

ИНДИКАТОРНЫЙ МЕТОД КАК СПОСОБ ОЦЕНКИ ФЕНОМЕНА МОЗГОВОЙ АСИММЕТРИИ В УСЛОВИЯХ ПОЛУШАРНОЙ ИШЕМИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Макарова Л.М., Погорелый В.Е.

Пятигорская государственная фармацевтическая академия, Пятигорск, Россия

makarova.lm@mail.ru

Общеизвестно, что между полушариями головного мозга существуют морфологические и биохимические и функциональные различия. Наличие в мозге человека и животных межполушарной асимметрии, ее характер и степень выраженности во многом определяют высшие функции мозга, управление поведенческим, моторным и вегетативным статусом, резистентность организма [2].

В современной медицине аксиомой звучит то положение, что в условиях гипоксии раньше и больше других органов страдает головной мозг и конечно в первую очередь кора мозга. В ишемической ткани головного мозга развивается каскад биохимических и иммунологических нарушений нейротрансмиттерных аминокислот [1]. Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что локализация инсульта имеет существенное значение на то, каким образом будет идти реабилитационный период. При левополушарном инсульте более активно восстанавливается память, а при правополушарном — психоэмоциональная сфера. При локализации очага в левом полушарии лучше восстанавливаются межполушарные взаимоотношения, в правом — внутриполушарные.

Известно, что при поражении одного из полушарий при инсультах, функциональный дефицит компенсируется с помощью симметричных структур другого полушария [2]. В связи с этим представляется целесообразным изучить особенности формирования адаптационного синдрома в поврежденном и контрповрежденном полушарии головного мозга при моделировании лево- и правосторонней ишемии головного мозга на фоне перевязки общей сонной артерии.

Несмотря на то, что имеются различия в развитии процесса повреждения мозга грызунов, общие черты позволяют в определенной мере экстраполировать данные экспериментов на понимание механизмов повреждения головного мозга при инсульте у человека.

В экспериментальной фармакологии при изучении формирования некротического очага широкое распространение для определения зоны ишемии и некроза получил индикатор метод, который характеризуется легкостью воспроизведения, точностью, достаточной информативностью. Особенностью данного метода является то, что при про-

ведении определения зон поражения в каждом опыте используется внутренний контроль, т.е. проводится оценка зоны ишемии и зоны некроза на основе разницы между содержанием красителя в участке, подвергнувшегося инфаркту, в сравнении с его «интактной» тканью. Использование внутреннего контроля позволяет не только получить точные результаты, но и устранить негативные влияния возможных отклонений в ходе каждого эксперимента. Принцип метода заключается в определении зон некроза нервной ткани у животного на основе разницы между содержанием красителя в поврежденной гемисфере и в неповрежденной гемисфере. В качестве индикатора зоны некроза выступает трифенилтетразолия хлорид, который при взаимодействии с участками ткани, сохранившими лактатдегидрогеназную активность, восстанавливается в формазан, имеющий ярко-красный цвет, что позволяет определить его количественное содержание спектрофотометрически, предварительно экстрагировав его хлороформом [3,4].

При проведении данных экспериментальных исследований мы придерживались принципа гуманного обращения с животными. У наркотизированных крыс-самцов линии Вистар, массой 250-300 г под хлоратгидратным наркозом (300 мг/кг) вызывали одностороннюю ишемию головного мозга перевязкой общей сонной артерии (левой или правой). В опытах было использовано 3 группы животных по 12 особей в каждой: в 1-й группе у крыс-самцов перевязывали левую общую сонную артерию, во 2-й группе у крыс-самцов – правую общую сонную артерию, в 3-й группе (контрольной) – находились ложнооперированные животные (ЛО).

Через 72 часа после окклюзии общей сонной артерии крыс декапитировали, быстро промывали мозг изотоническим раствором натрия хлорида, проводили разделение полушарий по средней линии, помещали в морозильную камеру (температура – 18° С). Замершие полушария головного мозга взвешивали, равномерно разрезали на 6-8 частей и помещали в бюкс. Добавляли фосфатный буфер (37 ° С), содержащий трифенилтетразолия хлорид (100 мг на 100 мл) раствора в весовом соотношении ткани мозга и буферного раствора 1:9. Бюксы помещали в термостат инкубировали в течение 90 минут (37 ° С) с целью восстановления соли трифенилтетразолия хлорида при взаимодействии с участками мозга, сохранившими дегидрогеназную активность, в красный формазан. Экстракцию красителя, проводили хлороформом (на 1 мл каждого гомогената добавляли 5 мл хлороформа) в течение 20 минут при температуре 4° С, стряхивая смесь каждые 5 минут по 30 с. Затем отделяли слой хлороформа центрифугированием (1500 об/мин, 5 мин). Концентрацию формазана определяли спектрофотометрически ($\lambda=490$

нм) на спектрофотометре СФ- 46 дважды – сразу и спустя 24 ч после после инкубирования гомогената. Количественное содержание формазана (мкг) определяли по калибровочному графику и рассчитывали на 1 г ткани мозга.

Использование «внутреннего контроля» (т.е. определение количества образовавшегося красителя в контрольном поврежденном полушарии) позволяет минимизировать отклонения в степени окрашивания ткани красителем, которые могут быть связаны как с различными функциональным состоянием неповрежденной ткани, так и с рядом других факторов.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью пакета программ Biostat на персональном компьютере IBM PC. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – среднеквадратичное отклонение. Для доказательства значимости различий средних арифметических между двумя эмпирическими совокупностями для выборок, имеющих распределение, не отличающееся от нормального, использовали критерий Стьюдента и Фишера. При сравнении выборок с попарно связанными вариантами использовали парный критерий Стьюдента. Значимость различий между несколькими исследуемыми группами оценивали по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони [5].

Проведенный статистический анализ свидетельствует, что у ложнооперированных животных не выявлено статистически значимых отличий в содержании формазана в левом полушарии относительно правого (табл.).

Таблица – Концентрация формазана в поврежденном и контрольном поврежденном полушариях, их изменения (%) в поврежденной гемисфере относительно контрольного поврежденной

Показатели	Количество формазана мкг/ 1 г ткани мозга		% поврежденной гемисфере относительно контрольного поврежденной	
	А	Б	А	Б
Ложнооперированные животные				
Левая гемисфера	75,1±4,0	81,3±3,7	- 6,7±4,0	- 3,7±5,0
Правая гемисфера	79,9±5,2	84,6±3,5		
Перевязка левой сонной артерии				
Левая гемисфера	52,9±3,0*	59,5±2,2*	- 43,9±5,1*	- 36,4±4,3*
Правая гемисфера	70,2±1,4	80,0±1,4#		
Перевязка правой сонной артерии				
Левая гемисфера	71,0±4,1	83,4±4,2#	+2,8±6,3	+13,5±6,3*
Правая гемисфера	73,5±2,0	96,3±4,4*#		

Примечание: * - достоверные сдвиги ($p < 0.05$) по сравнению с ложнооперированными животными; # - достоверные сдвиги ($p < 0.05$) опыта «А» по сравнению с опытом «Б».

А - количество формазана сразу после инкубации; Б - количество формазана спустя 24 ч после инкубации.

В тоже время следует отметить, что у отдельных особей содержание формазана в полушариях различалось: было выявлено как его снижение (на 25 %), так и увеличение (на 17%) в левой гемисфере относительно правой гемисферы. Следует отметить, что спустя 24 ч изменения в содержании формазана левом и правом полушариях были аналогичными.

Локализация ишемического очага в левой гемисфере приводит к существенному уменьшению образования формазана в поврежденном полушарии в среднем до $52,9 \pm 3,0$ мкг/1 г мозга. Так снижение изучаемого показателя на стороне повреждения в 2-х опытах из 10 составило около 50 %, в остальных опытах – до 30 % относительно соответствующего полушария у животных контрольной группы и в среднем данный показатель составлял 32,4 % (рис.).

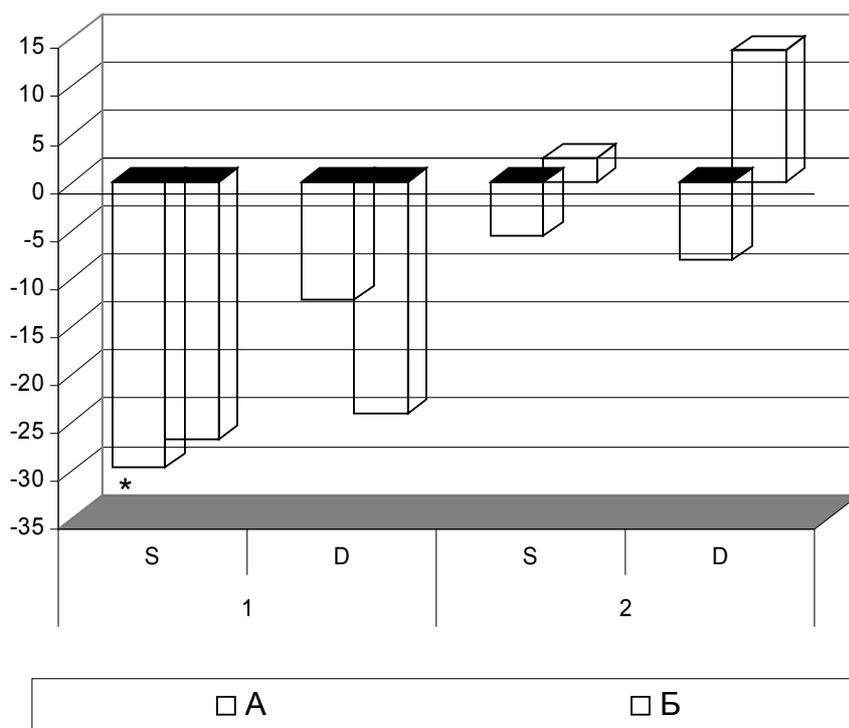


Рис . Изменения (в %) содержания формазана в левом (S) и правом (D) полушариях головного мозга при перевязке левой (1) и правой (2) общих сонных артерий относительно ложнопериоперированных животных .А - количество формазана сразу после инкубации; Б - количество формазана спустя 24 ч после инкубации.

* - обозначены статистически значимые изменения ($p < 0,05$) относительно ложнопериоперированных животных.

В правом полушарии количественное содержание формазана было аналогично содержанию в соответствующем полушарии у животных без патологии ЦНС (табл, рис). Таким образом, при перевязке общей левой сонной артерии констатировали существенную асимметрию полушарий головного мозга по способности образовывать формазан, и эти различия в среднем составили 43,9% при определении сразу после инкубации и 36,4% - спустя 24 ч после инкубации гомогената мозга (табл).

Формирование очага ишемии в правом полушарии головного мозга не вызывает изменения со стороны количества образовавшегося формазана как в поврежденной, так и неповрежденной гемисфере относительно животных контрольной группы (табл., рис.). Оценивая феномен мозговой асимметрии при перевязке общей правой сонной артерии установлено, что сразу после инкубации гомогената головного мозга значимых отличий в содержании формазана в полушариях не выявлено, а спустя 24 ч после инкубации данный показатель в поврежденном полушарии превышал показатель в контрповрежденном на 13,5% (табл.) .

Анализируя полученные результаты следует отметить, что они подтверждают многочисленные данные о том, что ишемическое повреждение левого полушария приводит к более существенным нарушениям, чем правого полушария.

Снижение образования формазана, выявленное в наших опытах косвенно указывает на снижение активности лактатдегидрогеназы, обусловленное рядом факторов. Так, ишемическое повреждение ткани сопровождается морфологическими ее изменениями, динамика которых коррелирует с патологическими изменениями в составе и метаболизме липидов, таких как ПОЛ, увеличение концентрации лизоформ фосфолипидов. Накопление этих соединений приводит к нарушению целостности клеточных мембран, что неизбежно сказывается на изменении не только их физико-химических свойств (микровязкости, проницаемости), но и функциональных характеристик рецепторов [1]. В связи этим, целесообразно проведение дальнейших экспериментальных исследований с целью выявления особенностей метаболических нарушений в левом и правом полушариях при перевязке общей сонной артерий (левой и правой), что позволит объяснить выявленные различия в концентрации формазана в поврежденном и контрповрежденном полушариях.

Таким образом, проведенные исследования по изучению выраженности некротического очага в зависимости от локализации ишемии в правой или левой гемисфере свидетельствуют:

1. Перевязка общей левой сонной артерии приводит к существенному снижению способности образовывать формазан (косвенный показатель снижения активности лактатдегидрогеназы) в поврежденном полушарии на фоне неизменной активности в контрповрежденном, что и обуславливает выраженную межполушарную асимметрию.
2. Перевязка общей правой сонной артерии не вызывает выраженных изменений со стороны лактатдегидрогеназной активности как в поврежденном, так и условно «здоровом» полушарии, что и обуславливает незначительную асимметрию полушарий мозга по способности образовывать формазан.
3. Индикаторный метод, основанный на спектрофотометрическом определении формазана в поврежденном и контрповрежденном полушарии, позволяет выявить особенности формирования мозговой асимметрии в условиях полушарной ишемии мозга.

Литература:

1. Клиническая биохимия. Под редакцией В.А. Ткачука. М.: ГЭОТАР –МЕД, 2002. 360с..
2. Михеев В.В., Шабанов П.Д. Фармакологическая асимметрия мозга. СПб.: Элби – СПб, 2007. 384с.
3. Середенин С.Б., Поварова О.В., Медведев О.В., Вальдман Е.А., Середенина Т.А. Доказательство нейропротекторных свойств афабазола на экспериментальной модели фокальной ишемии головного мозга. Экспер. и клин. фармакол. 2006.Т. 69. № 4. С. 3-5.
4. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Дифференциальный индикаторный метод определения зон ишемии и некроза при экспериментальном инфаркте миокарда. Бюл. exper. биол. 1988. № 5. С. 534-535.
5. Хафизьянова Р.Х. Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии. Р.Х. Хафизьянова, И.М Бурькин., Г.Н. Алеева.. Казань:, Медицина, 2006. 374 с.

Анкета участника

Ф.И.О.	Макарова Лариса Михайловна
Место работы:	Пятигорская государственная фармацевтическая академия
Должность, звание:	Преподаватель кафедры фармакологии, кандидат фармацевтических наук
Адрес:	357532, г. Пятигорск, просп. Калинина, 11, ПятГФА
Е- mail, телефон для связи:	makarova.lm@mail/ru 8-909-770-14-44
Название статьи, авторы:	Индикаторный метод как способ оценки феномена мозговой асимметрии в условиях полушарной ишемии в эксперименте Макарова Л.М., Погорелый В.Е.
Форма участия:	Только публикация статьи. Оргвзнос в размере 500 руб отправлен 14 октября 2010 г на имя Гесиной О.А. № перевода 15506 от Макаровой Л.М.

Анкета участника

Ф.И.О.	Погорелый Василий Ефимович
Место работы:	Пятигорская государственная фармацевтическая академия
Должность, звание:	Профессор кафедры фармакологии, доктор биологических наук
Адрес:	357532, г. Пятигорск, просп. Калинина, 11, ПятГФА
Е- mail, телефон для связи:	makarova.lm@mail/ru 8-918-7698443
Название статьи, авторы:	Индикаторный метод как способ оценки феномена мозговой асимметрии в условиях полушарной ишемии в эксперименте Макарова Л.М., Погорелый В.Е.
Форма участия:	Только публикация статьи. Оргвзнос в размере 500 руб отправлен 14 октября 2010 г на имя Гесиной О.А. № перевода 15506 от Макаровой Л.М.

