

© Коллектив авторов, 2016  
УДК 616.8.616.15

Шатохина С.Н.<sup>1</sup>, Александрин В.В.<sup>2</sup>, Кубатиев А.А.<sup>2</sup>, Шабалин В.Н.<sup>2</sup>

## **Структуры сыворотки крови в интегральной оценке патофизиологических изменений в организме при экспериментальной ишемии головного мозга**

<sup>1</sup> — ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» Минздрава России, 129110, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2

<sup>2</sup> — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Цель исследования — выявить твердофазные структурные признаки в сыворотке крови крыс, указывающие на конкретные патофизиологические изменения в организме, вызванные экспериментальной ишемией головного мозга. **Методика.** Интегральную оценку патофизиологических изменений при ишемии головного мозга получали по твердофазным структурам сыворотки крови (СК) у 27 крыс-самцов Вистар массой 300—390 г. Обратимая ишемия мозга средней тяжести воспроизводилась билатеральной окклюзией общих сонных артерий на 15 мин с последующей реперфузией. Кровь (1 мл) забирали в пробирку Эппендорфа до ишемии, на 15-й мин ишемии и после 30 мин реперфузии. Методом клиновидной дегидратации получали фации (сухие плёнки) СК, структуры которой анализировали с помощью стереомикроскопа MZ-12 (Leica). Результаты исследований фиксировали по структурным параметрам СК до окклюзии, во время ишемии и через 30 мин после реперфузии. **Результаты.** До ишемии интегральная картина фаций СК крыс имела гармоничную системную организацию: радиальное или частично-радиальное расположение трещин, четко сформированные конкреции, что свидетельствовало о нормальном физиологическом состоянии экспериментальных животных. В период окклюзии сонных артерий появлялись маркеры ишемии, активации капиллярного кровотока, воспалительной реакции и стресса. Частично эти признаки сохранялись и при реперфузии. **Заключение.** Проведенные исследования структур СК на экспериментальных животных позволили выявить маркерные структуры СК, аналогичные выявленным при обследовании людей с ишемией головного мозга.

**Ключевые слова:** ишемия мозга; экспериментальные животные; сыворотка крови; метод клиновидной дегидратации; технология «Литос-система».

**Для цитирования:** Шатохина С.Н., Александрин В.В., Кубатиев А.А., Шабалин В.Н.

Структуры сыворотки крови в интегральной оценке патофизиологических изменений в организме при экспериментальной ишемии головного мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 168—173.

**Для корреспонденции:** Шатохина Светлана Николаевна, доктор мед. наук, проф., руководитель клинко-диагностической лабораторией, e-mail: sv\_n@list.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.05.2016

Shatokhina S.N.<sup>1</sup>, Aleksandrin V.V.<sup>2</sup>, Kubatiev A.A.<sup>2</sup>, Shabalin V.N.<sup>2</sup>

## **Blood serum structures integrated assessment of pathophysiological changes in experimental cerebral ischemia**

<sup>1</sup> — Moscow Regional Research and Clinical Institute by name M.F. Vladimirovskiy, 61/2, ul. Chepkina, Moscow, 129110, Russia

<sup>2</sup> — Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, ul. Baltiyskaya, Moscow, 125315, Russia

**The purpose.** To reveal solid-phase structures of blood serum during and after experimental cerebral ischemia. **Methods.** Integrated estimation pathophysiological changes at brain ischemia received on solid-phase structures of blood serum (BS) at 27 rats-male Vistar in weight of 300—390 g. Reversible brain ischemia of moderate severity was reproduced imposing surgical clips on both common carotids for 15 minutes then clips removed and provided bloodstream restoration on carotids. Blood took away in Eppendorf's test tube in volume on 1 ml before imposing clips, directly ahead of their removal and in 30 minutes after bloodstream restoration. By the Method cuneiform dehydration received BS facia (dry a film) which structures analyzed by means of stereomicroscope MZ12 firm «Leica». Results of researches fixed on structural parameters BS before imposing clips, after removal clips and in 30 minutes after bloodstream restoration. **Results.** Before ischemia the integrated picture facias BS rats had the harmonious system organisation: the radial or partially-radial arrangement of the

cracks, accurately generated konkracias that testified to normal physiological condition of experimental animals. During the period occlusions carotids there were markers of a ischemia, activation of a capillary blood-groove, inflammatory reaction and stress. Partially these signs remained at reperfusion. **Conclusion.** The conducted researches of structures BS on experimental animals have allowed to reveal marker structures BS similar revealed at inspection of people with an ischemia of a brain.

**Keywords:** brain ischemia; experimental animals; blood serum; method cuneiform dehydration; technology «Litos-system».

**For citation:** Shatokhina S.N., Aleksandrin V.V., Kubatiev A.A., Shabalin V.N. Blood serum structures integrated assessment of pathophysiological changes in experimental cerebral ischemia. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2016; 60 (4): 168–173. (in Russ.)*.

**For correspondence:** Svetlana N. Shatokhina, Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher work Moscow Regional Research and Clinical Institute by name M.F. Vladimirskiy, 61/2, ul. Chepkina, Moscow, 129110, Russian Federation, e-mail: sv\_n@list.ru

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Received** 12.05.16

## Введение

Традиционно в оценке состояния организма экспериментальных животных используются аналитические методы исследования биологических жидкостей, которые нацелены на определение в них количественного содержания определенных компонентов (общий белок, холестерин, ферменты, гормоны и пр.) [1]. Это сотни различных показателей, частично отражающих то или иное функциональное состояние органов и систем, однако общее информационное поле, формируемое взаимосвязями между этими показателями, установить не удаётся. Вместе с тем, сыворотка крови (СК) содержит весь комплекс биохимических компонентов, наработанных всеми клетками организма, и несёт в себе интегральную информацию о его патофизиологическом состоянии. Однако эти компоненты в жидкой фазе СК имеют между собой слабые, крайне неустойчивые связи. Разработанная нами технология самоорганизации биологической жидкости путём её перевода в твёрдую фазу — «Литос-система» [2], делает эти связи устойчивыми, а формируемые ими структуры — доступными для визуального анализа. Х. Бернал (1969) справедливо заметил, что «биологические системы обладают универсальной способностью сохранять и передавать информацию в виде структур и функций» [3].

«Литос-система», положенная в основу проведенных нами исследований, позволяет получать интегральную картину межмолекулярных взаимодействий, которые определяют информационные связи, управление и обеспечение энергетическими и пластическими ресурсами всех жизненно важных процессов организма. К настоящему времени с помощью «Литос-системы» выявлены многие морфологические структуры, отражающие физиологический статус организма человека и позволяющие диагностировать

различные патологические состояния: интоксикацию, ишемию, воспаление, злокачественный рост, аномальную биокристаллизацию и другие. Технология «Литос-система» разрешена для практического применения (Разрешение ФС № 155 от 2009 г.).

*Цель исследования* — оценить интегральную картину гомеостаза и выявить твердофазные структурные признаки в СК крыс, указывающие на конкретные патофизиологические изменения в организме, вызванные экспериментальной ишемией головного мозга.

## Методика

Эксперименты выполнены на 27 половозрелых крысах-самцах Вистар массой 300—390 г. Животных содержали в виварии в стандартных условиях освещения и питания, при свободном доступе к корму и питьевой воде. Опыты проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Международных правилах обращения с экспериментальными животными (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; NIH Publication № 85-23,1996). Животных наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг, внутривенно). Глубину наркоза оценивали по исчезновению болевой реакции и роговичного рефлекса. Животное дышало самостоятельно. Температура тела поддерживалась на уровне 37°C. Для взятия крови в бедренную артерию вставляли полиэтиленовый катетер. У животного выбривали шерсть на шее, операционное поле протирали спиртом, на вентральной поверхности шеи делали срединный надрез и пинцетом отодвигали грудино-подъязычную мышцу. Общие сонные артерии осторожно отделяли от вагосимпатического ствола и брали на лигатуру. Место операции закрывали тампоном, а рану ушивали до минимальных размеров. Животное помещали в стереотаксический станок с жест-

кой фиксации головы. Временная ишемия мозга средней тяжести воспроизводилась наложением хирургических клипс (Yasargil microaneurysm clips, FD 681, Aescular-Werke AG, Tuttlingen F.R.G.) на обе общие сонные артерии на 15 мин, после чего зажимы снимали и обеспечивали восстановление кровотока по сонным артериям. В конце эксперимента животным вводили летальную дозу наркоза.

Кровь забирали в пробирку Эппендорфа в объёме по 1 мл до наложения клипс, непосредственно перед их снятием и через 30 мин после восстановления кровотока (реперфузии). После свёртывания крови сыворотку отделяли от сгустка и переносили в другую пробирку.

Использовали метод клиновидной дегидратации. На предметное стекло, расположенное строго горизонтально, наносилась капля СК в объёме 20 мкл. Капля высыхивалась при температуре 20—25°C и относительной влажности 55—60% при неподвижности окружающего воздуха. Продолжительность периода высыхания составляла 18—24 ч. Исследование структурообразующих элементов дегидратированной капли проводилось с помощью стереомикроскопа MZ12 фирмы «Leica». Сущность метода заключается в том, что при испарении воды в капле биологической жидкости, лежащей на плоскости, происходит распределение растворённых в ней веществ по площади в соответствии с их осмотической активностью, гидрофильностью, молекулярным весом, агрегатным состоянием и другими физико-химическими параметрами [2]. В результате получали фации (от лат. *facies* — образ) — сухие плёнки из свежеполученной СК и спустя 24 ч хранения ее в пробирке при температуре +5°C (период завершения биохимических процессов). Анализ структурообразующих элементов фаций проводился в трех режимах: системная организация фаций (обычная микроскопия, увеличение 15-крат), локальная организация фаций

(обычная микроскопия, увеличение 60-крат) и локальная организация фаций (микроскопия в частичном-темном поле, увеличение 60-крат). Результаты исследований фиксировали по структурным параметрам СК до наложения клипс, перед снятием клипс и через 30 мин после восстановления кровотока. В настоящем сообщении приводятся результаты картин фаций СК, полученных после завершения биохимических процессов в экстракорпоральной СК (24 ч хранения при 5°C), так как в данном состоянии биологическая жидкость несёт в себе более устойчивую информацию.

Новые термины, используемые в статье:

- конкреция — шаровидный (иногда как бы сплюснутый, неправильно округленный) минеральный агрегат радиально-лучистого строения;
- волновой пакет — определённая совокупность волн, обладающих разными частотами, которые описывают обладающую волновыми свойствами информацию, в общем случае ограниченную во времени и пространстве.

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия  $\chi^2$ .

### Результаты и обсуждение

До ишемии мозга интегральная картина фаций СК крыс имела однотипную системную организацию (рис. 1 а): радиальная симметрия основных трещин (рис. 1 а, стрелки 1), хорошо сформированные конкреции (рис. 1 а, стрелки 2), мелкие отдельности, замкнутые в центре фации (рис. 1 а, стрелки 3). Эти признаки свидетельствовали о нормальном физиологическом состоянии организма [3]. Общие данные об изменениях структуры фаций СК крыс в процессе эксперимента представлены в таблице.

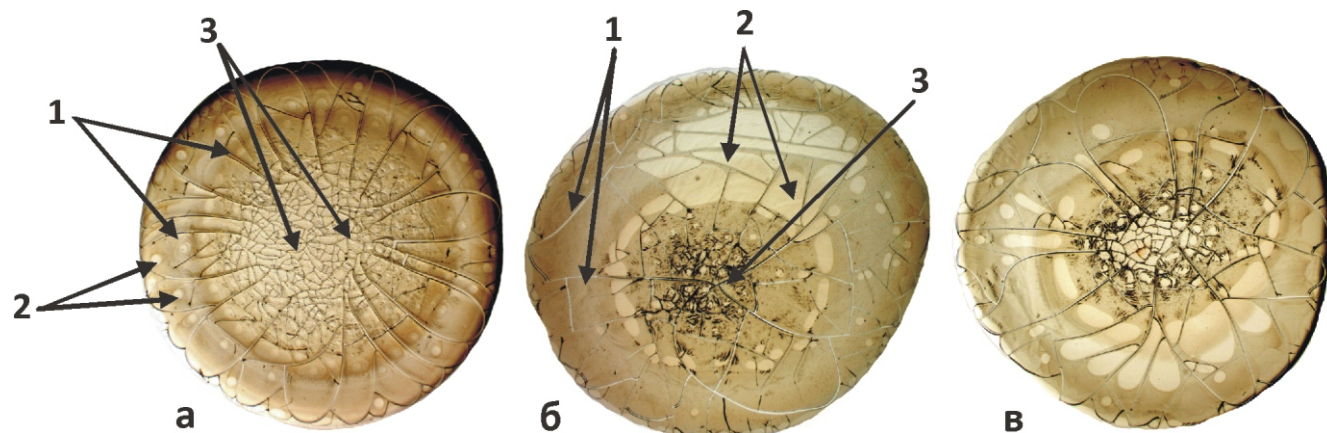


Рис. 1. Изменение системной организации фаций сыворотки крови крысы в ходе эксперимента: а — до ишемии мозга; б — сразу после начала ишемии мозга; в — через 30 мин реперфузии. Ув. 15-крат. Пояснения в тексте.

Данные таблицы свидетельствуют о выраженных различиях в частоте формирования патологических структур в фациях СК при ишемии мозга. В конце периода ишемии у большинства крыс отмечали нарушение радиальной симметрии и увеличение ширины части трещин, появление несформированных конкреций, что указывало на изменение межмолекулярных связей. Эти изменения в период реперфузии исчезали полностью или сохранялись в СК незначительной части животных (несформированные конкреции). У большинства крыс при ишемии появился маркер интоксикации (токсические бляшки), который сохранялся в период реперфузии. В конце периода ишемии у всех крыс выявлен маркер ишемии (серповидные образования), маркер активации капиллярного кровотока (штриховые трещины), маркер воспалительной реакции (языковые структуры) и маркер стресса (волновой пакет). Эти изменения, кроме маркера стресса, были устойчивыми и сохранялись в период реперфузии. В период ишемии выявлялся маркер снижения артериального давления (обратные гребешковые структуры), который сохранялся и в период реперфузии. В качестве примера на рис. 1 б представлены типичные изменения структуры фаций СК одной из крыс в ответ на ишемию. Эти изменения характеризовались нарушением радиальной симметрии и увеличением ширины части трещин (рис. 1 б, стрелки 1); множеством несформированных конкреций (рис. 1 б, стрелки 2); скоплением мелких штриховых трещин в центре фации — признак компенсаторной активации микроциркуляторного русла (рис. 1 б, стрелка 3).

В состоянии реперфузии системная организация фаций СК восстанавливалась до частично-радиальной симметрии, однако часть конкреций оставалась недооформленной, центр фации заполняли четко

сформированные конкреции, а количество штриховых трещин уменьшилось (рис. 1 в).

Анализ локальных структур в фациях СК показал, что реакция организма на ишемию выражалась появлением в структуре фации маркеров ряда патологических состояний: воспаления (волновые пакеты с языковыми структурами), снижения артериального давления (обратные гребешковые структуры) и компенсаторной активации микроциркуляторного русла в виде множественных штриховых трещин (рис. 2 б). Эти признаки указывали на стрессовую реакцию. При реперфузии признаки стрессовой реакции не определялись, однако можно было обнаружить языковые структуры, штриховые, гребешковые трещины и токсические бляшки (рис. 2 в).

При микроскопии фаций СК в частично-темном поле в условиях ишемии и при реперфузии у всех крыс в различной степени выраженности определялись следующие патологические признаки: ишемии — в виде серповидных образований, интоксикации — в виде токсических бляшек и «морщин» в краевой зоне. При ишемии эти признаки определялись в большем количестве по сравнению с состоянием реперфузии (рис. 3).

Следует отметить, что структуры фаций СК у разных крыс до ишемии имели некоторое разнообразие, однако описанные и представленные на рисунках структурные особенности фаций в условиях ишемии и реперфузии были закономерными у всех крыс, что могло свидетельствовать о возникновении ряда однотипных элементов реакции организма животных на ишемию головного мозга.

Полученные данные согласуются с результатами исследований, в которых осуществляли регистрацию локального кровотока в процессе экспериментальной ишемии головного мозга средней тяжести у крыс [4—7, 8].

Таблица

Динамика структурных показателей фаций сыворотки крови крыс в процессе эксперимента

Патологические структуры фаций сыворотки крови (n = 27)	Периоды исследования			Статистическая значимость: P <sub>1</sub> (I—II периоды); P <sub>2</sub> (II—III периоды)
	I — до ишемии	II — в период ишемии	III — в период реперфузии	
Нарушение радиальной симметрии основных трещин	0	21 (77,8%)	0	
Увеличение ширины части трещин	0	21 (77,8%)	0	
Несформированные конкреции	0	16 (59,3%)	7 (25,9%)	p <sub>2</sub> <0,05
Серповидные образования	0	27 (100,0%)	27 (100,0%)	
Языковые структуры	5 (18,5%)	27 (100,0%)	27 (100,0%)	p <sub>1</sub> <0,02
Волновой пакет	0	27 (100,0%)	0	
Обратные гребешковые структуры	0	15 (55,6%)	12 (44,4%)	
Штриховые трещины в центре фации	2 (7,4%)	27 (100,0%)	27 (100,0%)	p <sub>1</sub> <0,01
Токсические бляшки	0	21 (77,8%)	19 (70,4%)	

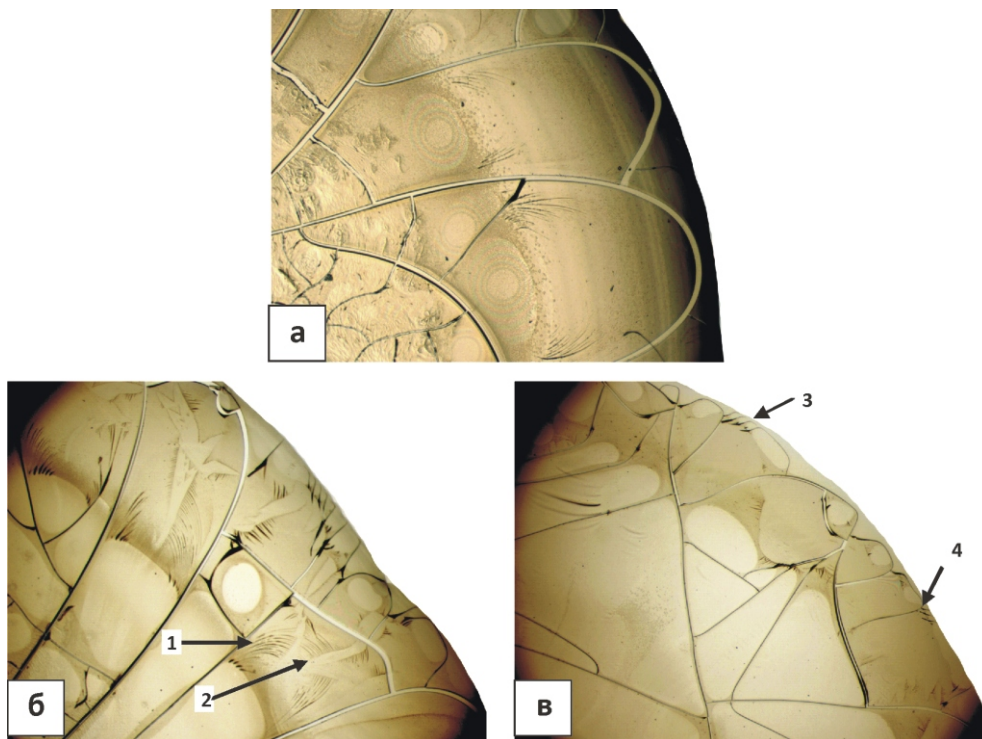


Рис. 2. Локальные изменения организации фаций сыворотки крови крысы в ходе эксперимента: а — до ишемии мозга; б — сразу после начала ишемии мозга; в — через 30 мин реперфузии: 1 — волновой пакет; 2 — языковые структуры; 3 — обратные гребешковые трещины; 4 — штриховые трещины. Микроскопия в обычном свете. Ув. 60-крат.

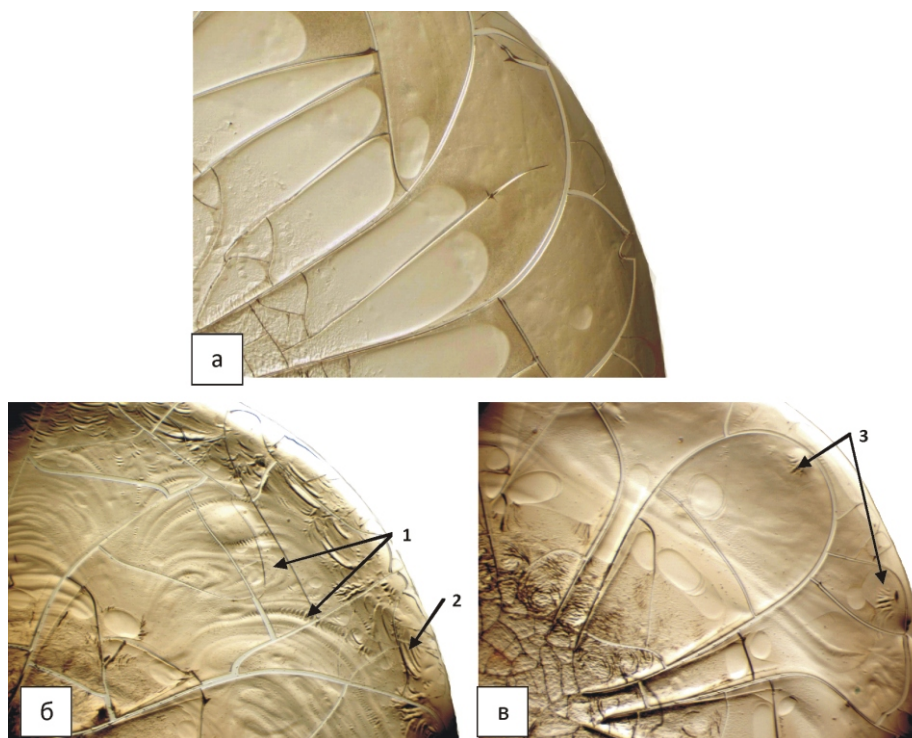


Рис. 3. Локальные изменения организации фаций сыворотки крови крысы в ходе эксперимента: а — до ишемии мозга; б — сразу после начала ишемии мозга; в — через 30 мин реперфузии: 1 — серповидные образования; 2 — «морщины»; 3 — «токсические бляшки». Микроскопия в частично-темном поле. Ув. 60-крат.

При этом в период ишемии мозга отмечали значительное снижение мозгового кровотока: до 54% по сравнению с исходным состоянием (100%). На фоне восстановления кровотока наблюдалось его неполное восстановление по сравнению с исходным уровнем: до 76 %, то есть проявлялась постишемическая гипоперфузия. Срыв ауторегуляции мозгового кровотока в ответ на снижение перфузионного артериального давления сопровождался торможением белкового синтеза, началом анаэробного гликолиза, снижением рН ткани мозга, началом дилатации пиальных артериол за счет метаболического фактора, лактат-ацидоза, цитотоксическим отеком.

Таким образом, проведенные исследования структур СК на экспериментальных животных позволили выявить маркерные структуры СК, аналогичные выявленным при обследовании людей с ишемией головного мозга [2, 3]. Используемая методика является технически простой, не требует дорогостоящего оборудования и позволяет получать ценный диагностический материал на основе оценки интегральной картины фазы СК и её локальных структур, служащих показателями патологических изменений в организме подопытных животных в процессе различных экспериментальных воздействий.

### Выводы

1. Ишемия головного мозга опытных животных при билатеральной окклюзии общих сонных артерий вызывает значительные изменения в структуре твёрдой фазы СК, а именно появление маркёров: воспаления и ишемии, снижения перфузионного артериального давления, активации капиллярного кровотока в тканях головного мозга, интоксикации организма.

2. При реперфузии, возникшие в результате ишемии некоторые изменения в структуре твёрдой фазы СК исчезают, в том числе признаки стрессовой реак-

ции. Однако на фоне интоксикации продолжается ответная воспалительная реакция организма, признаки ишемии тканей головного мозга и активация капиллярного кровотока. Такая картина значительно отличается от фонового состояния, что свидетельствует о постишемическом выбросе в кровь значительного количества продуктов незавершенного метаболизма.

### References

1. Ushkov B.G., Chereshnev V.A. *Concept of norm of physiology (physiological constants of laboratory animals). [Ponyatie normy v fyziologii (fiziologicheskie konstanty laboratornykh zhivotnykh)]*. Moscow; NP «Tsentr strategicheskogo partnerstva»; 2016. (In Russian)
2. Shabalin V.N., Shatokhina S.N. *Morphology biological liquids of man [Morfologiya biologicheskikh zhdkostey cheloveka]*. Moscow; Khrizostom, 2001. (In Russian)
3. Shatokhina S.N., Shabalin V.N. *Atlas of structures not cellular tissues of man in norm and pathology. Vol. 2. Morphological structures of of blood serum [Atlas struktur nekletochnykh tkaney cheloveka v norme i patologii]*. Tver; Triada; 2013. (in Russian)
4. Aleksandrin V.V., Aleksandrov P.N., Khugaeva V.K. *Effect of adrenoblocers on the cerebral microvessels reactivity in ischemia. [Vliyanie adrenoblokatorov na reaktivnost micrososudov mozga pri ishemii. Itogi nauki i tekhniki. Farmakologiya mozgovogo krovoobrashcheniya]*. Moscow; VINITI, 1991; Vol. 26: 105-11. (In Russian)
5. Aleksandrin V.V. Autoregulation of cerebral blood flow in normal and during postischemic hypoperfusion. *Patogenez*. 2012; 10(1): 27-30. (in Russian)
6. Aleksandrin V.V., Kozevnikova E.N. Early postischemic disorders cerebral blood flow: no-reflow and delayed hypoperfusion. *Patogenez*. 2014; 12(2): 27-31. (in Russian)
7. Aleksandrin V.V. Ischemic thresholds of the brain blood flow. *Aktualnye problemy sovremennoy nauki*. 2015; 2: 70-2. (in Russian)
8. Mackensen G.B., Nellgard B., Kudo M., Sheng H., Pearlstein R.D., Warner D.S. Periischemic cerebral blood flow (CBF) does not explain beneficial effects of isoflurane on outcome from near-complete forebrain ischemia in rats. *Anesthesiology*. 2000; 93(4): 1102-6.

### Сведения об авторах:

Александрин Валерий Васильевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови, e-mail: alexandrin-54@mail.ru

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, науч. руководитель НИИ общей патологии и патофизиологии

Шабалин Владимир Николаевич, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, глав. науч. сотр. лаб. биокристалломики, e-mail: shabalin.v2011@mail.ru