.В. – Постаноксическая энцефалопатия. – Омск, 1999.
23. Танин А.Л. Восстановление функции периферических нервов после нейрорафии под влиянием лазерной гемотерапии (эксперим.-клин. исслед.): Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Мн., 2003.
24. Чичук Т.В., Страшкевич И.А., Клебанов Г.И. // Вестн. РАМН. – 1999. – № 2. – С. 27–32.
25. Habeeb A.F. // Methods in Enzymology. – 1972. – Vol. 25. – P. 457–464.