

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК 615.23.03:616-036.882-08-039.72].015.4

**А. В. Волков, М. Ш. Аврущенко, Ю. В. Заржецкий, И. В. Назаренко, Е. А. Мутускина,
И. Е. Трубина, И. В. Саморукова**

**ВЛИЯНИЕ ПЕРФТОРАНА НА ПОСТРЕАНИМАЦИОННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ
ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва

EFFECT OF PERFTORAN ON POSTREANIMATION RECOVERY OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

A. V. Volkov, M. Sh. Avrushchenko, Yu. V. Zarzhetsky, I. V. Nazarenko, Ye. A. Mutuskina, I. Ye. Trubina, I. V.

The effect of perfluorane on survival and restorative processes in the brain were studied in rats subjected to 12-min arrest of systemic circulation. Perfluorane in a single dose of 5-10 ml/kg was injected intraperitoneally 30 min after the beginning of reanimation. The drug did not affect the postreanimation death of animals and time course of neurologic deficiency disappearance. Perfluorane activated behavioral reactions and prevented development < changes in the brain structures of rats highly sensitive to hypoxia

Основанием для проведения настоящего исследования послужили известные данные экспериментальных и клинических наблюдений о том, что в случаях остановки кровообращения в организме спустя 1 - 1,5 ч после восстановления эффективной сердечной деятельности развивается синдром низкого сердечного выброса, происходит снижение мозгового кровотока и возникают нарушения транспорта кислорода [4]. Следствием таких изменений в условиях кислородной задолженности является высокая вероятность развития повторной циркуляторной гипоксии. Поэтому можно было ожидать, что перфторан, обладающий существенной антигипоксической и противоишемической активностью [11], улучшит доставку и передачу кислорода тканям и таким образом окажет положительное воздействие на процессы постреанимационного восстановления ЦНС и организма в целом. В связи с этим в задачу настоящей работы входило исследование влияния перфторана на выживание, темпы неврологического восстановления, функциональное состояние центральной нервной системы (ЦНС) и морфологические изменения чувствительных к гипоксии образований мозга после реанимации.

Материал и методы. Работа проведена на 15 интактных и 70 подопытных крысах, перенесших 12-минутную остановку кровообращения в организме по методике В. Г. Корпачева и соавт. [8]. Оживление проводили с помощью закрытого массажа сердца и ИВЛ воздухом. В экспериментах использовали белых беспородных крыс-самцов массой 180 - 220 г. Раствор перфторана вводили 35 крысам в дозе 5-10 мл на 1 кг массы тела однократно внутривентриально через 30 мин после эффективной сердечно-легочной реанимации. У всех реанимированных крыс исследовали динамику исчезновения внешнего неврологического дефицита (НД). С этой целью ежедневно в течение 10 сут определяли тяжесть состояния по 100-балльной шкале, включающей 19 показателей, характеризующих уровень восстановления двигательного, зрительного, слухового анализаторов, реакцию на боль и ряд других показателей восстановления функций ЦНС. 100 баллов соответствовало смерти мозга, 0 баллов - полному исчезновению внешнего НД [9]. Кроме того, у каждого животного подсчитывали суммарный неврологический дефицит (СНД) в виде суммы баллов, начиная с первых суток до времени его исчезновения. В дальнейшем функциональное состояние ЦНС оценивали в течение 1 мес по поведению животных в различных тестах: "открытое поле" (ОП) (бесстрессовый вариант) [5], обучение условному пищедобывательному рефлексу на место в Т-образном лабиринте [10] и обучение условному рефлексу активного избегания (УРАИ) в челночной камере [7]. Через 1 мес после оживления животных декапитировали под эфирным наркозом для морфологического исследования мозга.

Ранее было установлено, что в постреанимационном периоде после клинической смерти разной этиологии и длительности происходят существенные изменения состояния мозга на уровне нейрональных популяций [1, 2]. При этом даже на фоне внешнего неврологического восстановления могут возникать и длительно развиваться процессы дистрофического изменения и гибели нейронов. Выявлено, что существует градация вовлечения различных элементов нейрональных популяций в постреанимационный процесс, что дает возможность с помощью морфометрического анализа количественно определять глубину повреждения мозга, а также оценивать влияние различных препаратов и методов лечения [3, 12]. В настоящей работе морфологическое исследование различных отделов мозга проводилось через 1 мес после реанимации у нелеченых ($n = 12$) и леченных перфтораном крыс ($n = 5$). Контролем служили интактные животные того же возраста ($n = 10$). С помощью метода морфометрического анализа [1] оценивали состояние высокочувствительных к гипоксии нейрональных популяций клеток Пуркинье латеральной области мозжечка, пирамидных нейронов V слоя сенсомоторной коры, пирамидных нейронов секторов CA1 и CA4 гиппокампа. Определяли общую плотность нейрональных популяций, а также их состав - число и долю в популяции морфологически измененных клеток, а также нормальных - светлых и темных нейронов, различающихся по своей чувствительности к гипоксии [1]. Учитывая важную роль глии в развитии постреанимационного процесса [2], отдельно подсчитывали нейроны с сателлитной макроглией и свободные (не имеющие сателлитной глии) нейроны.

Статистическую обработку материала проводили с использованием критерия t Стьюдента и непараметрических критериев.

Результаты исследований и их обсуждение. Введение перфторана не оказало влияния на постреанимационную гибель животных, которая составила 34% у крыс без лечения и 43% животных с лечением. Не обнаружено отличий и в динамике восстановления внешнего неврологического статуса: на 4 - 7-е сутки НД исчезал у 60% нелеченых реанимированных крыс и у 51% при лечении перфтораном.

При изучении поведения животных в тесте ОП на 5 - 6-е сутки после реанимации оказалось, что интактные и реанимированные крысы не различались по характерным для этого теста основным компонентам ориентировочно-исследовательской реакции: горизонтальной двигательной активности и вертикальным стойкам. Однако у нелеченых реанимированных крыс по сравнению с интактными была снижена специфическая для норковых животных исследовательская активность в виде заглядываний в отверстия на полу камеры (норки). У крыс, леченных перфтораном, этот показатель занял промежуточное значение между группами интактных животных и крыс без лечения, достоверно не отличаясь от обеих сравниваемых групп (табл. 1).

Таблица 1. Влияние перфторана на поведенческую активность в тесте "открытое поле"

Крысы	ВС	ГА	ЗН
Интактные ($n = 15$)	$17,3 \pm 1,6$	$185,6 \pm 15,1$	$32,1 \pm 2,8$
Реанимация ($n = 13$)	$18,6 \pm 2,5$	$174,8 \pm 13,6$	$22,0 \pm 2,2^*$
Реанимация + Перфторан ($n = 9$)	$18,7 \pm 2,1$	$187,2 \pm 24,6$	$27,3 \pm 2,1$

Примечание. ВС - число вертикальных стоек; ГА - горизонтальная активность (число пересечений сдвоенных инфракрасных лучей); ЗН - число заглядываний в норки - все эти показатели за 3 мин наблюдения; * — $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем группы интактных животных.

Снижение интенсивности специфической исследовательской активности у крыс на 2-й минуте наблюдения оказалось связанным с тяжестью гипоксического поражения мозга после реанимации. Об этом свидетельствовала наблюдаемая в этот период тестирования отрицательная корреляция между числом заглядывания в норки и СНД ($r = -0,65$, $p < 0,05$ отлична от 0). Однако в группе реанимированных животных с введением перфторана аналогичной зависимости не обнаружилось ($r = 0,19$), несмотря на близкие величины СНД, который составил $36,1 \pm 3,85$ и $41,8 \pm 3,16$ балла для нелеченых и леченых крыс соответственно. Иными словами, перфторан не только устранял различия у интактных и реанимированных крыс по показателю специфической исследовательской активности, но и разрушал корреляционную зависимость интенсивности этой формы поведения от тяжести состояния крыс в постреанимационном периоде.

Через 2 нед после реанимации при выработке пищевой условной реакции на место в Т-образном лабиринте за 4 сеанса обучения 100% выполнение реакции наблюдали у 46% интактных животных, в то время как в группе реанимированных у 92,8 и 83,3% без лечения и с лечением перфтораном соответственно ($p < 0,05$ при сравнении с аналогичным показателем в группе интактных крыс). Этот результат свидетельствовал о более быстром обучении реанимированных крыс по сравнению с интактными. Факт ускорения обучения в тесте с положительным подкреплением у крыс на определенном этапе постреанимационного периода был установлен нами ранее во многих сериях экспериментов [6] и связан с более высокой поведенческой реакцией на стимул у реанимированных крыс по сравнению с интактными. Вместе с тем введение перфторана в еще большей степени ускоряло обучение. Об этом свидетельствовало меньшее время выполнения реакции у обучившихся крыс, леченных перфтораном, по сравнению с нелечеными животными (табл. 2).

Таблица 2. Время выполнения условной пищевой реакции на место в Т-образном лабиринте в 4-м сеансе у облучившихся реанимированных крыс без лечения и леченных перфтораном.

Крысы	Время выполнения теста, с
Реанимация (n = 13)	$26,0 \pm 6,8$
Реанимация + перфторан (n = 10)	$9,4 \pm 1,9^*$

* $p < 0,05$ по сравнению с группой реанимированных крыс без лечения

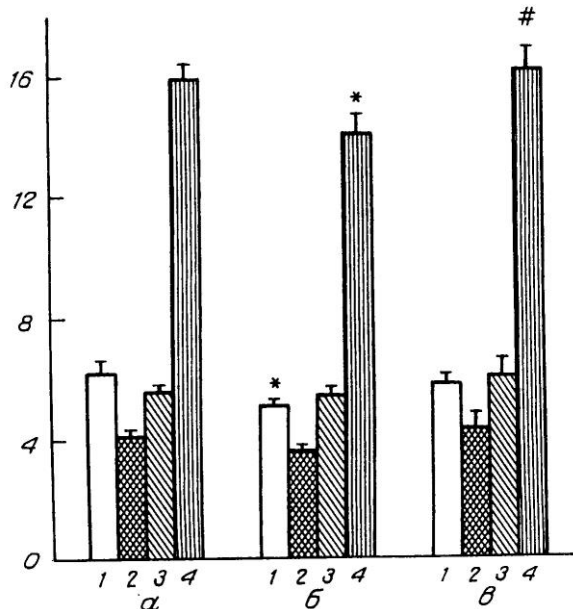
Совокупность приведенных выше данных рассматривать перфторан как препарат, оказывающий активирующее влияние на ЦНС у реанимированных крыс.

Через 3 нед после оживления исследовали способность крыс к обучению на стимул отрицательной модальности в УРАИ. Оказалось, что за 2 сеанса доля обучившихся животных во всех группах была примерно одинаковой и составила 66,7, 57,1, 58,3% в группах крыс интактных, реанимированных без лечения и с лечением перфтораном соответственно. Однако и в этом тесте в целом по группе реанимированные нелеченые крысы обучались быстрее интактных. Так, если в группе реанимированных крыс для обучения потребовалось менее 64 сочетаний условного и безусловного раздражителя у 42,8% животных, то в группе интактных - лишь у 6,7% ($p < 0,05$). По этому показателю реанимированные крысы, леченные перфтораном, заняли промежуточное положение - процент быстро обучившихся животных в этой группе составил 33,3 без достоверных различий по сравнению с другими группами. Вместе с тем в группе с введением перфторана 2 крысы на любой по величине ток реагировали замиранием, а одно животное - нецеленаправленным увеличением двигательной активности, что, видимо, было связано с их повышенной чувствительностью к раздражителю.

В результате морфологического исследования мозга через месяц после реанимации было установлено.

В популяции клеток Пуркинье мозжечка у реанимированных крыс происходило выпадение нейронов, причем гибели подвергались сравнительно более устойчивые нейроны, окруженные сателлитной макроглией. Так, у нелеченых реанимированных крыс в сравнении с интактными животными выявлено снижение общей плотности популяции (на 11,3%; $p < 0,05$) за счет уменьшения числа светлых клеток (на 17,0%; $p < 0,05$) при неизменном числе темных, а также морфологически измененных нейронов (см. рисунок). Более детальный анализ показал, что эти сдвиги связаны с уменьшением числа светлых нейронов, имеющих сателлитную глию (на 21,4%; $p < 0,025$). Этот факт подтверждается и тем, что у нелеченых животных в сравнении с интактными выявлено снижение общего числа нейронов с сателлитной глией в популяции (на 16,2%; $p < 0,025$).

У леченных перфтораном реанимированных животных не происходило выпадения клеток Пуркинье, а наблюдались лишь изменения состава популяции, связанные с переходом нормальных светлых нейронов с глией в морфологически измененное состояние, что, по-видимому, сопровождалось потерей сателлитных глиальных элементов. Так, у леченых реанимированных крыс в сравнении с интактными не выявлено снижения общей плотности популяции, однако доля светлых нейронов с сателлитной глией уменьшалась (на 15,7%; $p < 0,05$), а доля свободных морфологически измененных нейронов возрастала (на 28,8%; $p < 0,05$). Об изменении нейроглиальных взаимоотношений свидетельствует и увеличение доли всех свободных нейронов в популяции при снижении доли нейронов с сателлитной глией (на 18,8 и 9,7% соответственно; $p < 0,05$). Существенно, что леченные перфтораном реанимированные животные в сравнении с нелечеными характеризовались более высокой общей плотностью популяции (на 14,9%; $p < 0,05$) (см. рисунок).



Влияние перфторана на популяцию клеток Пуркинье мозжечка в постреанимационном периоде (1 мес после оживления)

На оси ординат: число клеток Пуркинье в 1 мм; на оси абсцисс: а – интактные крысы (контроль), б – нелеченые, в – леченые.

Светлый столбец – светлые нейроны, штриховка в клетку – темные, косая штриховка – измененные нейроны, вертикальная – общая плотность популяции. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$ по сравнению с нелечеными.

В секторе CA1 гиппокампа у нелеченых реанимированных крыс при отсутствии процесса выпадения нейронов были выявлены изменения состава популяции - переход нормальных темных клеток в морфологически измененное состояние; причем дистрофически измененные нейроны приобретали сателлитную макроглию. Так, у реанимированных нелеченых крыс в сравнении с интактными животными не обнаружено изменений общей плотности популяции, однако были выявлены достоверные изменения ее состава: доля нормальных темных клеток уменьшалась, а морфологически измененных возрастала (на 8,2 и 18,6% соответственно; $p < 0,05$). Оказалось, что это происходило в результате уменьшения в популяции доли свободных темных нейронов и увеличения доли морфологически измененных нейронов с сателлитной глией (на 11,4 и 50,0% соответственно; $p < 0,05$).

В пользу этого положения свидетельствовали и данные об увеличении во всей популяции общей доли нейронов с сателлитной глией при снижении доли свободных нейронов (на 18,9 и 5,3% соответственно; $p < 0,05$).

У леченных перфтораном реанимированных крыс в сравнении с интактными животными не обнаружено достоверных отличий по плотности и составу популяции пирамидных нейронов сектора СА1 гиппокампа. Существенно, что леченные перфтораном крысы в сравнении с нелечеными характеризовались повышенной долей нормальных темных нейронов за счет большей доли в популяции свободных темных клеток (на 13,7 и 26,2% соответственно; $p < 0,005$) и сниженной долей морфологически измененных нейронов за счет меньшей доли морфологически измененных клеток с сателлитной глией (на 12,2 и 25,9% соответственно; $p < 0,05$). При этом у леченых крыс в сравнении с нелечеными доля свободных нейронов в популяции была больше, а нейронов с сателлитной глией меньше (на 6,1 и 16,8% соответственно; $p < 0,05$).

Исследование пирамидных нейронов сектора СА4 гиппокампа показало, что у нелеченых реанимированных животных при отсутствии процесса выпадения нейронов происходят изменения состава нейрональной популяции, связанные с переходом нормальных светлых клеток в морфологически измененное состояние.

Так, у реанимированных нелеченых животных в сравнении с интактными доля светлых нейронов снижалась, а морфологически измененных клеток возрастала (на 14,2 и 16,9%; $p < 0,05$). Эти сдвиги происходили за счет уменьшения доли свободных светлых нейронов и увеличения доли свободных морфологически измененных нейронов (на 14,0 и 22,8% соответственно; $p < 0,05$).

У леченных перфтораном реанимированных крыс в сравнении с интактными животными не обнаружено изменений плотности и состава популяции пирамидных нейронов сектора СА4 гиппокампа. Существенно, что леченые животные в сравнении с нелечеными характеризовались повышенной долей светлых и сниженной долей морфологически измененных клеток (на 34,2 и 27,0%; $p < 0,05$).

Исследование нейронов V слоя сенсомоторной коры не выявило изменений общей плотности и состава этой популяции как у нелеченых, так и у леченых реанимированных крыс в сравнении с интактными.

Итак, результаты морфологического исследования свидетельствуют о том, что перфторан позволяет значительно уменьшить выраженность постреанимационных изменений, развивающихся в мозге у нелеченых животных, перенесших клиническую смерть той же длительности: предупреждает гибель нейронов в наиболее ранимой популяции клеток Пуркинье латеральной области мозжечка, а также предотвращает развитие дистрофических изменений в популяциях пирамидных нейронов секторов СА1 и СА4 гиппокампа.

В целом результаты настоящего исследования показали, что перфторан, используемый однократно после оживления, существенно изменяет состояние ЦНС в постреанимационном периоде как на функциональном, так и на структурном уровне.

ВЫВОД

Перфторан в дозе 5-10 мл на 1 кг массы тела, введенный однократно внутривенно через 30 мин после успешной сердечно-легочной реанимации, не влиял на летальность животных и динамику исчезновения неврологического дефицита; активизировал функциональное состояние ЦНС в течение месяца после реанимации; предупреждал выпадение и развитие дистрофических изменений нейронов в образованиях мозга, высокочувствительных к гипоксии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аврущенко М. Ш. // Анестезиол. и реаниматол. - 1994. - № 5. - С. 41-44.
2. Аврущенко М. Ш., Волков А. В. // Вестн. РАМН. - 1997. - № 10. - С. 26-32.
3. Аврущенко М. Ш., Волков А. В. // Пат. физиол. - 1999. - №2. - С. 7-11.
4. Волков А. В., Трубина И. Е., Заржецкий Ю. В. // Полиорганная недостаточность при шокогенных травмах и острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости. - СПб., 1992. - С. 29-36.
5. Заржецкий Ю. В., Мутускина Е. А., Аврущенко М. Ш. и др. // Анестезиол. и реаниматол. - 1994. - № 2. - С. 56—59.
6. Заржецкий Ю. В., Мутускина Е. А., Трубина И. Е. и др. // Вестн. РАМН. - 1997. - № 10. - С. 32-35.
7. Заржецкий Ю. В., Аврущенко М. Ш., Мутускина Е. А. и др. // Бюл. exper. биол. - 2000. - Т. 129, прил. 2. - С. 9 - 11.
8. Корпачев В. Г., Лысенков С. П., Тель Л. З. // Пат физиол. - 1982. - № 3. - С. 78-80.
9. Лысенков С. П., Корпачев В. Г., Тель Л. З. // Клиника, патогенез и лечение неотложных состояний. - Новосибирск, 1982. - С. 98-105.
10. Назаренко И. В., Каменский А. А., Гудашева Т. А. и др. // Бюл. exper. биол. - 1998. - Т. 125, № 1. - С. 34-37.
11. Перфторорганические соединения в биологии и медицине: Сб. науч. тр. / Под ред. С. И. Воробьева, Г. Р. Иваницкого. - Пушкино, 1997. - Вып. 7.
12. Gurvitch A. M., Mutuskina E. A., Zarzhetsky Yu. V. et al. // Resuscitation. - 1997. - Vol. 35. - P. 165-170.

Поступила 10.05.01