

211

ISSN 0031-2991

Патологическая ФИЗИОЛОГИЯ и экспериментальная ТЕРАПИЯ



В.В. ПАШУТИН

3 1990

Москва · Медицина ·

Sobolewska

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-036.882-08-039.72-06:616.831-092-07

*И. В. Ганнушкина, Г. Вайнраудер-Семков,
Е. А. Мутускина, А. М. Гурвич, М. Моссаковский*

**ПОСТРЕАНИМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕ-
СКОГО БАРЬЕРА И ИХ ВОЗМОЖНОЕ ПАТО-
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

НИИ неврологии АМН СССР, Институт общей реаниматологии АМН СССР, Москва; Центр экспериментальной и клинической медицины Польской академии наук, Варшава

Одним из наиболее важных как в теоретическом, так и в практическом отношении вопросов реаниматологии является вопрос о генезе постреанимационных энцефалопатий. Объяснить возникновение последних только факторами, действующими при умирании (гипоксия, прекращение кровообращения), не представляется возможным; наряду с гипоксическим поражением в их генезе важнейшую роль играют факторы, неотъемлемо связанные с оживлением (реоксигенация, рециркуляция). Возникла концепция постреанимационной болезни [5, 8], которая помогла понять многие процессы, характеризующие постреанимационный период, выделить основные этиологические, патогенетические факторы и звенья процесса и наметить его стадии. В исследованиях природы постреанимационных энцефалопатий одной из наиболее актуальных про-

блем является выяснение генеза их отсроченных форм [1, 8, 10]. Среди вероятных причин этой патологии центральной нервной системы (ЦНС) привлекает внимание роль аутоиммунных поражений ЦНС [2, 3]. Исследование возможных нарушений функций гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для белков и динамики этих нарушений могло бы оказаться полезным для раскрытия причин развития аутоиммунных процессов и связанных с ними отсроченных форм патологии ЦНС в организме, пережившем умирание и оживление. Вопрос о состоянии ГЭБ у животных в постшемическом периоде при проведении мероприятий по восстановлению сердечной деятельности не выяснен.

Задача настоящего исследования — определение проницаемости ГЭБ для белков плазмы крови в разные сроки после восстановления сердечной деятельности.

Методика. Материалы получены в опытах на 59 беспородных крысах-самках массой 160—180 г. Тотальную ишемию мозга создавали под эфирным наркозом остановкой кровотока по всем отходящим от сердца сосудам на 10 мин, после чего осуществляли наружный массаж сердца, искусственную вентиляцию легких до восстановления собственного дыхания и сердечной деятельности [7]. Животных забивали декапитацией через 3 мин, 1, 3, 24 и 72 ч после восстановления сердечной деятельности. Проницаемость ГЭБ для альбуминов плазмы крови определяли с помощью 2 % раствора синего Эванса (2,5 мл/кг), который вводили внутривенно за 10—15 мин до забоя животных декапитацией. Мозг животных немедленно извлекали из черепа и фиксировали в 6 % растворе формалина в течение 2 сут, после чего готовили срезы в криостате, закладывали их в 50 % раствор глицерина и просматривали в люминесцентном микроскопе «Люмам» (СССР). Проницаемость ГЭБ для глобулинов плазмы крови определяли прямым методом иммунофлуоресценции Кунса на срезах, приготовленных в криостате из мозга животных. После извлечения мозга из черепа его немедленно помещали на сухой лед при -72°C . Использовали меченые флуоресцентом кроличьи антисыворотки против глобулинов крысы в рекомендованных рабочих разведениях (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР). В отдельной серии опытов определяли проницаемость ГЭБ для иммуноглобулинов и для всех белков плазмы крови с использованием моноклональных антител с помощью непрямого модификации иммуногистохимического метода. Животных забивали после 30-секундной перфузии мозга физиологическим раствором, перфузией в течение 3—4 мин 10 % раствора формалина. После фиксации мозга в 10 % растворе формалина и заливки в парафин готовили срезы и инкубировали их. Для ликвидации неспецифического связывания глобулинов срезы инкубировали в течение 30 мин с нормальной антисывороткой козы. С целью выявления проницаемости ГЭБ для иммуноглобулинов срезы инкубировали в течение 60 мин с кроличьей антисывороткой против иммуноглобулина G (IgG) крысы («Nogobic Laboratory», Голландия) в разведении 1:100, а для определения проницаемости ГЭБ по отношению

к всем белкам плазмы крови кроли инкубировали в течение 60 мин с соответствующей кроличьей антисывороткой («Dacop», Дания) в разведении 1:100, в обоих случаях вторым этапом реакции была инкубация срезов с антисывороткой козы против IgG кролика, меченой пероксидазой хрена, в разведении 1:20 в течение 30 мин («Berghingwerke», ФРГ). Продукт реакции выявляли 3,3-диаминобензидином. Препараты просматривали в световом микроскопе.

Результаты и обсуждение. Через 3 мин после восстановления сердечной деятельности было обнаружено повышение проницаемости ГЭБ как к альбуминам, меченым синим Эванса, так и к глобулинам крови. Выраженность этого процесса была очень слабой, однако во всех опытах можно было обнаружить сосуды, в стенке которых имелось ярко-красное свечение меченого альбумина, и во всех опытах имелись проявления повышенной проницаемости по отношению к глобулинам крови (см. таблицу). Следует подчеркнуть неравномерность увеличения проницаемости: наряду с поврежденными сосудами встречались сосуды без признаков повышенной проницаемости, причем выраженность этого процесса у разных животных была неодинаковой. Кроме того, следует отметить, что у разных животных и распространение альбуминов по ткани мозга было неодинаковым. Ни в одном случае не отмечено их интенсивного выхода за пределы сосудистой системы с формированием так называемых синих пятен, но в одном из опытов микроскопически через 3 мин обнаружен выход меченого альбумина за пределы сосудистых стенок с образованием незначительных ореолов. Определение проницаемости ГЭБ в этот срок с помощью иммунопероксидазного метода не проводилось, так как необходимое для перфузии время при этом методе превышает 3 мин.

Для интерпретации нарушений ГЭБ в этот период необходимо учитывать следующие обстоятельства. Обеспечиваемое реанимационными мероприятиями восстановление сердечной деятельности после ее временного прекращения (клиническая смерть) сопровождается резким повышением артериального давления (АД) от 0 до 100—150 мм рт. ст., а иногда и более [8], которое происходит обычно в первые 1,5—2 мин, реже (при фибрилляции желудочков) в течение 3—5 мин. Прирост АД более 70—80 мм рт. ст. может приводить к срыву реакции ауторегуляции мозгового кровотока (МК) с увеличением последнего при более высоком, чем в норме, внутрисосудистом давлении и последующим повышением

Частота и выраженность нарушений проницаемости ГЭБ после реанимации у крыс

Тесты, определяющие проницаемость ГЭБ	Время после оживления				
	3 мин	1 ч	3 ч	24 ч	72 ч
Альбумины, меченные синим Эванса	7/8 (\pm) 1/8 (+)	3/3 (—)			1/3 (++) 2/3 (+)
Имуноглобулины в прямом методе Кунса	5/6 (+) 1/6 (++)	3/3 (—)		2/6 (+) 4/6 (++)	
Имуноглобулины в непрямом иммунопероксидажном методе		3/3 (—)	3/3 (—)	3/3 (+)	4/4 (++)
Сывороточные белки в непрямом иммунопероксидажном методе		3/3 (—)	3/3 (—)	3/3 (+)	4/4 (++)

Примечание. В числителе — число опытов с указанной степенью проницаемости ГЭБ, в знаменателе — общее число опытов в указанный срок и по данному тесту. (—) — ГЭБ не поврежден; (\pm) — ГЭБ поврежден слабо (белок только в стенке сосудов); (+) и (++) — ГЭБ поврежден отчетливо (белок в стенке сосуда и периваскулярно) с разной интенсивностью иммуногистохимической реакции.

проницаемости ГЭБ для белков плазмы крови [13]. При восстановлении сердечной деятельности у крыс после 10-минутной остановки сердца, действительно, наблюдается увеличение МК, возникающее в первые минуты постшемического периода [12] и соответствующее стадии начальной гиперперфузии постреанимационной динамики мозгового кровообращения [6]. Для состояния этих животных характерно и то, что восстановление сердечной деятельности происходит на фоне достаточно тяжелых аноксических нарушений метаболизма в ткани мозга, включающих лактацидоз и вызывающих выраженную вазодилатацию, способствующую срыву ауторегуляции МК [4, 8]. Вместе с тем следует подчеркнуть, что восстановление АД, т. е. его прирост, достаточный по величине, чтобы вызвать срыв ауторегуляции МК, происходит не за 15—20 с, а в течение 2—3 мин, т. е. значительно медленнее, чем это необходимо для развития тяжелого срыва ауторегуляции МК у ее верхней границы [4, 11].

Через 1 ч после восстановления МК с помощью использованных иммуногистохимических методов не было обнаружено повышения проницаемости ГЭБ как для глобулинов плазмы крови, так и для всех ее белков (см. таблицу). Иными словами, через 1 ч постшемического периода не только не происходит нарастания нарушений проницаемости ГЭБ, отмеченных на 3 мин рециркуляции, но не обнаруживается и признаков тех незначительных ее изменений, которые были выявлены через 3 мин. Можно полагать, что при повышении проницаемости ГЭБ за 3 мин рециркуляции происходило накопление столь небольшого количества белка в стенке сосудов, которое в течение 1 ч метаболизировалось. Отсутствие повышения проницаемости в течение 1-го часа постшемического периода позволяет считать весьма существенным гемодинамический сдвиг АД, характерный именно для периода, следующего тотчас за восстановлением сердечной деятельности. Аналогичная картина сохранялась и через 3 ч (см. рисунок), однако важность даже

небольшого повышения проницаемости ГЭБ, отмеченного на 3-й минуте рециркуляции (даже с последующим закрытием барьера — через 1—3 ч), определяется тем, что для возникновения иммунного ответа достаточно самой незначительной антигенной стимуляции [9].

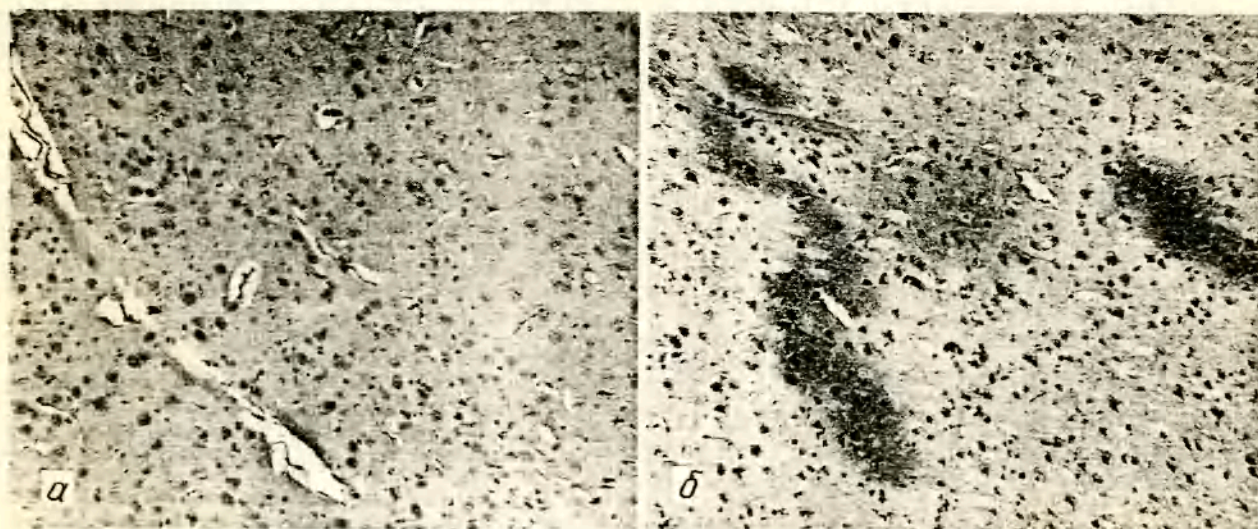
Через 24 ч после восстановления МК у всех животных вновь обнаруживается повышенная проницаемость ГЭБ для всех белков плазмы крови. Указанный феномен в этот срок имел достаточную выраженность. Накопление белков происходит не только в сосудистых стенках, но и в окружающей ткани мозга, хотя макроскопически его проявлений не отмечено ни в одном случае.

Через 72 ч постшемического периода повышенная проницаемость ГЭБ становится несколько более выраженной, однако это не распространяется на все сосуды, имеет место неравномерность и неодинаковая интенсивность проницаемости у разных животных (см. таблицу и рисунок).

Совершенно очевидно, что механизм нарушения ГЭБ через 24—72 ч после реанимации отличается от действующего в первые минуты рециркуляции. Механизм позднего нарушения ГЭБ требует специального исследования, но можно предположить, что он связан с некробиотическим компонентом развертывающихся в этот период в мозге процессов [8, 13].

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить 2 этапа нарушений ГЭБ, ранее неизвестных в реанимационной патологии мозга: I — возникновение первой фазы повышения проницаемости ГЭБ, развивающейся, по-видимому, из-за острого прироста АД, т. е. вследствие самих реанимационных мероприятий, II — появление второй, отсроченной фазы повышенной проницаемости ГЭБ, формирующейся после фазы закрытого ГЭБ.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости разного подхода к терапии повышения проницаемости ГЭБ, на разных стадиях рециркуляции. Вместе с тем они доказывают возможность контакта иммунной системы организма с антигенами нервной ткани и дальнейшего



Проницаемость ГЭБ для белков крови у крыс после восстановления МК.

а — через 3 ч после оживления, нет проницаемости ГЭБ. б — через 72 ч после оживления, белки сыворотки в ткани, окружающей сосуды. Реакция прямой иммунопероксидазы с антисывороткой против сыворотки крысы на срезах их мозга крысы. Ув. 100.

формирования аутоиммунного ответа [2, 14], по-видимому играющего важную роль в развитии постреанимационных энцефалопатий и также требующего специальной профилактики и терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Г. В. // Журн. невропатол. и психиатр.— 1979.— № 8.— С. 998—1001.
2. Бекер М. П. // Патогенез и экспериментальная терапия терминальных состояний.— Новосибирск, 1984.— С. 44—47.
3. Ганнушкина И. В. Иммунологические аспекты травмы и сосудистых поражений мозга.— М., 1974.
4. Ганнушкина И. В., Лебедева Н. В. Гипертоническая энцефалопатия.— М., 1987.
5. Гурвич А. М. // Пат. физиол.— 1985.— № 6.— С. 3—8.
6. Гурвич А. М., Мутускина Е. А., Миротворская Г. Н. // Анест. и реаниматол.— 1986.— № 2.— С. 35—38.
7. Корпачев В. Г., Лысенков С. Р., Тель Л. З. // Пат. физиол.— 1982.— № 3.— С. 78—80.
8. Неговский В. А., Гурвич А. М., Золотокрылина Е. С. Постреанимационная болезнь.— М., 1987.
9. Петров Р. В. Иммунология и иммуногенетика.— М., 1976.
10. Ginsberg M. I. // *Advanc. Neurol.*— 1979.— Vol. 26.— P. 21—44.
11. Häggendal E., Johansson B. // *Acta neuropath. scand.*— 1972.— Vol. 48.— P. 271—275.
12. Kapuscinski A. // *Neuropath. pol.*— 1987.— Vol. 25.— P. 287—298.
13. Klatzo I. // *Brain Edema* / Eds Y. Inaba et al.— Berlin, 1985.— P. 1—5.
14. Mossakowski M. J., Krajewski S. // *Neuropath. pol.*— 1988.— Vol. 26.— P. 37—48.

Поступила 09.12.88

POSTRESUSCITATION CHANGES OF BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY AND THEIR POSSIBLE PATHOGENETIC IMPORTANCE

I. V. Gannushkina, G. Weinrauder-Semkov, E. A. Mutuskina, A. M. Gurvich, M. Mossakovsky

Experiments were conducted on rats with temporary (10-min) clamping of the thoracic vascular bundle and subsequent resuscitation to study the permeability of the blood-brain barrier (BBB) to plasma albumins and globulins and to blood plasma immunoglobulins in different stages of the postresuscitation period. Mild increase of BBB permeability was detected 3 minutes after the beginning of recirculation. Permeability increased markedly in 24 hours and continued growing by the 72nd hour. At a 1-3-hour interval in recirculation the BBB was closed. The obtained results disclose the mechanisms of the development of autoimmune cerebral disorders in an organism that experienced cardiac arrest and resuscitation.