

УДК 636.028:611.815.41.

## МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ СРЕДНЕГО МОЗГА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ 2-ОКСО-1-ПИРРОЛИДИНАЦЕТАМИДА НА ФОНЕ БИЛАТЕРАЛЬНОЙ ОККЛЮЗИИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ

<sup>1</sup>Васильев Ю.Г., <sup>1</sup>Вольхин И.А., <sup>1</sup>Берестов Д.С., <sup>2</sup>Канунникова О.М.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия»,  
Ижевск, e-mail: info@izhgsha.ru;

<sup>2</sup>Физико-технический институт УрО РАН, Ижевск

Проведен анализ строения черной субстанции 234 белых крыс после острой транзиторной окклюзии общих сонных артерий и его коррекции формами пирацетама на 3, 7, 14, 30, 60 сутки после эксперимента. Механоактивация пирацетама производилась в шаровой планетарной мельнице АГО-2С. Полученный препарат подвергся рентгеноструктурному анализу порошков на дифрактометре Bruker D8 Advance с использованием CuK $\alpha$  – излучения, биохимическому и физикохимическому исследованию. Где было показано, что пирацетам изменяет конформационную структуру без изменения химической структуры вещества. Пирацетам вводили крысам в аналогичных средних терапевтических дозах 300 мг/кг. После чего выводили животных из эксперимента на 3, 7, 14, 30, 60 сутки после проведенных манипуляций. Выявлена терапевтическая эффективность применения механоактивированного пирацетама в шаровой мельнице планетарного типа в виде снижения апоптозов, уменьшения числа погибших нейронов, снижения уровня глиоза, изменений микроциркуляции.

**Ключевые слова:** средний мозг, черная субстанция, острая транзиторная ишемия, пирацетам

## MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF THE BLACK SUBSTANCE SREDNEGO BRAIN OF RATS WITH THE INTRODUCTION OF VARIOUS FORMS OF 2-OXO-1-PYRROLIDINYL ON THE BACKGROUND OF BILATERAL OCCLUSION OF THE COMMON CAROTID ARTERIES

<sup>1</sup>Vasiliev YU.G., <sup>1</sup>Volkhin I.A., <sup>1</sup>Berestov D.S., <sup>2</sup>Kanunnikova O.M.

<sup>1</sup>«Izhevsk State Agricultural Academy», Izhevsk, e-mail: info@izhgsha.ru;

<sup>2</sup>Physico-Technical Institute, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Izhevsk

The analysis of the structure of the substantia nigra 234 white rats after acute transient occlusion of the common carotid artery and its correction forms of piracetam at 3, 7, 14, 30, 60 days after the experiment. Mechanoactivation piracetam made in a planetary ball mill AGO-2C. The resulting preparation was subjected to X-ray diffraction analysis of the powder diffractometer Bruker D8 Advance using CuK $\alpha$  - radiation and fizikohimicheckomu biochemical research. Where it has been shown that the conformational changes piracetam structure without changing the chemical structure of the substance. Piracetam was administered to rats under similar high therapeutic doses of 300 mg / kg. Afterwards animals withdrawn from the experiment 3, 7, 14, 30, 60 days after the manipulations. Spotted therapeutic efficacy of piracetam in mechanoactivat planetary ball mill in the form of reduced apoptosis, reducing the number of dead neurons, reducing gliosis, microcirculatory changes.

**Keywords:** middle brain, black substance, acute transient ischemia, piracetam

Дисфункциональные нарушения, связанные с изменением сосудисто-трофического обеспечения головного мозга, являются одной из важных проблем неврологии. Эти нарушения могут возникнуть как в раннем онтогенезе, так и в позднем возрасте, проявляясь при этом выявлением ишемизированных зон, инсультами и другими нарушениями (Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001). В связи с этим важен поиск эффективных способов коррекции таких нарушений. В течение длительного времени для лечения дисциркуляторных повреждений мозга используются ноотропы, эффективность которых и по настоящее время ставится под сомнение (Варлоу Ч.П., М.С. Меннис и др. 1998). Механоактивация ноотропов, приводящая к их конформационным изменениям, может играть существенную роль в усиле-

нии терапевтического эффекта. (О.М. Канунникова, 2012).

Цель исследования – выяснить влияние пирацетама и его механоактивированной формы на морфологическое строение черной субстанции ствола головного мозга крыс после острой транзиторной ишемии.

### Материал и методы исследования

Объектами исследования служили 234 белые лабораторные крысы-самцы 6 месяцев постнатального онтогенеза на 3, 7, 14, 30, 60 сутки после билатеральной 30-минутной окклюзии общих сонных артерий (ОСА). Эксперименты над животными осуществляли в соответствии с правилами проведения работ с экспериментальными животными. Под контролем понимали животных, перенесших временную билатеральную окклюзию общих сонных артерий без последующего введения пирацетама, в первой опытной группе производили введение исходной формы

пирацетама и второй опытной группе вводили механоактивированный препарат.

Исходный пирарцетам кристаллизировали из медицинского препарата «раствор пирарцетама для внутривенного и внутримышечного вливания» (ОАО «Фармстандарт-Уфа-ВИТА», г. Уфа). Кристаллизацию проводили путем выпаривания раствора медицинского препарата при температуре 1100 °С вплоть до полного удаления жидкости. Далее порошок измельчали в агатовой ступке и дегидратировали в сушильном шкафу при 1100 °С в течение 2 часов. Исходная форма пирарцетама не подвергалась дальнейшей обработке.

Вывод из опыта животных осуществляли через 3, 7, 14, 30, 60 суток после вмешательства. Животных оперировали и осуществляли заботу под общим заклетильным наркозом в дозе препарата 50 мг/кг. Послеоперационный уход за животными и их кормление осуществлялось по стандартной методике.

Препараты окрашивали по методу Ниссля, импрегнации по Гольджи-Бюбенет, антитела к ГФКБ, каспазы-3. Морфометрический анализ осуществлялся по компактной зоне ЧС согласно рекомендациям Ю.Г. Васильева, В.М. Чучкова, с соавт. (2003). Статистическая обработка осуществлялась с помощью пакета программ «Microsoft Excel 2003». Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

### Результаты исследования и их обсуждение

К 3 суткам после временной окклюзии общих сонных артерий без последующего введения пирарцетама изменение морфо-функциональной организации черной субстанции крыс во всех случаях носили умеренно выраженный характер. Так в телах нейронов проявления реактивных ответов были нередко связаны с проявлениями сморщивания нейронов (16,8 + 0,5%), с гиперхромностью цитоплазмы и ядер. В других случаях обнаруживались проявления вакуолизации цитоплазмы на фоне гипертрофии ядрышкового аппарата, что предполагает возможное усиление функциональной активности клеток. Основными ответами в данном сроке являлись проявления гиперхромности тел нейронов. Глиоциты в целом проявляли признаки реактивности в виде гипертрофии ядер, повышении их содержания в толще ядерного центра, формировании групп из нескольких прилежащих клеток. Сосудистые реакции проявлялись в умеренно выраженных проявлениях полнокровия, с расширением как приносящих, так и выносящих сосудов, однако проявления набухания эндотелия, периваскулярного отека и иммиграция лейкоцитов проявлялась в единичном случае у животного с наиболее выраженными нарушениями в неврологической сфере. В случае применения исходного пирарцетама изменения в морфологических реакциях ядерного центра носили схожий характер. Однако имелась тенденция к незна-

чительному снижению относительного содержания гипертрофированных нейронов (с 13,9 + 0,3% в контроле к 12,4 + 0,6% в опыте 1). Применение механоактивированной формы пирарцетама при схожести качественных морфологических реакций обнаруживает некоторые количественные различия в редких нейронах. В частности, существенно снижается число вакуолизованных нейронов с проявлениями набухания ядра и распада ядрышка, что рассматривалось нами как показатель активации аутолитических процессов (13,6 + 1,0% при применении активированного пирарцетама к 17,6 + 0,4% у контрольных животных  $p < 0,01$ ), чего не обнаруживалось у животных с введением исходной формы пирарцетама (18,1 + 1,9%)

Морфология черной субстанции в контроле на 7 сутки после острой ишемической атаки проявлялась вакуолизацией значительного числа нейронов (15,6 + 3,1% по отношению к опыту 2 4,8 + 1,1%  $p < 0,05$ ), либо их сморщиванием (35,8 + 2,7% по отношению к опыту 2 24,3 + 1,7%  $p < 0,05$ ). В непосредственном окружении нередко выявлялись группы глиоцитов (астроциты, микроглия), что рассматривалось нами как проявление нейронофагии. Изучение каспазы-3 указывает на усиление проявления апоптоза в данном сроке. Так имеются единичные группы по 2–4 клетки с высоким уровнем каспазы-3. Обнаруживаются так же нейроны с умеренной либо слабой экспрессией фермента. Исследование нейроглии на 7 сутки после проведенной транзиторной окклюзии обнаруживает ответы в виде увеличения числа глиоцитов в толще ядерного центра, проявлений нейронофагии. Реактивные изменения сосудистого русла в обоих субъядрах были менее заметны, но наблюдались умеренные проявления венозного застоя и полнокровия без признаков агрегации эритроцитов, сохранение структурной организации ядер эндотелия и перицитов. К 7 суткам в первой опытной группе с введением исходной формы пирарцетама наблюдалось увеличение гипертрофированных нейронов (5,5 + 0,5%  $p < 0,05$  по отношению к контролю 3,7 + 0,2%). Во второй опытной группе с механоактивированной формой препарата морфологические изменения были более выражены по сравнению с контрольной и первой опытной группами животных. Это проявлялось увеличением числа гипертрофированных нейронов до 9,5 + 1,6%  $p < 0,05$  и увеличением количества морфологически не измененных форм нейронов с 44,9 + 3,5% в контроле до 61,7 + 2,8%  $p < 0,01$ . Эти данные подтверждались иммуногистохимическими

исследованиями, в частности, экспрессия каспазы-3. У контрольных и первой опытной группы животных наблюдалась сильно и умеренно выраженная экспрессия белка. Каспаза-3 наблюдалась как в компактной, так и в ретикулярных зонах ЧС небольшими группами, либо один – два нейрона, при этом обнаруживаясь во всех исследуемых полях зрения. Во второй опытной группе их число значительно ниже и преобладают нейроны с умеренно выраженной либо слабо выраженной экспрессией каспазы-3.

Структурная организация ЧС на 14 сутки у контрольных животных характеризуется положительной динамикой распределения популяций нейронов по сравнению с 7 сутками. В частности, существенно снижается число измененных нейронов с проявлениями сморщивания с  $29,1 + 2,5\%$  в контроле до  $11,8 + 1,7\%$   $p < 0,01$  во второй опытной группе. В то же время несколько возрастает число гипертрофированных нейронов  $5,4 + 0,4\%$  в контроле и до  $11,0 + 1,5\%$   $p < 0,05$  во второй опытной группе. Однако на этом фоне наблюдается динамическое уменьшение удельной плотности нейронов по отношению к ядру в целом, что является косвенным показателем гибели нервных клеток либо пролиферативно гипертрофических реакций нейроглии, отростков нервных клеток, отека. Это сопровождается неравномерным распределением тел нейронов, более заметное в компактной зоне черной субстанции. Изучение глиальных структур в ЧС на 14 сутки указывают на существенные реактивные изменения в нейроглии. Это проявляется в увеличении плотности ядер глиоцитов, как по сравнению с телами нейронов, так и в абсолютных показателях. Астроциты отличаются существенным разнообразием с увеличением длины и степени ветвления отростков. Эти изменения подтверждаются исследованиями ядер с помощью антител ГФКБ в частности число ГФКБ + клеток существенно возрастает как по отношению к ложноперирированным, так и по отношению к предыдущему сроку. Проявление венозного застоя существенно уменьшается, что сопровождается снижением степени расширения посткапиллярных образований, количественных показателей удельной плотности кровеносных микрососудов компактной зоны ЧС до  $24,5 + 2,8\%$  в контроле. В то же время сосудисто-капиллярные сети отличаются значительным полиморфизмом распределения капиллярных сетей, нередко извитым характером капилляров. На 14 сутки в первой опытной группе распределение нейронов обнаруживает тенденцию к снижению интенсивности

реактивных изменений. Происходит уменьшение процента вакуолизированных нервных клеток ( $11,3 + 1,9\%$  по отношению к 7 суткам  $14,9 + 2,1\%$ ), и соотношения сохранных нейронов по отношению к реактивно измененным популяциям клеток ( $74,3 + 4,4\%$   $p < 0,05$  по отношению к 7 суткам  $61,7 + 2,8\%$   $p < 0,01$ ). Как и в контрольной группе с транзиторной артериальной ишемией число нейронов существенно уменьшается, что проявляется уменьшением объемной плотности нейронов по отношению к ядерному центру в целом. Динамика глиальных ответов характеризуется пролиферативно гипертрофическими реакциями глиоцитов с увеличением числа клеток глиального ряда, пролиферация их отростков, повышенная реакция ГФКБ. Состояние сосудисто-трофического обеспечения в первой опытной группе характеризуется несколько более заметным снижением интенсивности сосудистых ответов в виде уменьшения удельного объема сосудов и длины капилляров на единицу объема. Во второй опытной группе сопровождается положительной динамикой, защитно-компенсаторными ответами на повреждающее действие деафферентации в высших центрах нервной регуляции на фоне острой транзиторной ишемии корковых центров. Это проявляется в значительно меньшем числе реактивных нейронов как в контрольной, так и в первой опытной группах. В контрольной и опытной группе выявляются отдельные клетки с высоким уровнем каспазы-3 до 2–5 клеток в поле зрения со значительным числом клеток с умеренной или слабой экспрессией каспазы-3. В целом это указывает на тенденцию к повышенной апоптотической готовности нервных клеток. Применение механоактивированного пирацетамом сочеталось со значительным уровнем уменьшения каспазы-3, обнаруживается не более 1–2 клеток с сильной экспрессией и 2–3 с сильной экспрессией белка. Количественные изменения в сосудистых образованиях нервного центра рассматриваемых сроков сопровождается превышением по некоторым количественным характеристикам контроля.

Морфологическое строение ЧС к 30 суткам у контрольных животных характеризуется неравномерным распределением тел нейронов. При этом наблюдается прогрессирующее уменьшение удельной плотности тел нейронов по отношению к ядру в целом, как в контроле ( $19,1 + 1,1\%$  по отношению к 14 суткам  $24,5 + 2,8\%$ ), так и в опытных группах данного срока. Это может быть следствием

пролиферативно-гипертрофических реакций нейропиля (ответами нейроглии, развитием отростков нейронов и т.д.) либо гибелью части нервных клеток и замещением их астроцитарным окружением. Повышается морфологическое разнообразие нейронных ансамблей, выражающееся в значительном числе клеток с более сильным развитием дендритного дерева, шипикового аппарата, нетипичной структурой форм и тел нейронов. Выявлялись пролиферативно-клеточные и гипертрофические реакции нейроглии с изменением нейроглиального отношения в сторону повышения содержания нейроглии как в контрольных ( $7,8 + 0,4$  ед. по отношению к 14 суткам  $5,8 + 0,4$  ед.), так и опытных группах. Нередко обнаруживались промежуточные формы астроцитов с увеличенной распространённостью отростков, при высокой степени их ветвления. В участках с редким расположением тел нейронов выявлялись группы астроцитов, заполняющие эти пространства, что указывало на умеренное проявление глиоза. Изменения в сосудистом русле носили преимущественно количественный характер и проявлялись в уменьшении плотности распределения сосудов ( $4,18 + 0,09\%$  по отношению к 14 суткам  $7,18 + 0,19\%$ ), также второй опытной группы  $5,94 + 0,10\%$   $p < 0,001$  к  $6,48 + 0,24\%$ .

На 30 сутки в первой опытной группе соотношение площади тел нейронов имеет тенденцию к снижению  $22,8 + 1,8$  по отношению к предыдущим срокам. Ответы нейроглии в первой опытной группе в количественном и качественном отношении близки к контрольным животным. В группе с введением активированной формы препарата наблюдалась высокая степень сохранности нейронных популяций в обоих субъядрах, что проявлялось в более высоком уровне относительного объема тел нейронов, что указывает на их высокую сохранность в ЧС. По сравнению с ложнооперированными животными значительное содержание шипиков, что в целом указывает на высокую напряженность синтетических процессов в ядре. Нейроны с высоким уровнем каспазы-3 встречаются в виде единичных клеток, имеется значительное число клеток со средним или низким уровнем экспрессии рассматриваемого белка. Нейроглиальный индекс существенно ниже  $5,7 + 0,4$  ед.  $p < 0,01$  по сравнению с животными контрольной  $7,8 + 0,4$  ед. и первой опытной группы  $6,9 + 0,3$  ед.

К 60 суткам морфологическое строение ЧС у контрольных животных характеризовалось существенным снижением удель-

ной плотности тел нейронов ( $17,2 + 0,9\%$  в контроле и до  $27,8 + 1,3\%$   $p < 0,001$  во второй опытной группе), что сопровождалось компенсаторным развитием нейроглии и проявлялось в высокой экспрессии ГФКБ, высоком нейро-глиальном отношении ( $7,9 + 0,3$  ед.). Глиоциты образовывали небольшие группы из 3–5 клеток, либо располагались одиночно, окружая тела нейронов микрососудами. Существенно повышалось разнообразие астроцитов в связи с пролиферативно-гипертрофическими ответами их отростков. Изменение ангиоархитектоники носило в основном количественный характер и проявлялись уменьшением удельной плотности сосудов ( $3,96 + 0,12\%$  по отношению к 30 суткам  $4,18 + 0,09\%$ ). Морфологические реакции проявлялись деформацией сосудисто-капиллярных сетей. Обнаруживалось значительное число закрытых капилляров с суженным просветом. Обнаружились единичные тела нейронов со значительным уровнем экспрессии каспазы-3. К концу 60 суток в группе с введением исходной формы пираретама морфофункциональные реакции по многим показателям были близки к контрольной группе и проявлялись в существенном уменьшении содержания перикарионов нейронов в обеих зонах ЧС с преимущественными реакциями в компактной зоне. Это сопровождалось проявлениями пролиферативно-гипертрофических ответов нейроглии со смещением нейроглиального индекса в сторону нейроглии. Сосудистые ответы также были близки к контрольным животным рассматриваемого срока и проявлялись в повышении полиморфизма сосудисто-капиллярных сетей за счет формирования участков сгущения и разряжения капилляров, извитой форме капиллярных сетей. Введение активированной формы пираретама, осуществляемое во второй опытной группе, сопровождалось существенными отличиями по отношению к предыдущим группам животных. Менее заметно повышение числа глиоцитов с менее выраженным смещением нейроглиального индекса в сторону глиоцитов  $6,1 + 0,2$  ед.  $p < 0,01$ . Экспрессия каспазы-3 во всех рассматриваемых группах животных, подвергшихся острой транзиторной артериальной ишемии, на 60 сутки обнаруживает минимальную экспрессию в виде единичных клеток с низким или средним её содержанием.

#### Выводы

Применение механоактивированного пираретама существенно снижает степень морфологических изменений в структу-

рах ядра, что особенно заметно в поздние сроки на фоне введения препарата. Эффективность исходной формы парацетама, сопровождалась тенденциями к уменьшению морфологических изменений, не оказывая значимого влияния на течение патологического процесса по большинству рассмотренных показателей.

#### Список литературы

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Васильев Ю.Г. Нейро-глио-сосудистые отношения в центральной нервной системе (морфологическое исследование с элементами морфометрического и математического анализа) / Ю.Г. Васильев, В.М. Чучков. – Ижевск. : Изд-во АНК. – 2003. – 164 с.
3. Варлоу Ч.П., Меннис М.С., Жван Гейн и др. Инсульт. Практическое руководство для ведения больных //Пер. с англ. – СПб. – 1998. – С. 629.
4. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. //М. -2001. – С.328.
5. Физико-химические и биологические свойства водных растворов кристаллических модификаций I, II, (II + FE) 2-оксо-1-пирролидин-ацетамида/ О.М. Канунникова, Д.С. Берестов, Ю.Г. Васильев и др.// Вест. УдГУ. 2012. № 4.-С. 082–092.

#### References

1. Avtandilov G.G. Medical morphometry. Guide. – M.: Medical, 1990. 384 p.
2. Vasiliev Yu.G. Neuro-vascular glioma relations in the central nervous system (morphological study with elements of morphometric and mathematical analysis) / G. Vasiliev, VM Chuchkov. Izhevsk. Univ ANC. 2003. 164 p.
3. Warlow Ch.P., Mennis M.S., Zhvan Gagne et al Stroke. Practical guidance for the management of patients // Per. from English. SPb. 1998. 629 p.
4. Gusev E.I. Skvortsova V.I. Cerebral ischemia. // M. 2001. 328 p.
5. Fiziko-chemical and biological properties of aqueous solutions of the crystalline modifications I, II, (II + FE)-2-oxo-1-pyrrolidine acetamide / O.M. Kanunnikova, D.S. Berastov, Yu.G. Vasiliev and others // West. UdsU. 2012. no. 4. pp. 082–092.

#### Рецензенты:

Селякин С.П., д.м.н., профессор кафедры анатомии человека ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», г. Ижевск;

Сабельников Н.Е., д.м.н., доцент кафедры анатомии человека ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», г. Ижевск.

Работа поступила в редакцию 14.08.2014.