

На правах рукописи

**МЕЛЬНИК ЮЛИЯ ЮРЬЕВНА**

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОРЫ ТЕМЕННОЙ ДОЛИ БОЛЬ-  
ШОГО МОЗГА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СИНДРОМА РЕЙЕ И КОРРЕКЦИИ ЕГО  
ГЕПАТОПРОТЕКТОРАМИ**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология

**А в т о р е ф е р а т**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2003

Работа выполнена в Сибирском государственном медицинском университете, г. Томск

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор            Суходоло Ирина Владимировна  
доктор медицинских наук, профессор        Венгеровский Александр Исаакович  
заслуженный работник высшей школы РФ

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор        Байтингер Владимир Францевич  
доктор медицинских наук, профессор        Суслов Николай Иннокентиевич

Ведущая организация: Новосибирская государственная медицинская академия

Защита состоится « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2003 г. в \_\_\_\_\_ ч на заседании диссертационного совета Д 208.096. 03 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 63450, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научной медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Герасимов А.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы.

Синдром Рейе развивается в связи с применением у детей противовоспалительных и противогистаминных лекарственных средств на фоне вирусных инфекций и проявляется как острая энцефалопатия в сочетании с тяжелой жировой дегенерацией печени [Reye R. et al., 1963]. Летальность при этом заболевании достигает 85% [Casteels-Van Daele M. et al., 2000; Sutliff R. et al., 2000; Thabet F. et al., 2002]. В патогенезе синдрома Рейе ведущую роль играет нарушение митохондриального  $\beta$ -окисления среднецепочечных и длинноцепочечных жирных кислот в следствие недостатка карнитина в гепатоцитах [Kakuda T. N. et al., 2000; Szewczyk A. et al., 2002].

Наиболее близкой по структурно-метаболическим проявлениям к синдрому Рейе экспериментальной моделью данной патологии является поражение печени и головного мозга, вызванное 4-пентеновой (аллилуксусной) кислотой [Glasgow A., Chase H., 1975]. Это токсическое вещество, связывая свободный карнитин в неактивный комплекс, нарушает утилизацию жирных кислот и вызывает метаболические расстройства, характерные для синдрома Рейе [Sakaida N. et al., 1990; Sugimoto T. et al., 1990].

Недостаточная эффективность современных методов фармакотерапии синдрома Рейе и высокая летальность при этом заболевании определяют необходимость создания лекарственных препаратов, которые за счет нормализации функций печени и восстановления ее детоксицирующей активности сдерживали бы прогрессирование энцефалопатии.

На кафедрах фармакологии и фармацевтической технологии Сибирского государственного медицинского университета совместно с Томским институтом химии нефти СО РАН и Тихоокеанским институтом биоорганической химии ДВО РАН были созданы гепатопротекторы эплир (комплекс фосфолипидов, сульфолипидов, тиолов и каротиноидов илового осадка), лохеин (экстракт травы интродуцированного сибирского растения солянка холмовая, содержащий бетаин, флавоноиды, стерингликозиды и алкалоиды) и максар (полифенолы древесины дальневосточного растения маакия амурская), которые проявляют при токсическом гепатите более высокую терапевтическую эффективность, чем зарубежные гепатопротекторы эссенциале и легалон [Саратиков А. С., Венгеровский А. И., 1995].

Необходимо изучить влияние данных гепатопротекторов на течение экспериментального синдрома Рейе и выбрать препарат, способный наиболее эффективно нормализовать функции печени и предотвращать поражение эндогенными токсинами головного мозга.

### Цель исследования.

Оценить морфофункциональное состояние коры теменной доли большого мозга крыс при моделировании синдрома Рейе и коррекции его гепатопротекторами эплиром, лохеином, максаром, эссенциале и легалоном.

### Задачи исследования.

1. Изучить морфофункциональные нарушения в коре большого мозга крыс при двух моделях синдрома Рейе (интоксикация 4-пентеновой кислотой и ацетил-

салициловой кислотой на фоне действия пирогенала) с целью выбора модели, адекватной данной патологии.

2. Оценить терапевтическое действие лохеина, максара и легалона, введенных в течение 7, 14 и 30 дней после окончания интоксикации 4-пентеновой кислотой, на морфофункциональное состояние кровеносного русла коры головного мозга крыс при экспериментальном синдроме Рейе.

3. Оценить терапевтическое действие эплира и эссенциале, введенных в течение 7, 14 и 30 дней после окончания интоксикации 4-пентеновой кислотой, на морфофункциональное состояние кровеносного русла коры головного мозга крыс при экспериментальном синдроме Рейе.

4. Установить эффективность действия гепатопротективных средств на морфофункциональное состояние нейронов и нейроглии коры большого мозга крыс в условиях токсического воздействия 4-пентеновой кислоты.

5. Сравнить терапевтическую эффективность лохеина, максара, эплира, эссенциале и легалона при экспериментальном синдроме Рейе.

### **Научная новизна работы.**

Впервые установлено, что в коре головного мозга крыс при интоксикации 4-пентеновой кислотой возникает комплекс морфофункциональных изменений, которые моделируют энцефалопатию, характерную для синдрома Рейе. Адекватной моделью синдрома Рейе является интоксикация 4-пентеновой кислотой в дозе 20 мг/кг при внутрибрюшинном введении в течение 7 дней. Изменения ангио- и цитоархитектоники в коре головного мозга крыс, возникающие при введении 4-пентеновой кислоты в дозе 50 мг/кг через 4 ч 10 раз или ацетилсалициловой кислоты на фоне инъекции бактериального липополисахарида пирогенала, в большей степени отличаются от морфофункциональных проявлений синдрома Рейе. В течение 30 дней после прекращения инъекций 4-пентеновой кислоты не происходит спонтанного восстановления морфофункциональных показателей коры большого мозга.

Гепатопротекторы эплир, лохеин, максар, эссенциале и легалон проявляют высокую терапевтическую активность при экспериментальном синдроме Рейе. Терапия экспериментальных животных этими препаратами в течение 7, 14 и 30 дней, сопровождается регрессом морфофункциональных нарушений в коре большого мозга, вызванных интоксикацией 4-пентеновой кислотой.

Эффект гепатопротекторов при экспериментальном синдроме Рейе зависит от продолжительности фармакотерапии: максимально выраженное лечебное действие регистрируется при введении гепатопротекторов в течение 30 дней. Максар в большей степени, чем другие гепатопротекторы, уменьшает морфофункциональные нарушения в коре большого мозга крыс при экспериментальном синдроме Рейе.

### **Практическая значимость работы.**

Экспериментально обоснована целесообразность включения лохеина, максара, легалона, эплира и эссенциале в комплексную фармакотерапию синдрома Рейе. Гепатопротекторы, уменьшая нарушения метаболизма паренхимы печени, ослабляют симптомы токсической энцефалопатии при модели синдрома Рейе.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Внутривнутрибрюшинное введение крысам 4-пентеновой кислоты или инъекции ацетилсалициловой кислоты через 1 ч после введения пирогенала позволяют воспроизвести морфофункциональные нарушения в коре большого мозга, характерные для синдрома Рейе. Наиболее адекватной моделью синдрома Рейе является интоксикация 4-пентеновой кислотой в дозе 20 мг/кг в течение 7 дней.

2. Гепатопротекторы лохеин, максар, легалон, эплир и эссенциале, вводимые животным в течение 7, 14 и 30 дней на фоне интоксикации 4-пентеновой кислотой, стабилизируют функции печени и предохраняют головной мозг от развития токсической энцефалопатии.

3. Максар и эссенциале в большей степени, чем другие гепатопротекторы, оказывают положительное влияние на течение экспериментального синдрома Рейе у крыс (интоксикация 4-пентеновой кислотой).

4. Лучшие результаты терапии модели синдрома Рейе у крыс достигаются при введении гепатопротекторов в течение 30 дней.

### **Апробация и публикации.**

Материалы настоящего диссертационного исследования докладывались и обсуждались на конференции, посвященной 70-летию заслуженного деятеля науки РФ, профессора А.И. Рыжова (г. Томск, 1999), межрегиональной научной конференции Сибири и Дальнего Востока, посвященной 150-летию академика И.П. Павлова (г. Томск, 1999). По теме диссертации опубликовано 7 работ.

### **Объем и структура работы.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, посвященного строению коры большого мозга крыс в норме и при патологии, патогенезу и клинике синдрома Рейе, 4-х глав, отражающих результаты экспериментальных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 158 с., иллюстрирована 36 таблицами, 18 фотографиями. Библиография включает 266 источников, из них – 121 зарубежный.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Эксперименты проводили в осенне-зимние сезоны на 480 белых беспородных крысах-самцах массой 200-220 г. Животные находились в стандартных условиях вивария, в параллельно исследуемых группах (по 20 крыс) имели одинаковую массу тела, контролируемую ежедневным взвешиванием для коррекции вводимой дозы препаратов. Все манипуляции (взвешивание, введение препаратов, умерщвление животных) осуществляли с 9 до 12 ч.

Исследовали две экспериментальные модели синдрома Рейе у крыс:

- 1) интоксикация 4-пентеновой кислотой;
  - а) крысам вводили внутривнутрибрюшинно 4-пентеновую кислоту в дозе 20 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 суток [Sakaida N. et al., 1990];
  - б) животным вводили внутривнутрибрюшинно 4-пентеновую кислоту в дозе 50 мг/кг, 10 раз через 4 ч [Sugimoto T. et al., 1990];

2) интоксикация ацетилсалициловой кислотой на фоне действия бактериального липополисахарида пирогенала.

Животным, не получавшим в течение 1 суток пищи, вводили внутривентриально пирогенал в дозе 0,2 мг/кг и спустя 1 ч – ацетилсалициловую кислоту (аспизол, “Bayer”) в дозе 50 мг/кг однократно [Kilpatrick L. et al., 1989].

В результате проведенных исследований, была выбрана адекватная модель синдрома Рейе – интоксикация 4-пентеновой (аллилуксусной) кислотой. Данная модель позволяет воспроизводить синдром Рейе, в том числе отдельные стадии патологических процессов, что подтверждается результатами морфологических и гистохимических исследований. Экспериментальный синдром Рейе можно использовать для оценки эффективности и установления механизма действия лекарственных средств, регулирующих функции печени.

Животные в течение 7 дней ежедневно получали внутривентриальные инъекции 0,5% водного раствора 4-пентеновой кислоты в дозе 20 мг/кг. С 8-го дня после начала интоксикации крысам вводили в желудок ежедневно эплир (30 мг/кг), эссенциале (80 мг/кг), лохеин (5 мл/кг, что соответствует 160 мг/кг экстрактивных веществ), максар (200 мг/кг) или легалон (200 мг/кг). Дозы препаратов являются эффективными терапевтическими [Саратиков А.С. и соавт., 2001]. Продолжительность фармакотерапии составляла 7, 14 и 30 дней (табл. 1).

Легалон применяли в виде суспензии в 1% крахмальной слизи, эплир – в виде раствора в оливковом масле, эссенциале – в ампульном растворе, лохеин – в виде жидкого водно-спиртового экстракта. Навеску максара растворяли в небольшом количестве этилового спирта, затем добавлением воды создавали тонкую суспензию вещества.

Через сутки после последнего введения препаратов крыс декапитировали под легким эфирным наркозом. У животных вскрывали черепную коробку, осматривали и извлекали головной мозг. Большой мозг фиксировали в 10% нейтральном формалине, жидкости Карнуа и замораживали в жидком азоте. Выделяли теменную область коры большого мозга, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5-7 мкм. Для оценки морфологических изменений в коре большого мозга на светооптическом уровне использовали следующие методы:

- общегистологический обзорный метод – окраска срезов гематоксилином и эозином;

- выявление хроматофильного вещества в перикарионах нейронов коры большого мозга толуидиновым синим по Nissl в соответствии с прописью НИИ мозга РАМН [Меркулов Г. А., 1969];

- дифференцированное выявление нейронов и глии на парафиновых срезах [Ромейс Б., 1954];

- определение элементов глии в коре большого мозга методом импрегнации по С. Бодиану [Ромейс Б., 1954];

Для анализа функциональных изменений в коре теменной доли применяли гистохимические методы. Внутриклеточную активность сукцинатдегидрогеназы

(СДГ),  $\text{NADH}_2$ - и  $\text{NADPH}_2$ -тетразолийредуктаз,  $\beta$ -оксибутиратдегидрогеназы ( $\beta$ -ОБДГ) выявляли тетразолиевым методом по S. Loyda. Активность кислой фосфатазы (КФ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли методом одновременного азосочетания по M. Burstone [Лойда З. и соавт., 1982].

Количественную оценку продуктов ферментативных реакций проводили одноволновым методом с помощью цитофотометра ЛЮАМ-И-3 с объективом 40, размером зонда 0,1 мм в проходящем свете с длиной волны 576 нм. Все данные выражали в условных единицах оптической плотности [Журавлева Т. Б., Прочуханов Р. А., 1978]:

$$A = \lg I''/I,$$

где  $A$  – оптическая плотность исследуемого поля,  $I''$  – интенсивность светового потока, проходящего через предметное и покровное стекла микропрепарата, минуя срез,  $I$  – интенсивность светового потока, проходящего через окрашенные участки цитоплазмы клеток.

На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, с помощью окулярной линейки, откалиброванной объект-микрометром, измеряли диаметр просвета капилляров головного мозга, среднее количество нейронов, суммарной и перинейрональной глиии.

Для оценки реактивных изменений нервных клеток коры большого мозга в слоях III, IV, V на парафиновых срезах, окрашенных толуидиновым синим, подсчитывали процент нейронов с очаговым, тотальным хроматолизом и пикноморфных нейронов на 500 нервных клеток каждого слоя от каждого животного. С помощью окулярного микрометра АМ-9-2 при 630-кратном увеличении микроскопа на срезах коры большого мозга, окрашенных 0,1% раствором толуидинового синего, оценивали объем ядра и цитоплазмы нервных клеток.

Дифференциальным методом для глиальных элементов определяли процентное отношение олигодендроцитов и астроцитов. На срезах, импрегнированных по С. Бодиану, оценивали изменение цитоархитектоники слоёв III, IV, V коры большого мозга, а также характер пролиферации глиальных элементов.

Цифровой материал обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики [Автандилов Г. Г., 1990]. Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали t-критерий Стьюдента и критерий Манна-Уитни для несвязанных выборок. Достоверность различий принималась при вероятности  $p < 0,05$ , то есть превышающей 95%.

Статистическая обработка проведена при помощи программы STATISTICA 5.0.

### Распределение животных по экспериментальным группам

Серия эксперимента		Количество животных	Условия эксперимента
1 серия эксперимента (контроль)	Интактные животные	20	-----
	Контроль 1	20	Вода для инъекций
	Контроль 2	20	Растворители препаратов
2 серия эксперимента	4-ПК, 7 инъекций	20	4-Пентеновая кислота, 20 мг/кг 1 раз в сутки в течение 7 дней
	4-ПК, 10 инъекций	20	4-Пентеновая кислота, 50 мг/кг 10 раз через каждые 4 ч
	Ацетилсалициловая кислота +пирогенал	20	Препарат ацетилсалициловой кислоты для инъекций (аспизол, 50 мг/кг) через час после введения пирогенала (0,2 мг/кг) однократно
3 серия эксперимента (фармакотерапия синдрома Рейе)	4-ПК, спустя 7, 14, 30 дней	60	4-пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно в течение 7 дней. С 8-го дня на протяжении 7, 14 и 30 дней животные получали растворители препаратов
	4-ПК+эплир, 7, 14, 30 дней	60	4-пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно в течение 7 дней. С 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней животные ежедневно получали эплир (30 мг/кг)
	4-ПК +эссенциале, 7, 14, 30 дней	60	4-пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно в течение 7 дней. С 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней животные ежедневно получали эссенциале (80 мг/кг)
	4-ПК +лохеин, 7, 14, 30 дней	60	4-пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно в течение 7 дней. С 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней животные ежедневно получали лохеин (5 мг/кг)
	4-ПК +максар, 7, 14, 30 дней	60	4-пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно в течение 7 дней. С 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней животные ежедневно получали максар (200 мг/кг)
	4-ПК+ легалон, 7, 14, 30 дней	60	4-пентеновая кислота (20 мг/кг) ежедневно в течение 7 дней. С 8-го дня в течение 7, 14 и 30 дней животные ежедневно получали легалон (200 мг/кг)
Итого:	480		

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Экспериментальные модели синдрома Рейе*

В настоящее время известны две экспериментальные модели синдрома Рейе: интоксикация животных 4-пентеновой кислотой и интоксикация ацетилсалициловой кислотой на фоне действия бактериального липополисахарида – пирогенала.

При введении 4-пентеновой кислоты в дозе 20 мг/кг в течение 7 дней летальность крыс составляла 20%. Гистологически в коре теменной доли большого мозга определялась резкая гиперемия венозных сосудов на фоне суженных капилляров. Средний диаметр капиллярного просвета был в 2,9 раза меньше, чем в контрольной группе. В нейронах всех слоёв коры теменной доли обнаруживались набухание перикарионов и тигролиз (площадь ядра повышалась на 13%, цитоплазмы – на 14%) ( $p < 0,05$ ). В III слое возникал некроз нейронов. В периваскулярных зонах III-IV слоев регистрировались клетки-тени, число которых в 19 раз превышало количество таких клеток в контроле. Периваскулярно располагались нейроны, измененные по «темному» типу (гиперхромные нейроны). Количество «темных» клеток возрастало в 7 раз. Во всех слоях мозговой коры теменной доли наблюдалась интенсивная глиальная реакция. Количество астроцитов и олигодендроцитов на 15% превышало их количество, определенное у контрольных животных ( $p < 0,05$ ).

Введение 4-пентеновой кислоты в дозе 50 мг/кг через 4 ч 10 раз на протяжении двух суток приводило к гибели 25% крыс. У всех животных наблюдался генерализованный отек мозга, более выраженный, чем при интоксикации 4-пентеновой кислотой в дозе 20 мг/кг. Диаметр капиллярного просвета был в 3,2 раза меньше, чем у контрольных животных. Количество клеток-теней возрастало вдвое. Число гиперхромных сморщенных нейронов в II, III и IV слоях в 1,9 раза превышало количество этих клеток в контрольной группе. Большое количество нейронов находилось в состоянии отёка. Об этом свидетельствовало увеличение площади ядра и цитоплазмы на 14% ( $p < 0,05$ ). Значительные изменения в III и IV слоях регистрировались со стороны глиальных элементов. Суммарное количество астроцитов и олигодендроцитов возрастало на 25% по сравнению с их числом в контроле.

Ацетилсалициловая кислота на фоне действия пирогенала вызывала гибель 35% крыс. В коре теменной доли большого мозга капиллярный просвет уменьшался в 4,5 раза по сравнению с просветом в контрольной группе. Диаметр просвета также был достоверно меньше, чем у крыс, получавших 4-пентеновую кислоту в дозах 20 и 50 мг/кг. Во всех участках мозговой коры определялись нейроны с явлениями тотального хроматолиза, которых было в 1,9 раза больше, чем в контроле. Площадь ядра возрастала на 14%, цитоплазмы – на 15% ( $p < 0,05$ ). Количество гиперхромных нейронов повышалось вдвое. Количество астроглии и олигодендроглии увеличивалось на 19% ( $p < 0,05$ ).

Активность ферментов в пирамидных нейронах коры теменной доли при интоксикации 4-пентеновой кислотой и ацетилсалициловой кислотой на фоне действия пирогенала значительно изменялась по сравнению с активностью в контроле. Активность митохондриальных ферментов СДГ,  $\text{NADH}_2$ -,  $\text{NADPH}_2$ -

тетразолийредуктаз,  $\beta$ -ОБДГ уменьшалась на 28-84%, активность лизосомального фермента КФ возрастала на 31-33%. Активность ЩФ в эндотелиоцитах становилась в 1,8 раза меньше, чем у контрольных крыс. В наибольшей степени активность ферментов отличалась от активности в контрольной группе при интоксикации ацетилсалициловой кислотой на фоне действия пирогенала.

Таким образом, после сравнительного морфофункционального изучения коры большого мозга крыс при трёх экспериментальных моделях синдрома Рейе для исследования терапевтической эффективности и механизма действия гепатопротекторов была выбрана интоксикация 4-пентеновой кислотой в дозе 20 мг/кг в течение 7 дней, поскольку она позволяет воспроизвести синдром Рейе. Высокая летальность крыс, которым вводили ацетилсалициловую кислоту на фоне действия пирогенала или 4-пентеновую кислоту в дозе 50 мг/кг, осложняла дальнейшее изучение фармакотерапии экспериментального синдрома Рейе.

Гемодинамические нарушения в коре большого мозга при моделях синдрома Рейе обусловлены увеличением проницаемости микрососудов [Beck T. et al., 1998; Ames A. et al., 1999]. Нарушения барьерной функции, прежде всего, вызваны патологией эндотелиоцитов [Черный В. И., 1997; Abbruscato T., 2000]. Изменение адгезивных свойств эндотелиоцитов ведет к застойным явлениям в венозном русле вследствие прилипания форменных элементов и их миграции через сосудистую стенку [Vernadakis A. et al., 1998]. Недостаток кислорода вызывает сдвиг обмена веществ в анаэробную сторону, приводит к накоплению кислых метаболитов и развитию местного ацидоза. При низком значении рН наступает дегрануляция тучных клеток с высвобождением вазоактивных веществ. В результате резко повышается сосудистая проницаемость, развивается субэндотелиальный и перикапиллярный отек, увеличивается вязкость крови, изменяются ее реологические свойства, возникает агрегация форменных элементов. Наряду с увеличением проницаемости сосудистой стенки снижается ее резистентность. Этим объясняются микроочаговые и периваскулярные кровоизлияния в кору головного мозга при синдроме Рейе [Hardie B. et al., 1998; Ward M., 2000].

Механизм цитотоксического отека можно объяснить повышением проницаемости мембран клеток вследствие нарушения метаболизма эндогенных аминов и увеличения концентрации аммиака. Гипоксия и метаболический ацидоз вызывают деполяризацию клеточных мембран, в результате чего нарушаются функции специфических мембранных насосов. Увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  активирует фосфолипазу  $\text{A}_2$  с последующим высвобождением арахидоновой кислоты из комплекса мембранных липидов. Она является предшественником простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов. В процессе их синтеза образуются свободные радикалы, интенсифицирующие липопероксидацию.

Появление гиперхромных нейронов в коре большого мозга оценивается как снижение активности нервных клеток в ответ на воздействие патогенного фактора [Asinapura A. J., 1998]. Появление сморщенных (пикноморфных, гипогидратированных) нейронов при гипоксических состояниях и в постинтоксикационном периоде является универсальной реакцией нервной клетки и наиболее тяжелой формой реактивных и патологических изменений, сопровождающихся нарушениями метаболиз-

ма, тинкториальных свойств цитоплазмы и кариоплазмы [Квитницкий-Рыжов Ю. Н., 1998].

Пролиферация микроглии в коре теменной доли большого мозга при верифицированном синдроме Рейе определяется её способностью к миграции и поглощению некротизированных элементов мозговой ткани. Микроглия способна фагоцитировать значительные объемы некротически измененных клеток, волокон, патологических включений. Меньшая повреждаемость глиоцитов и перицитов по сравнению с нейронами при токсической энцефалопатии обусловлена более высокой резистентностью к интоксикации и гипоксии ядерного хроматина глиальных элементов [Гуляева Н. В., 1997; Молчанова Л. В., 1998; Крыжановский Г. Н., 1999].

У животных с верифицированным синдромом Рейе, оставленных без лечения в течение 7-30 дней, прогрессировали морфофункциональные нарушения в коре большого мозга, развившиеся после введения 4-пентеновой кислоты.

При гистологическом исследовании микроциркуляторного русла коры в группах животных, оставленных без лечения в течение 7-14 дней, диаметр просвета капилляров уменьшался на 15-20% по сравнению с диаметром у животных, исследованных сразу после окончания воздействия токсина ( $p < 0,05$ ). К 30 суткам диаметр капиллярного просвета увеличивался на 17%, хотя суженные капилляры обнаруживались во всех слоях мозговой коры ( $p < 0,05$ ). Некоторые из них не имели просвета вовсе. Эндотелиоциты набухали. Вокруг таких капилляров определялось расширение перипеллюлярных пространств.

В коре большого мозга у нелеченных животных находились нейроны с поражениями различной степени тяжести (перинуклеарный, периферический, тотальный хроматолиз и гиперхроматоз), но их количество отличалось от числа патологически измененных нейронов, определенного сразу после завершения инъекций 4-пентеновой кислоты. Через 7 дней количество клеток, подверженных перинуклеарному и периферическому хроматолизу, возрастало на 7-9%, спустя 14-30 дней – еще на 6-10% ( $p < 0,05$ ). Количество гиперхромных и тотально измененных нейронов через 7 дней уменьшалось на 11%, через 14 дней их количество повышалось на 14-10%, а через 30 дней – на 14-24% ( $p < 0,05$ ). Площадь ядра нейронов увеличивалась на 14%, и площадь цитоплазмы – на 15% ( $p < 0,05$ ). К 30 суткам площадь ядра и цитоплазмы незначительно уменьшалась. Суммарное количество астроцитов и олигодендроцитов у крыс, оставленных без лечения на протяжении 7 и 14 дней, сохранялось таким же, как у животных, у которых учет проводился сразу после окончания действия 4-пентеновой кислоты. Через 30 дней количество астроцитов и олигодендроцитов увеличивалось на 6% ( $p < 0,05$ ).

Спустя 7-30 дней после прекращения инъекций 4-пентеновой кислоты активность СДГ,  $\text{NADH}_2$ -,  $\text{NADPH}_2$ -тетразолийредуктаз,  $\beta$ -ОБДГ в нейронах теменной доли снижалась дополнительно на 54-66% по сравнению с активностью у животных, исследованных на следующий день после последнего введения токсина. Активность КФ дополнительно возрастала на 35-53%. Активность ЩФ в эндотелиоцитах увеличивалась в 2,6 раза.

В результате проведенных исследований установлено, что в группах животных с экспериментальным синдромом Рейе через 30 дней после окончания введения

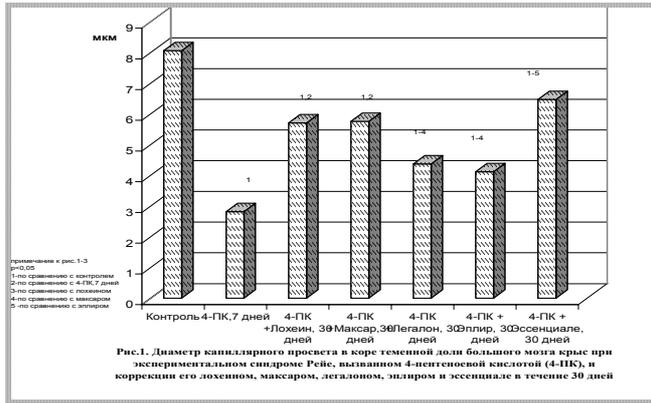
4-пентеновой кислоты наблюдались глубокие патоморфологические изменения в коре теменной доли большого мозга. Эти изменения проявлялись отеком мозговых оболочек, нарушением гемодинамики и тинкториальных свойств нейронов. Нарастание печеночно-клеточной недостаточности при модели синдрома Рейе вследствие повреждения гепатоцитов и нарушения их белковосинтетической функции, сопровождается накоплением токсических продуктов извращенного метаболизма, в первую очередь аминов, которые повреждают клетки головного мозга с развитием энцефалопатии.

***Влияние гепатопротекторов растительного происхождения при введении в течение 7, 14 и 30 дней на морфофункциональное состояние коры большого мозга крыс с экспериментальным синдромом Рейе***

Изученные нами гепатопротекторы – лохеин, максар, легалон, эплир и эссенциале обладают высокой терапевтической активностью при экспериментальном остром и хроническом гепатите, вызванном введением экспериментальным животным тетрахлометана, парацетамола, аллилового спирта, D-галактозамина [Саратиков А. С., Венгеровский А. И., 1998].

На фоне верифицированного синдрома Рейе гепатопротективная терапия препаратами растительного происхождения (лохеин, максар, легалон) не устраняла отёк головного мозга и сглаженность рельефа верхнелатеральных поверхностей полушарий. Диаметр просвета капилляров, количество патологически измененных нервных клеток, площадь ядра и цитоплазмы, присутствие нейроглии значительно отличались от показателей, определенных у крыс после окончания введения 4-пентеновой кислоты. При лечении лохеином на протяжении 7-14 дней диаметр капилляров возрастал в 1,9-2,1 раза, максаром – в 1,6-2,1 раза, легалон практически не влиял на диаметр просвета сосудов. В результате терапии лохеином в течение 30 дней просвет капилляров увеличивался в 2,4 раза, при действии максара – в 2,6 раза, легалона – в 1,9 раза. Таким образом, наиболее эффективно сужению капилляров препятствовали лохеин и максар (рис.1).

Число нервных клеток, подверженных перинуклеарному хроматолизу, при терапии лохеином в течение 7-14 дней снижалось в 1,8-2,2 раза, максаром – в 2,2-3,1 раза, легалоном – в 1,2-1,6 раза. К 30 суткам введения лохеина количество нейронов в состоянии перинуклеарного хроматолиза было меньше на 52%, при лечении максаром – на 63%, легалоном – на 36%. Количество нейронов с периферическим хроматолизом уменьшалось под влиянием лохеина в 2 раза, при введении максара – в 2,6-3,2 раза, при лечении легалоном оставалось без изменений. Через 30 дней применения гепатопротекторов в состоянии периферического хроматолиза находилось на 33-51% меньше нейронов, чем у животных, оставленных без лечения. Количество тотально измененных нейронов через 7-30 дней значительно снижалось: при терапии лохеином – в 1,6-2,2 раза, на фоне действия максара – в 2,1-2,6 раза, легалона – в 1,2-1,5 раза ( $p < 0,05$ ). Количество нейронов во всех слоях коры теменной доли большого мозга, измененных по "темному" типу (гиперхромные нейроны), при терапии гепатопротекторами растительного происхождения в течение 7 дней оставалось на таком же уровне, как при интоксикации 4-пентеновой кислотой. При тера-



пии гепатопротекторами на протяжении 14-30 дней количество «темных» нервных клеток значительно снижалось. Терапия лохеином приводила к уменьшению числа гиперхромных нейронов на 21-30%, максаром – на 30-33%, легалон – на 14-22% ( $p < 0,05$ ).

Применение лохеина и максара в течение 7-30 дней стабилизировало параметры ядра и цитоплазмы нейронов коры теменной доли мозга. Площадь ядра при терапии максаром и лохеином уменьшалась на 5-6%, цитоплазмы – на 8-11%, что достоверно отличалось от параметров у нелеченных животных ( $p < 0,05$ ). Легалон не влиял на площадь ядра и цитоплазмы.

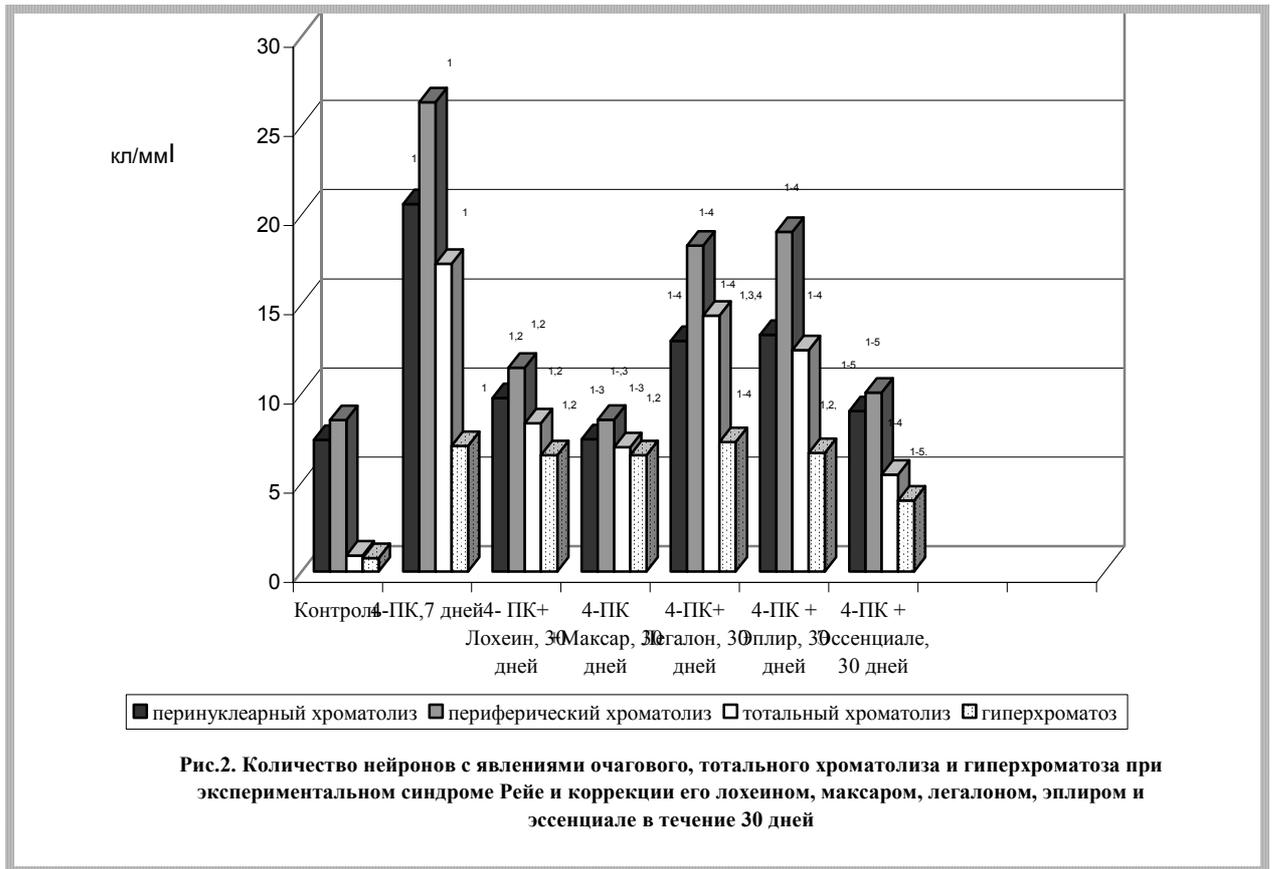
При терапии экспериментального синдрома Рейе гепатопротекторами растительного происхождения поврежденные нейроны коры теменной доли большого мозга были окружены гипертрофированной глией. Суммарное количество астроцитов и олигодендроцитов в коре теменной доли большого мозга крыс при терапии лохеином на протяжении 7-30 дней было меньше в 1,3-1,8 раза, максаром – в 1,2-1,7 раза по сравнению с присутствием перинейрональной глиии у крыс, исследованных после окончания введения 4-пентеновой кислоты ( $p < 0,05$ ). Легалон не влиял на пролиферацию глиии. Таким образом, при терапии лохеином количество элементов нейроглиии уменьшалось в наибольшей степени (рис.3).

Активность СДГ,  $\text{NADH}_2$ -,  $\text{NADPH}_2$ -тетразолийредуктаз,  $\beta$ -ОБДГ при терапии лохеином на протяжении 7-30 дней возрастала в 1,2-2 раза, в условиях действия максара – в 1,5-1,8 раза, легалона – в 1,2-1,6 раза ( $p < 0,05$ ). Активность КФ при введении гепатопротекторов полностью нормализовалась уже к 14 суткам применения препаратов, хотя при лечении легалонем на 30 день активность этого лизосомального фермента вновь увеличивалась на 25%. Активность ЩФ в эндотелиоцитах лохеин восстанавливал до нормы, максара – повышал на 50-79%, легалон – на 32-67%.

Терапия гепатопротекторами растительного происхождения экспериментального синдрома Рейе препятствовала прогрессированию патологических процессов в коре большого мозга. Препараты на протяжении 7-30 дней стабилизировали гемодинамику, уменьшали количество клеток, подверженных тотальному и очаговому хроматолизу, число гиперхромных нейронов по сравнению с показателями у животных, не получавших лечение. При терапии максаром, количество нейронов с периферическим хроматолизом было таким же, как в контроле. Активность  $\text{NADH}_2$ -,  $\text{NADPH}_2$ -тетразолийредуктаз,  $\beta$ -ОБДГ и КФ нормализовалась. Лохеин восстанавливал до нормы активность ЩФ в эндотелиоцитах сосудов.

Полифенолы лохеина, максара и легалона, проявляют антиоксидантную активность в процессе обратимого окисления восстановленных фенольных форм в хиноны. Они тормозят образование диеновых конъюгатов, оснований Шиффа, малоннового диальдегида в микросомах и митохондриях печени с сохранением ресурсов липидорастворимых антиоксидантов и функции глутатионзависимой системы [Саратиков А.С., Венгеровский А.И., 1996].

Гепатопротективная терапия животных с экспериментальным синдромом Рейе препаратами растительного происхождения в течение 30 дней в значительной степени снижает концентрацию аммиака и нормализует содержание кетоновых тел в гомогенатах головного мозга, что доказывает способность фитопрепаратов опосредованно стабилизировать метаболические процессы в нейронах [Арбузов А. Г., 2001].



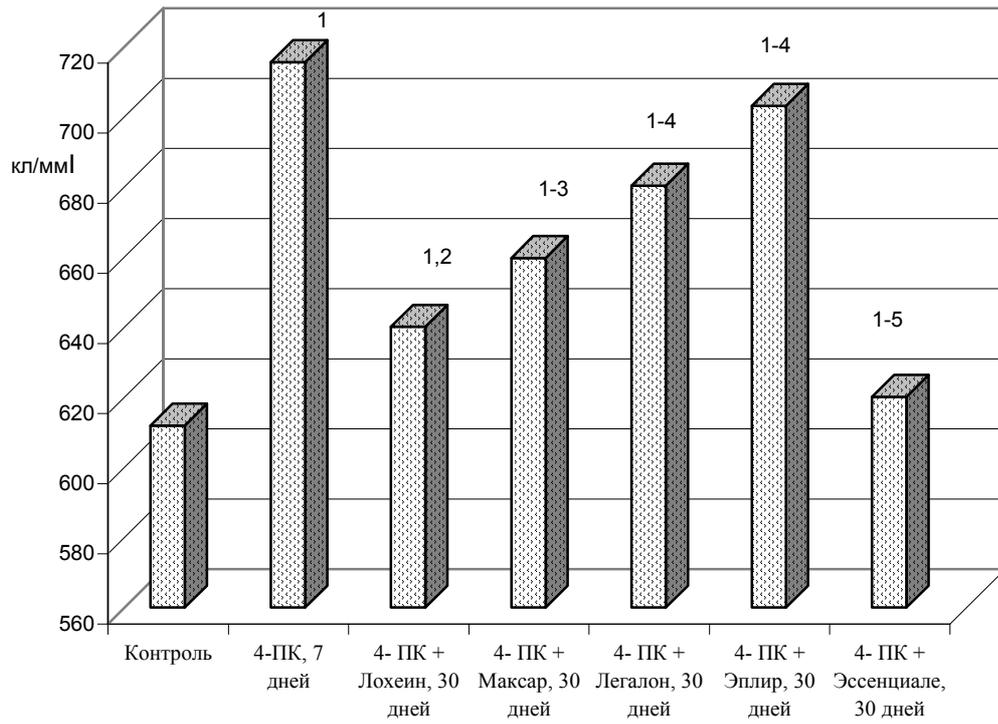
Нормализация барьерной и матриксной функций мембран гепатоцитов под воздействием гепатопротекторов растительного происхождения является эффектом, направленным на задержку в лизосомах некрозогенных гидролитических ферментов с предохранением паренхимы печени от развития некрозов. При этом предотвращается воздействие токсических метаболитов на головной мозг [Саратиков А.С., Венгеровский А.И., 1996; Nassuato G., 1998; Tyutyulkova M., 1999].

Гепатопротекторы растительного происхождения, нормализуя функции гепатоцитов, уменьшают влияние токсических метаболитов на головной мозг. При этом в крови снижаются активность ферментов-индикаторов цитолиза и холестаза –  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, а также концентрация билирубина и свободных фенолов [Саратиков А.С., Венгеровский А.И., 1996; Nassuato G., 1999; Meekin S., 1999].

***Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы при введении в течение 7, 14 и 30 дней на морфофункциональное состояние коры большого мозга крыс с экспериментальным синдромом Рейе***

Гепатопротективная терапия животных с экспериментальным синдромом Рейе препаратами, содержащими фосфолипиды, сопровождалась регрессом морфологических нарушений в коре большого мозга, вызванных 4-пентеновой кислотой. У крыс, леченных эплиром и эссенциале на протяжении 7-14 дней, диаметр просвета капилляров в коре теменной доли увеличивался в 2-2,2 и 3-3,4 раза по сравнению с диаметром, определенным после 7 инъекций 4-пентеновой кислоты. При применении эплира количество суженных капилляров сокращалось. Через 30 дней терапии эплиром и эссенциале диаметр капиллярного просвета увеличивался на 17% и 65% соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис.1).

При терапии эплиром в течение 7-30 дней число нервных клеток с признаками периферического и перинуклеарного хроматолиза было на 9-25% меньше, чем после окончания введения 4-пентеновой кислоты ( $p < 0,05$ ). Эссенциале уменьшал количество таких нейронов на 53-75%. Число нейронов в состоянии тотального хроматолиза при использовании препаратов на протяжении 7 дней оставалось таким же, как после завершения инъекций 4-пентеновой кислоты. На 14-30 дни эксперимента эплир уменьшал их количество на 13-22%, эссенциале – на 69-71% ( $p < 0,05$ ) (рис.2). В тотально поврежденных нейронах возникали отёк и распад отростков. В пирамидных нейронах наблюдались неравномерное распределение и ослабление окраски глыбок Ниссля, а также перинуклеарное или локальное их отсутствие. Ядра были просветлены, набухали. Тела клеток увеличивались в размерах. Площадь ядра и цитоплазмы нейронов через 7-14 дней была такой же, как у нелеченных животных. К 30 дню терапии эссенциале площадь ядра и цитоплазмы уменьшалась на 7% и 9% соответственно ( $p < 0,05$ ). Эплир не оказывал влияния на эти показатели нейронов. Количество гиперхромных нейронов в коре теменной доли крыс при терапии эплиром и эссенциале на протяжении 7 дней сохранялось на том же уровне, как при модели синдрома Рейе. Через 14-30 дней терапии эплиром оно становилось на 10-11%



**Рис.3. Количество макроцитарной глии при экспериментальном синдроме Рейе, вызванном интоксикацией 4-пентеновой кислотой (4-ПК) и коррекции его лохенном, максаром, легалоном, эплиром и эссенциале в течение 30 дней**

меньше, чем у животных, исследованных сразу после окончания интоксикации 4-пентеновой кислоты ( $p < 0,05$ ). Эссенциале снижал их число на 51-72% (рис.2).

Эплир при применении в течение 7-30 дней не препятствовал вызываемой 4-пентеновой кислотой пролиферации макроцитарной глиии в коре теменной доли большого мозга крыс. Эссенциале снижал ее содержание на 9-11%. На 14-30 сутки терапии эссенциале количество астроцитов и олигодендроцитов уменьшалось на 13-17% (рис. 3). При этом пролиферировала, как правило, периваскулярная глиия. Иногда в расширенных венозных сосудах встречались проникшие в них клетки микроглии.

Активность СДГ,  $\text{NADH}_2$ -,  $\text{NADPH}_2$ -тетразолийредуктаз,  $\beta$ -ОБДГ в пирамидных нейронах коры большого мозга крыс при терапии эплиром превышала на 7-36% активность, регистрируемую у животных после окончания введения 4-пентеновой кислоты. Эссенциале повышал активность этих ферментов на 63-87% (активность  $\text{NADPH}_2$ -тетразолийредуктазы и  $\beta$ -ОБДГ восстанавливал до нормы). Активность лизосомального фермента КФ при терапии эплиром уменьшалась на 6-8% ( $p < 0,05$ ), при действии эссенциале – нормализовалась. Активность ЩФ в эндотелиоцитах при введении эплира увеличивалась на 26-68%, эссенциале – на 53-71%.

Гепатопротекторы, содержащие фосфолипиды, при введении в течение 7-30 дней сдерживали развитие деструктивных процессов в коре теменной доли большого мозга крыс с экспериментальным синдромом Рейе. При терапии эплиром и эссенциале количество суженных капилляров, нейронов с тотальным, локальным хроматолизом и гиперхроматозом, присутствие нейроглии уменьшалось по сравнению с показателями у крыс, оставленных без гепатопротективной терапии на протяжении 7-30 дней.

Гепатопротекторы, содержащие фосфолипиды, стимулируют функцию эндогенных липидорастворимых антиоксидантов и глутатионзависимой антиперекисной системы гепатоцитов. Они препятствуют доступу свободных радикалов внутрь мембран гепатоцитов [Саратиков А. С., Венгеровский А. И., 1995; Кунц Э., 1997; Белобородова Э. И., 1998]. Эплир обогащает микросомы и митохондрии фосфатидилэтаноламином, устраняет действие перекисных радикалов, стимулирует синтез глутатиона [Венгеровский А. И., 1991].

На фоне интоксикации 4-пентеновой кислотой препараты фосфолипидов, стабилизируя мембраны гепатоцитов, тормозят выход ферментов в кровь, активируют глюкуронирование билирубина и свободных фенолов. Эплир и эссенциале стимулируют  $\beta$ -окисление длинноцепочечных и среднецепочечных жирных кислот в митохондриях гепатоцитов, уменьшают гиперлипидемию, восстанавливают синтез мочевины и кетоновых тел. В результате этих эффектов гепатопротекторы ослабляют токсическое действие эндогенных метаболитов на головной мозг. В гомогенатах головного мозга препараты снижают концентрацию аммиака и повышают содержание кетоновых тел [Арбузов А. Г., 2001].

Гепатопротективные средства растительного происхождения и фосфолипидной природы опосредованно, нормализуя функции печени, предохраняют головной мозг от повреждающего действия токсических метаболитов.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о возможности включения в комплексную терапию синдрома Рейе лохеина, максара, легалона, эп-лира и эссенциале.

### ВЫВОДЫ

1. При внутрибрюшинном введении крысам 4-пентеновой кислоты или инъекции ацетилсалициловой кислоты через 1 ч после введения пирогенала развивается комплекс морфологических изменений в теменной доле коры большого мозга, аналогичный гепатocereбральному синдрому (синдром Рейе).

2. Наиболее адекватной моделью церебральных проявлений синдрома Рейе является интоксикация 4-пентеновой кислотой, введенной внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг в течение 7 дней.

3. Гепатопротекторы лохеин, максар, легалон, эп-лир и эссенциале при введении внутрь животным с экспериментальным синдромом Рейе в течение 7, 14 и 30 дней, оказывают позитивное влияние на морфофункциональное состояние коры большого мозга – уменьшают количество нейронов с локальным, тотальным хроматолизом и гиперхроматозом, нормализуют параметры ядра и цитоплазмы нервных клеток, стабилизируют активность их внутриклеточных ферментов, тормозят пролиферацию нейроглии, препятствуют спазму капилляров микроциркуляторного русла.

4. Максар и эссенциале при экспериментальном синдроме Рейе достоверно эффективнее, чем другие гепатопротекторы, стабилизируют состояние микроциркуляторного русла, предохраняют нейроны коры большого мозга от глубоких деструктивных процессов, нормализуют активность внутриклеточных ферментов.

5. Эффективность гепатопротекторов при экспериментальном синдроме Рейе зависит от продолжительности терапии – наиболее значительные положительные эффекты по отношению к нейронам, глиальным элементам и сосудам головного мозга наблюдаются при введении препаратов в течение 30 дней.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Морфофункциональное состояние нейронов коры головного мозга крыс при моделировании синдрома Рейе и лечении его гепатопротекторами // Сборник трудов межрегиональной научной конференции Сибири и Дальнего Востока, посвященный 150-летию академика И. П. Павлова. – Томск, 1999. – С. 159-161.
2. Морфофункциональное состояние нейронов коры головного мозга и печени крыс при моделировании синдрома Рейе и лечении его гепатопротекторами // Сборник научных трудов, посвященный 70-летию заслуженного деятеля науки РФ профессора А. И. Рыжова. – Томск, 1999. – С. 124-127 (соавторы: Червякова М.Б.).
3. Эффективность легалона и лохеина при экспериментальном синдроме Рейе // Химио-фармацевтический журнал. – 2000. – № 4. – С. 6-8 (соавторы: Венгеровский А.И., Суходоло И.В., Чучалин В.С., Арбузов А.Г., Червякова М.Б., Гришина Е.И., Саратиков А.С.).
4. Гепатопротекторы оказывают лечебное действие при экспериментальном синдроме Рейе // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – № 5. – С.

68-71 (соавторы: Венгеровский А.И., Суходоло И.В., Чучалин В.С., Арбузов А.Г., Червякова М.Б., Гришина Е.И., Саратиков А.С.).

5. Морфофункциональные показатели гепатоцитов и нейронов коры головного мозга крыс при лечении синдрома Рейе гепатопротекторами. // Вестник СГМУ: 25 лет МБФ – 2000. – N 1. – С.72-75 (соавторы: Червякова М.Б.).

6. Структурно-метаболические нарушения в печени и головном мозге при экспериментальном синдроме Рейе // Сибирский журнал гастроэнтерологии и гепатологии. – 2002. – №14. – С. 80-82 (соавторы: Шамардина Л.А., Суходоло И. В., Венгеровский А.И.).

7. Влияние гепатопротекторов растительного происхождения на морфофункциональное состояние печени крыс при моделировании синдрома Рейе // Четвертый конгресс молодых ученых и специалистов. – Томск, 2003. – С. 184 (соавторы: Шамардина Л.А.).

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

NADH<sub>2</sub> – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида

NADPH<sub>2</sub> – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата

СДГ – сукцинатдегидрогеназа

ЩФ – щелочная фосфатаза

КФ – кислая фосфатаза

β-ОБДГ – β-оксибутиратдегидрогеназа

4-ПК – 4-пентеновая кислота