ФАРМАКОЛОГИЯ И ФАРМАКОТЕРАПИЯ

М.М.Сачек, О.Д.Мяделец

ЭФФЕКТ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛПС N.MENINGITIDIS

Витебский государственный медицинский университет

Представлены результаты влияния дексаметазона на морфологические изменения головного мозга крыс при в/венном и интрацистернальном введении ЛПС N.meningitid7is. Показано, что степень выраженности терапевтического эффекта дексаметазона зависит от сроков его введения:чем раньше он вводится, тем лучше терапевтический эффект. Полученные данные подтверждают необходимость как можно более раннего введения дексаметазона при остром бактериальном менингите, а также целесообразность его в/венного введения перед началом антимикробной терапии.

Липополисахарид (ЛПС) является индуктором синтеза и экспрессии цитокинов, следовательно для модификации этих процессов могут быть использованы препараты, ингибирующие эти эффекты [14, 15, 17, 18]. К ним в первую очередь относятся глюкокортикоиды, являющиеся ингибиторами синтеза и секреции многих цитокинов - IL-1, 2, 5, 6, 12, TNFα, γ-ИФН и экспрессии их рецепторов.

Гормонотерапия прошла длительный этап апробации. Дискуссия по вопросу целесообразности использования гормонотерапии при нейроинфекциях продолжается десятилетия [19]. Многочисленные исследования эффектов глюкокортикостероидов (ГКС) при остром бактериальном менингите (ОБМ) на ранних стадиях заболевания, позволяют считать, что данная группа препаратов является обязательной для лечения больных с ОБМ.

Лучшим из них является дексаметазон (Д), который влияет на синтез цитокинов, уменьшает отек мозга, улучшает микроциркуляци, способствует восстановлению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [8, 13].

Вместе с тем, следует помнить о том, что влияние Д на патологический процесс может зависеть от сроков его введения. Так, при поздно начатом лечении, терапия ГКС может стимулировать реагиновые реакции, развивающиеся на антигенное воздействие [6]. Литературные данные свидетельствуют о том, что применение Д показано в первые 2 дня терапии [И]. Эта группа лекарственных средств (ЛС) обладает достаточно большим количеством побочных эффектов. ГКС усиливают апоптоз клеток, за исключением нейтрофилов и тимоцитов, что приводит к уменьшению в крови Т-лимфоцитов, особенно Т-хелперов. Одновременно угнетается транспорт лимфоцитов к месту антигенной стимуляции. Они угнетают функциональную активность моноцитов и макрофагов. ГКС угнетают антителогенез [2].

Цель исследования -установить зависимость патоморфологических изменений в головном мозге при эндотоксинемии и эндотоксинрахии, вызванной N.meningitidis от сроков введения дексаметазона

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проводились на белых беспородных крысах (п=119). Исходя из того, что в развитии патофизиологических изменений при бактериальных менингитах ведущая роль отводится эндотоксинам, для создания модели использовали в/венное (п=42) и интра-цистернальное введение (п=42) ЛПС N.meningitidis [3-5,7,10,12,16]. Группы экспериментальных животных представлены в таблице 1.

Таблица 1

Объем экспериментальных исследований

ЛПС	Количество животных	Способ введения	Период наблюдения	Условия	
				ЛС	В
N.meningitidis	6	В/венно	6 часов	-	
N.meningitidis	6	В/венно	6 часов	Д	
N.meningitidis	6	В/венно	6 часов	Д	2 ч
N.meningitidis	6	В/венно	6 часов	Д	4 ч
N.meningitidis	7	И/цистернально	6 часов	-	
N.meningitidis	5	И/цистернально	6 часов	Д	
N.meningitidis	6	И/цистернально	6 часов	Д	2 ч
N.meningitidis	7	И/цистернально	6 часов	Д	4 ч
N.meningitidis	6	В/венно	18 часов		
N.meningitidis	6	В/венно	18 часов	Д	
N.meningitidis	6	В/венно	18 часов	Д	6 ч
N.meningitidis	5	И/цистернально	18 часов		
N.meningitidis	5	И/цистернально	18 часов	Д	
N.meningitidis	7	И/цистернально	18 часов	Д	6 ч
Наркоз	5	В/брюшинно	6 часов		
Наркоз	5	В/брюшинно	18 часов		
Контроль	6	В/венно	6 часов		
Контроль	6	В/венно	18 часов		
Контроль	6	И/цистернально	6 часов		
Контроль	7	И/цистернально	18 часов		

Примечания: ЛС - лекарственное средство; В - время введения препарата; Д - дексаметазон.

В/вено ЛПС N.meningitidis вводили в боковую вену хвоста однократно в дозе 5мг/кг. Интрацистернальное введение осуществляли под легким нембуталовым наркозом. Вводили 200 мкг ЛПС N.meningitidis. Декапитировали животных через 6 и 18 часов. Дексаметазон (Hafslund Nycomed) вводили однократно в/венно при 6 часовом наблюдении одновременно с ЛПС, через 2 часа, 4 часа, а при 18 часовом одновременно с ЛПС или через 6 часов в дозе 5мг/кг [16].

При гистологических исследованиях оценивали степень полнокровия сосудов мозговой оболочки и головного мозга, наличие диапедеза эритроцитов и периваскулярных лимфоидных и полинуклеарных инфильтратов, степень выраженности периваскулярных и перицеллюлярных пространств ("пустот"), наличие которых является свидетельством отека мозга. Оценивали степень развития хроматолиза.

Активность НАДФН-диафоразы (НАДФН-тетразолийредуктазы) выявляли по методу Нахласа и соавт. [1] и оценивали ее в эндотелии кровеносных сосудов серого и белого вещества коры мозга и сосудистой оболочки мозга, в нейроцитах и клетках нейроглии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

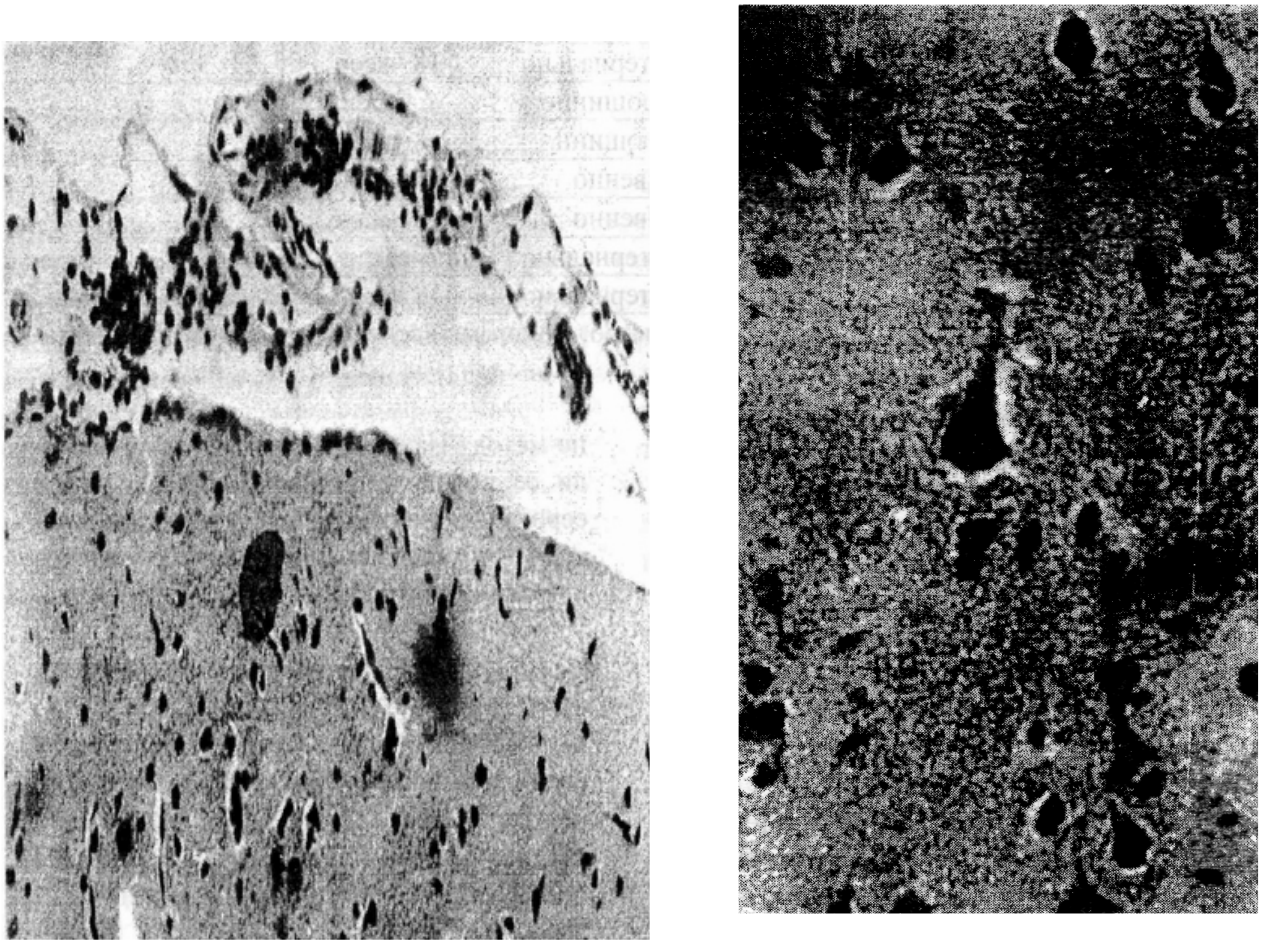
У контрольных животных, которым вводили в/венно физиологический раствор, нейроны сенсомоторной коры имели обычное строение (рис.1,а). При окраске по Нисслю в перикарионе нейроцитов выявлялась интенсивно окрашенная хроматофильная субстанция (рис. 1,6). Перицеллюлярные и периваскулярные пустоты, являющиеся признаком отека мозга, практически отсутствовали или были слабо выраженными. Сосудистая оболочка мозга имела обычное строение и кровенаполнение (рис.1, а,б).

Через 6 часов после в/венного введения ЛПС N.meningitidis в головном мозге у животных выявилось полнокровие сосудистой оболочки мозга и выраженный диапедез эритроцитов. В головном мозге были резко расширены периваскулярные, а во многих случаях и перицеллюлярные

пространства, что приводило к деформации и пикнотизации нейроцитов (рис. 2,а). В половине случаев вокруг сосудов коры на уровне пирамидного слоя и ниже наблюдались небольшие лимфоцитарные инфильтраты (рис. 2,6). Некоторые глиоциты приобретали звездчатую форму. Во многих нейроцитах коры имел место субтотальный хроматолиз.

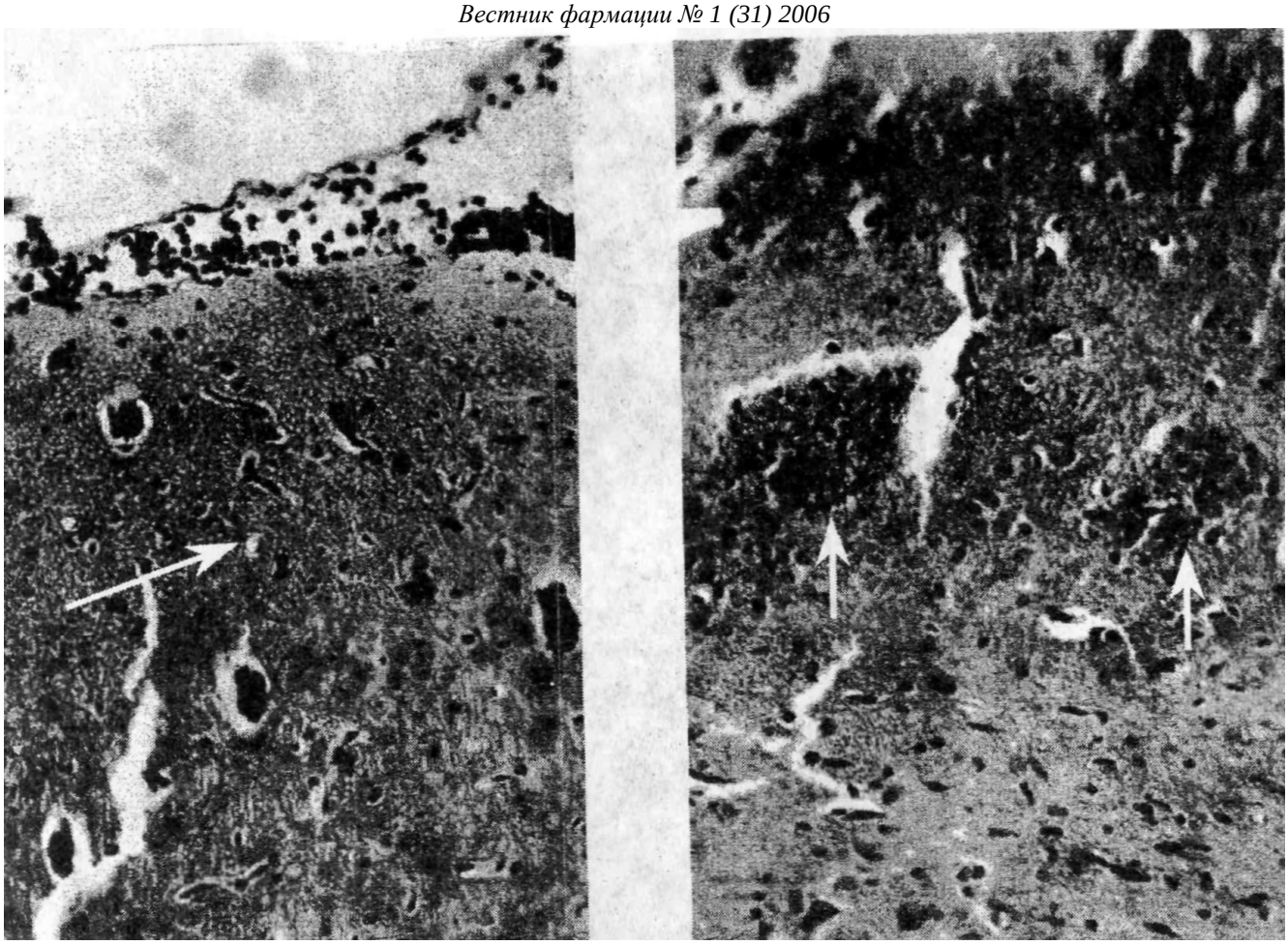
Через 18 часов после в/венного введения ЛПС N.meningitidis морфологические изменения в целом напоминали таковые при 6 часовой продолжительности эндотоксинемии. Кроме того, у животных этой группы в головном мозге отмечалось появление микрополостей, вокруг которых в большинстве случаев отсутствовали воспалительные изменения. Однако, встречались зоны, когда в окружности полости наблюдались лимфоидные инфильтраты (рис.3). Учитывая то обстоятельство, что интрацистернальное введение ЛПС проводилось под легким наркозом, в качестве контрольных групп использовали: а) животных, которые были подвергнуты только наркотизации; б) животных, которым на фоне наркоза интрацистернально вводили физиологический раствор

.



а б

Рис. 1. Нормальное строение мозга у контрольных крыс. Окраска: а - гематоксилин-эозином; б - по Нисслю. Увел.: а)-100х, б)-400х.



а б

Рис. 2. Резко выраженные периваскулярные и перицеллюлярные пространства (а), лимфоидные инфильтраты (б) в головном мозге через 6 часов после введения ЛПС N.meningitis. Окраска гематоксилинэозином. Увел. 100х.

У контрольных животных, подвергнутых наркотизации, в головном мозге выявлялось некоторое полнокровие сосудов сосудистой мозговой оболочки без каких-либо изменений в мозговой ткани. Практически отсутствовали какие-либо изменения и в контрольной группе, животным которой интрацистернально вводили физиологический раствор.

Через 6 часов после интрацистернального введения ЛПС N.meningitidis характер патоморфологических изменений в головном мозге существенно не отличался от такового при в/венном введении, однако степень выраженности изменений была большей. Сосуды сосудистой оболочки были резко расширены и полнокровны. Во многих сосудах наблюдался диапедез Эритроцитов (рис.4,а), в нейронах отмечался хроматолиз, иногда выраженный. Во многих нервных клетках происходило исчезновение ядрышек (рис.4,б).

Морфологические изменения в головном мозге животных через 18 часов после интрацистернального введения ЛПС N.meningitidis были следующими. Отмечалось резкое расширение сосудов мягкой мозговой оболочки и мозга (рис.5,а) с диапедезом эритроцитов из сосудов мозговой оболочки. Наблюдался хроматолиз в нейронах коры, расширение паравазальных и паранейрональных зон (рис.5,б) небольших размеров лимфоидные инфильтраты (рис.5, а,б).

Через 18 часов после интрацистернального введения ЛПС морфологические изменения в мозге соответствовали таковым через 6 часов.

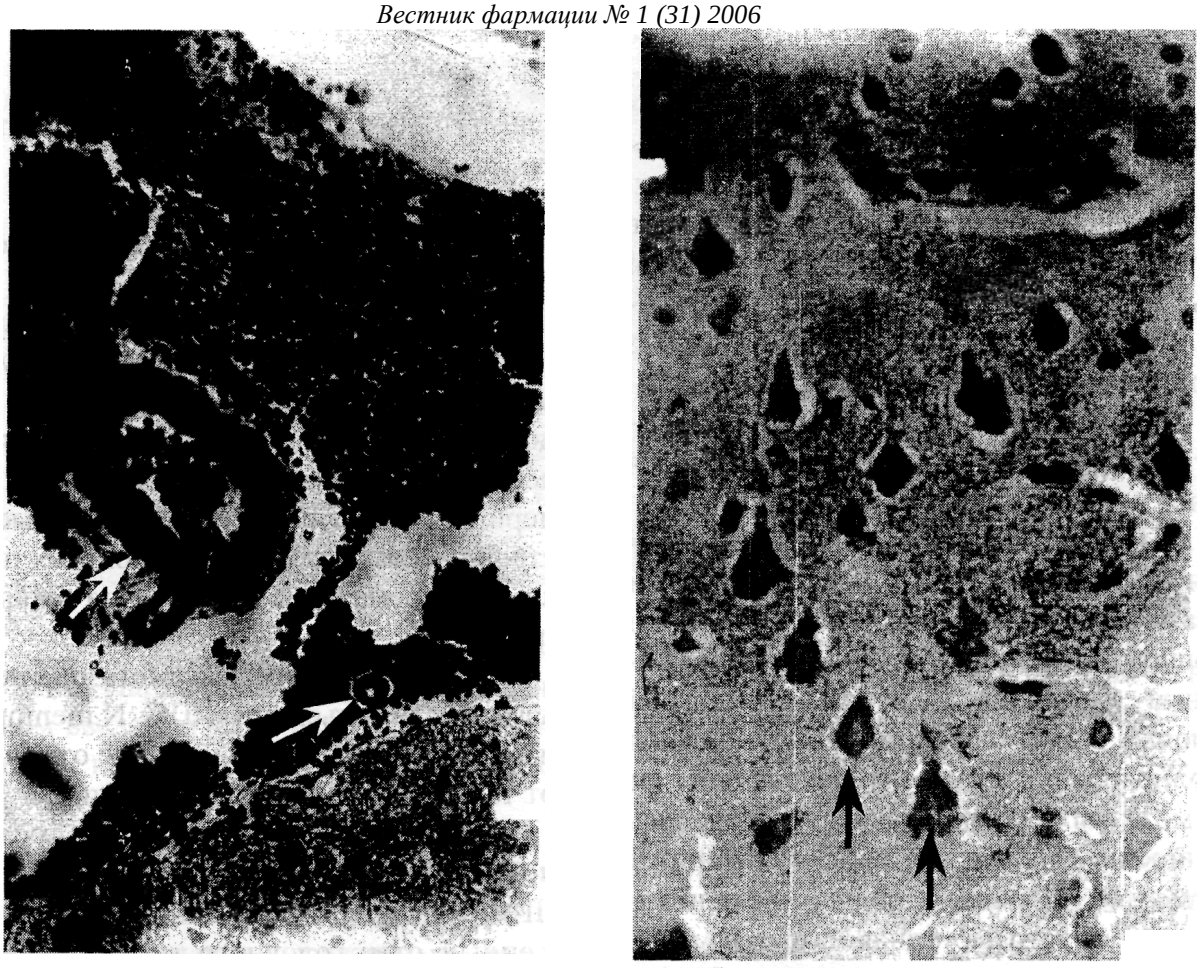
Рис. 3. Появление лимфоидных инфильтратов вокруг полостей в мозге животных через 18 часов после введения ЛПС N.meninigitis. Окраска гематотоксилинэозином. Увел. 100х.

Через 6 часов после интрацистернального введения ЛПС N.meningitidis характер патоморфологических изменений в головном мозге существенно не отличался от такового при в/венном введении, однако степень выраженности изменений была большей. Сосуды сосудистой оболочки были резко расширены и полнокровны. Во многих сосудах наблюдался диапедез Эритроцитов (рис.4,а), в нейронах отмечался хроматолиз, иногда выраженный. Во многих нервных клетках происходило исчезновение ядрышек (рис.4,б).

Морфологические изменения в головном мозге животных через 18 часов после интрацистернального введения ЛПС N.meningitidis были следующими. Отмечалось резкое расширение сосудов мягкой мозговой оболочки и мозга (рис.5,а) с диапедезом эритроцитов из сосудов мозговой оболочки. Наблюдался хроматолиз в нейронах коры, расширение паравазальных и паранейрональных зон (рис.5,б) небольших размеров лимфоидные инфильтраты (рис.5, а,б).

Через 18 часов после интрацистернального введения ЛПС морфологические изменения в мозге соответствовали таковым через 6 часов. У животных обнаруживалось полнокровие сосудов мягкой мозговой оболочки, хориоидных сплетений и некоторых сосудов мозга. Многие сосуды мозга были деэндотелизированными. Наблюдался пикноз и хроматолиз во многих нейронах.

Кроме того, выявлялись участки микронекрозов мозга с образованием небольших полостей. Встречались небольших и средних размеров лимфоидные инфильтраты. Во всех препаратах по всей массе мозга выявлялись достаточно крупные полости, не имеющие специальной выстилки, а ограниченные иногда разрушающимися нейроцитами. В полостях иногда встречались эритроциты, обломки клеток и клеточный детрит.



а б

Рис. 4. Резкое расширение сосудов мозговой оболочки (а) и хроматолиз с исчезновением ядрышек (б) через 6 часов после интрацистернального введения ЛПС. Окраска: а) - гематоксилинэозином, б) - по Нисслю. Увел.: а) -100х, б) - 400х.

а б

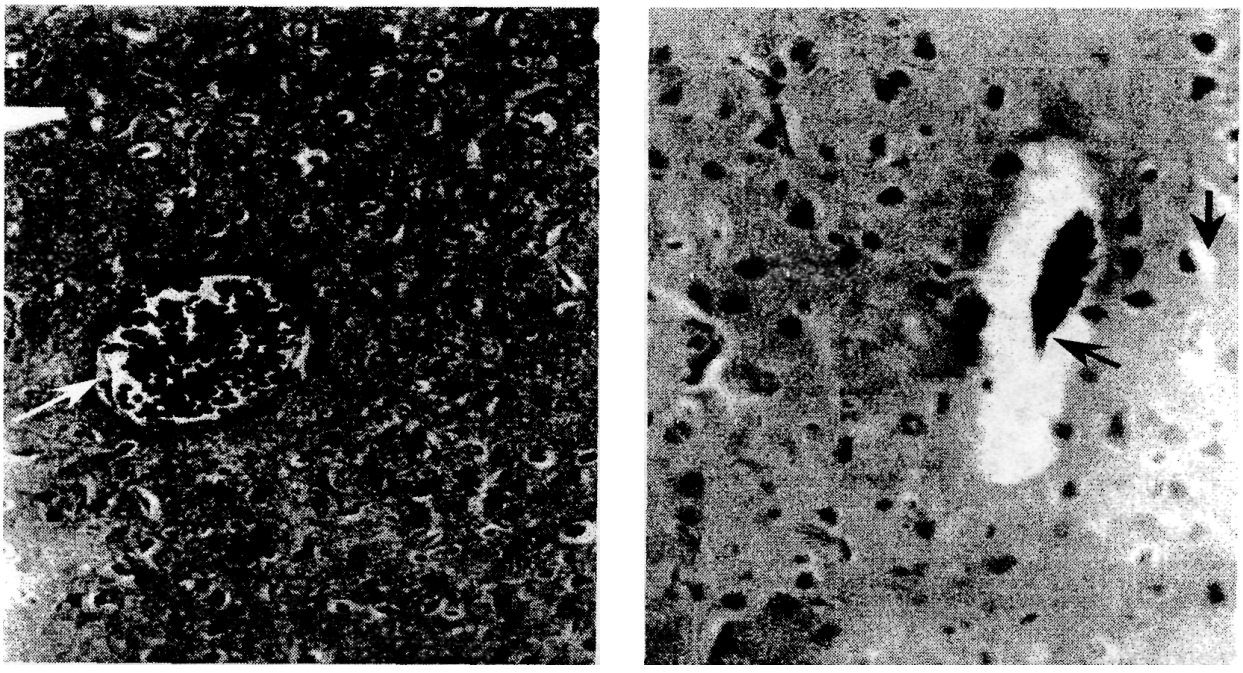


Рис. 5. Полнокровие сосудов мозга (а), расширение периваскулярных и перицеллюлярных пространств (б) через 18 часов после введения ЛПС N.meningitis. Окраска гематоксилинэозином. Увел. 200х.

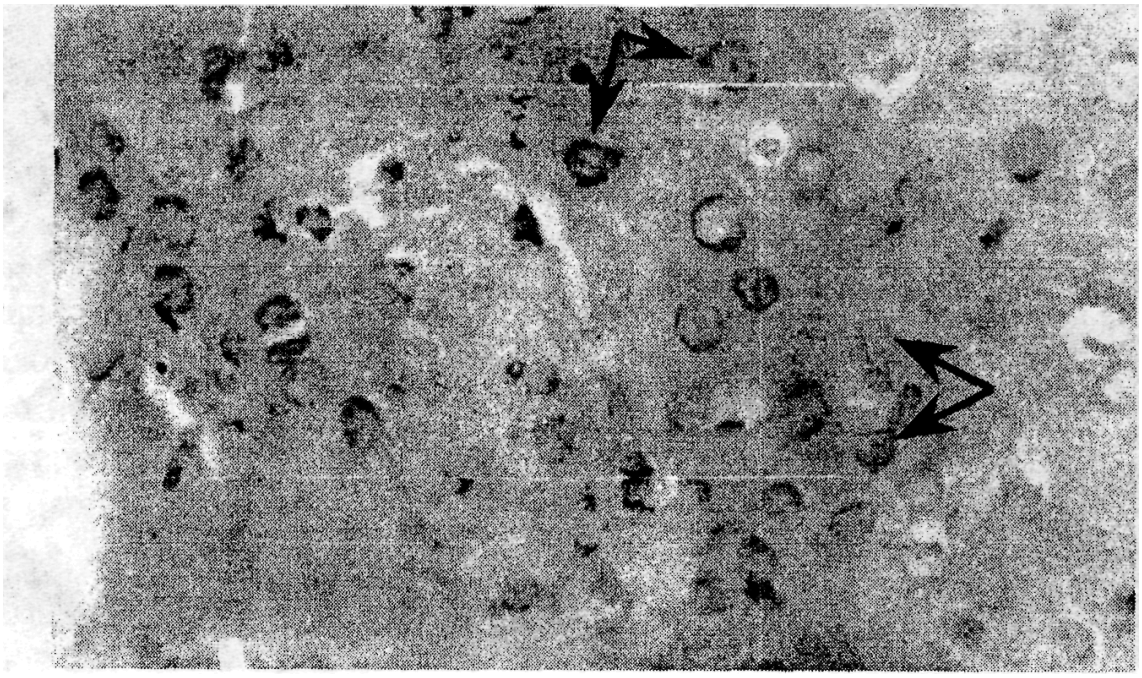
Характерным признаком было отсутствие в полостях воспалительных явлений. В некоторых случаях было видно, как полости небольших размеров сливались друг с другом с образованием полостей больших размеров и сложной конфигурации. Иногда создавалось впечатление, что полости формируются вокруг разрушенных микрососудов и мозговой ткани вокруг них. Во многих нейронах отмечался пикноз и хроматолиз.

При эндотоксинемии при одновременном введении ЛПС N.meningitidis и дексаметазона у животных через 6 часов в головном мозге отмечались менее выраженные изменения. Сосуды сосудистой оболочки были неравномерно расширены и полнокровны. В местах отхождения от них мозговых сосудов также наблюдалось расширение и полнокровие сосудистых фрагментов. Периваскулярные и перицеллюлярные пустоты, однако, были менее выражены, что может свидетельствовать о меньшей степени отека мозга, чем в предыдущей группе. Форма нейроцитов в основном не изменялась. Лишь отдельные клетки выглядели несколько пикнотизированными. В них наблюдался парциальный хроматолиз (рис. 6, а). Глиальные клетки не подверглись существенным изменениям. В целом существенных отличий от контроля в данной группе не наблюдалось, за исключением наличия парциального хроматолиза в отдельных нейроцитах и более выраженных периваскулярных и перицеллюдярных пространств.

При введении дексаметазона через 2 часа после внутривенного введения ЛПС N.meningitidis морфологическая картина головного мозга напоминала предыдущую, однако, в этом случае полнокровие сосудов мозга и сосудистой оболочки было более выраженным, более широкими были периваскулярные и перицеллюлярные пространства. В отдельных нейроцитах парциальный хроматолиз сменялся на тотальный (рис.6, б).

При введении дексаметазона через 4 часа после инъекции ЛПС N.meningitidis изменения в головном мозге не отличались от таковым в предыдущей группе.

Таким обрдзом, через 6 ч после одновременного введения дексаметазона с ЛПС N.meningitidis, развивающийся выраженный отек головного мозга, слабо или умеренно выраженные дистрофические изменения нейроцитов и нейроглии, а также появляющиеся небольшие лимфоидные инфильтраты, существенно уменьшаются, в то время как, при более позднем использовании препарата (через 2 и 4 часа) терапевтический его эффект снижается.



а

б

Рис. 6. Парциальный (а) и субтотальный (б) хроматолиз в нейронах коры при одновременном введении ЛПС N.meningitis и дексаметазона а) и при введении дексаметазона через 2 ч после инъекции и ЛПС N.meningitis. Окраска по Нисслю. Увел. 200х.

Через 18 часов при одновременном введении ЛПС N.meningitidis и Д изменения в мозге были менее выражены, в первую очередь со стороны сосудистого компонента. Лимфоидные инфильтраты не встречались, отсутствовали изменения со стороны нейроглии.

При введении Д через 6 часов с момента введения ЛПС N.meningitidis в головном мозге были выявлены те же изменения, что и в группе животных, не получавших ЛС.

Таким образом, через 18 часов после введения ЛПС N.meningitidis в головном мозге животных сохраняются патоморфологические изменения. Д уменьшает эти явления только при одновременном введении с ЛПС, тогда как при более позднем его введении лечебное действие не выражено.

При интрацистернальном введении ЛПС N.meningitidis и одновременном введении Д, через 6 часов кровеносные сосуды мягкой мозговой оболочки были расширены и полнокровны. В некоторых участках наблюдался диапедез эритроцитов. Отмечалось резкое расширение паравазальных и парацеллюлярных зон (рис. 7). Во многих нейроцитах отсутствовали ядрышки, был выражен хроматолиз. Некоторые глиоциты были пикнотично изменены. Вместе с тем, большое число нейронов имеет хорошо выраженную хроматофильную субстанцию.

Рис. 7. Расширение перицеллюлярных и перивазальных зон при одновременном введении ЛПС N.meningitis и дексаметазона. Окраска гематоксилинэозином. Увел. 100х.

При введении Д через 4 часа после интрацистернального введения ЛПС N.meningitidis отмечались такие же, как и в предыдущей группе изменения. Однако, кроме того в препаратах этой серии встречались полости с разрушением нейроцитов (рис.8)

Через 6 часов после интрацистернального введения ЛПС N.meningitidis у животных проявляется картина не только отека мозга, но также и деструктивных изменений со стороны нейроцитов и нейроглии. Одновременное введение дексаметазона снижает степень выраженности патологических изменений. Введение дексаметазона через 2 и 4 часа после введения ЛПС оказывает меньший терапевтический эффект.

Через 18 часов при одновременном введении ЛПС и дексаметазона сосудистые изменения были выражены менее значительно, чем у животных, не получавших препарат. Диапедез эритроцитов не определялся. Хроматолиз в нейроцитах был выражен слабее.

При введении дексаметазона через 6 часов изменения практически не отличались от предыдущей группы.

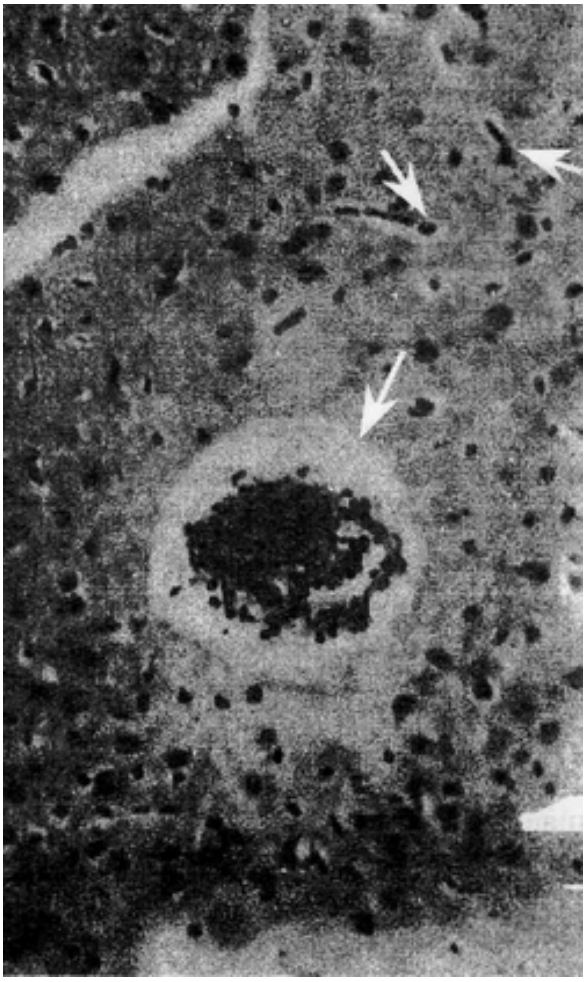


Рис. 8. Образование микрополостей в мозге при введении дексаметазона через 6 ч. после интрацистернального введения ЛПС N.meningitis. Окраска гематоксилинэозином. Увел. 100х.

Таким образом, через 18 часов после интрацистернального введения ЛПС N.meningitidis в головном мозге имели место примерно те же изменения, как и через 6 часов. При одновременном введении дексаметазона изменения были менее выражены, что отмечается и при введении дексаметазона через 6 часов после инъекции ЛПС N.meningitidis»

Представленные данные свидетельствуют о терапевтическом эффекте дексаметазона независимо от способа введения ЛПС N.meningitidis. Степень выраженности положительного эффекта

препарата зависит от сроков его введения: чем раньше он вводится, тем лучше терапевтический эффект. Эти данные подтверждают необходимость как можно более раннего введения дексаметазона при острых бактериальных менингитах, а также целесообразность его внутривенного введения перед началом антибактериальной терапии.

Одним из высокоактивных биологических агентов, особенно значимым в межклеточной коммуникации, является окись азота (NO). В ЦНС NO принимает участие в регуляции сосудистого тонуса, является нейромедиатором, имеет большое значение в развитии патологии клеток (3). NO продуцируется внутриклеточным, преимущественно цитозольным ферментом синтазой азота (NOS). Исследования, выполненные in vitro, показали, что в микроглиальных клетках (преимущественно астроцитах) может индуцироваться высокий уровень фермента, причем активными агонистами являются цитокины (9) Учитывая, что содержание цитокинов значительно повышается при менингоэнцефалигах и менингитах, особенно бактериальных, можно ожидать индукцию NOS в головном мозге при эндотоксинемии. Гистохимическим маркером NOS служит реакция на NADPH-диафоразу. Представленные нами ранее данные свидетельствовали об увеличении активности iNOS. Интерес представляет изучение влияния на этот процесс дексаметазона.

Через 18 часов после введения ЛПС вместе с дексаметазоном также наблюдалось менее выраженное увеличение активности фермента в эндотелии микрососудов с одновременным возрастанием количества NADPH-диафоразопозитивных сосудов. Подобная же ситуация была характерна для глиоцитов и нейроцитов (рис. 9).

Таким образом, одновременное введение дексаметазона не оказывает значимого влияния на активность фермента, что может быть обусловлено рядом причин, среди которых сохраняющиеся нарушения микроциркуляции, приводящие к ишемии и активации iNOS.

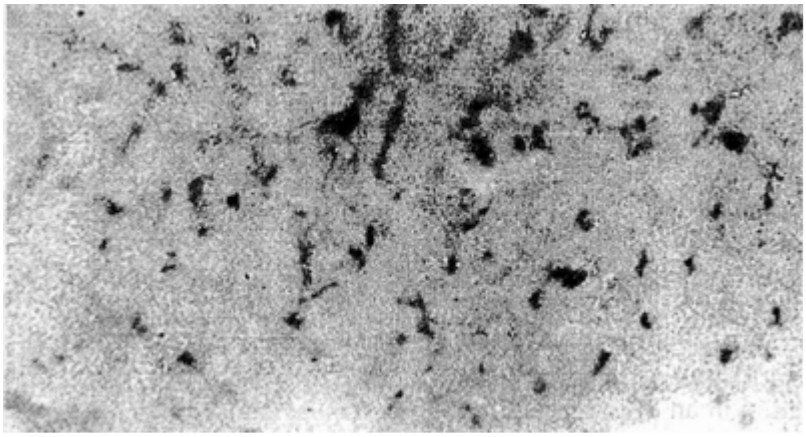


Рис. 9. Увеличение активности фермента дении ЛПС N.meningitis и дексаметазона. Метод Нахласа. Увел. 200х.

ВЫВОДЫ

При экспериментальной эндотоксинемии и эндотоксинрахии дексаметазон оказывает положительный терапевтический эффект на морфологические изменения в головном мозге. Эффект препарата зависит от сроков введения: максимально выражен при одновременном введении ЛПС и дексаметазона. в структурах мозга при одновременном введении ЛПС и дексаметазона.

Теоретические предпосылки и полученные результаты обосновывают необходимость введения дексаметазона перед началом антимикробной терапии, поскольку это позволит предотвратить нежелательные эффекты образовавшегося эндотоксина.

.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берстон Н.М. Гистохимия

ферментов.- М.: Мир, 1965.- 454с

2. Нил М.Дж. Наглядная фармакология. - М.:Гэотар Медицина, 1966.- 104с.

3. Рожнова У.А., Алексеенко А.В. Функциональная активность фактора некроза опухоли альфа (ФНО-а) в центральной нервной системе.// Нейрохимия.-1999.- Т.16.- №2.-СЛ18-132.

4. Руководство по инфекционным болезням./Под ред. Ю.В.Лобзина и АЛ.Казанцева. - СПб.: ТИТ Комета, 19.96. - 720с.

5. Сорокина М.Н., Иванова В.В.,Скрипченко Н.В. Бактериальные менингиты у детей.- М.: Медицина, 2003 - 320С.

6. Фомин В.В., Козлова С.Н., Князев Ю.А. Гипоталамо-гипофизарная система и иммунный ответ при инфекционных заболеваниях у детей.- Свердловск.: Изд-во Урал.ун-та, 1991.- 240с.

7. Boje K.M.Cerebravascular permeability changes during experimental meningitis in the rat.// J.Pharmacol.Exp.Ther.-1995.0Vol.274.-N.3.-pp.l 199-1203.

8. Daoud A.S., Batieha A., Al-Sheyyab M. et.al. Lack of effectiveness ofdexamethasone in neonatal bacterial meningitis.// Eur.J.Pediatr.-1999.-Vol.l58.-№-pp.230-233.

9. Freyer D., Weih M., Weber J.R.et.al. Pneumococcal cell wall components in duce nitric oxide synthase and TNF-alpha in astroglial-enriched cultures.// Glia.-1996.-Vol.l6.-№l.-pp.l-6.

10. Jaworowicz D.J., Korytko P.J., Singh-Lakhman S. et.al. Nitric oxide and prostaglandin E2 formation parallels blood - brain barrier disruption in an experimental rat model of bacterial meningitis.// Brain. Res.Bull. -1998. - Vol.46.-№6.- pp.541-546.

11. Kepa L.Current views on the pathophysiology of bacterial meningitis-new therapeutic possibilities?// Pol.Merkuriusz. Lek.-1997.Vol.3.-№18.-pp.291-294.

12. Kim K.S., Wass C.A., Cross A.S.Blood-brain barrier permeability during the development of experimental bacterial meningitis in the rat.// Exp. Neurol.-1997,-VoU45.-№l.-pp.253-257.

13. Martich G.D., Darmer R.L., Ceska M., Suffredini A.F. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents.// J.Exp. Med.-1991.-Vol.l73.-pp.l021-1024.

14. Mohlen M.A., Kimmings A.N., Wedel N.I. et.al. Inhibition of endotoxin-induced cytokine release and neutrophil activation in humans by use of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein.// J. Infect.Dis.-1995.-Vol.l72.-pp.l44-151.

15. Moller B., Ellermarm-Eriksen S., Storgaard M. et.al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors conserve TNF bioactivity in meningitis patient spinal fluid.//J.mfectDis.-1996.-Vol. 174.-№3 .-pp.557-563.

16. Nakayama I., Akieda Y., Murata I., Yamaji E. Multiple organ failure due to experimental endotoxemia in animal model.// Journal of Endotoxin research.-1996.-Vol.3 (supp.l).-pp.18.

17. Pfister H.W., Scheld W.M.Brain in jury in bacterial meningitis: therapeutic implications.// Curr.Opin.Neurol.-1997.-Vol. 10.- №3.-pp.254-259.

18. Revhaug A., Michie H.R., Manson J.M. et.al. Inhibition of cyclooxygenase at tenuates the metabolic response to endotoxin in humans.// Arch. Surg.-1988.-Vol. 123.- pp. 162-170.

19. Zoorob K.J., Cender D.A different look at corticosteroids,// Am.Fam. Physician. -1998.-Vol.58.-№2.-pp.443-450.

M.M.Sachek, O.D.Myadzeletz

DEXAMETASONE EFFECT ON MORPHOLOGICAL CHANGES IN BRAIN INDUCED BY INFUSION OF N. MENINGITIDES LIPOPOLYSACHARIDE.

Results of dexametasone influence on rats brain morphological changes caused by intravenous and interstitial administration of N. rneningitides lipopolysachharide are presented. It is demonstrated, that extent of dexametasone effect depends on time of administration, the earlier administration being more effective. The data obtained confirm necessity of earliest dexametasone administration in acute bacterial meningitis, as well as rationality of its intravenovs infusion before initiation of antibacterial therapy.