

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 18, №2

2019



МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*УДК 616.831.31-005.4.-092.913:618.33***ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ТОТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ****© Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М., Валько Н.А., Кот В.Н., Мосин О.В., Сульжицкий А.Г.***Гродненский государственный медицинский университет, 230009, Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80**Резюме*

Цель. Анализ изменений морфологических характеристик нейронов таких филогенетически разных отделов коры головного мозга крыс в различные периоды после тотальной церебральной ишемии.

Методика. Эксперименты выполнены на 42 самцах беспородных белых крыс с начальной массой 240±20 г. Тотальная церебральная ишемия у белых беспородных крыс моделировалась путем декапитации. Забор материала осуществлялся на 1-, 5-, 15-, 30- и 60-й мин., а также спустя 5 и 24 ч. после декапитации.

Результаты. При тотальной церебральной ишемии наблюдалось значительное уменьшение размеров нейронов и деформация перикарионов. Нормохромные нейроны на 60-й мин. полностью исчезали. Количество гиперхромных нейронов возрастало, а затем прогрессивно снижалось. Сморщенные нейроны составляли большинство клеток в изучаемых отделах коры на 30-60-й мин., а затем, спустя 5 и 24 ч., в популяции нейронов преобладали клетки с перичеллюлярным отеком.

Заключение. Полученные данные о гистологических изменениях нейронов филогенетически разных отделов коры головного мозга в динамике тотальной церебральной ишемии дают основу для дальнейшего детального изучения посмертных изменений головного мозга, определения времени смерти, создавая фундаментальную базу для изучения свойств нейронов, в том числе перехода их из одного функционального состояния в другое.

Ключевые слова: крысы, церебральная ишемия, кора головного мозга

DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE PYRAMID NEURONS OF PHYLOGENETICALLY DIFFERENT DEPARTMENTS OF THE RAT'S BRAIN CORTEX AT TOTAL CEREBRAL ISCHEMIA**Bon E.I., Maksimovich N.Ye., Zimatkin S.M., Valko N.A., Kot V.N., Mosin O.V., Sulzhitsky A.G.***Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic Belarus**Abstract*

Objective. Analysis of changes in the morphological characteristics of neurons of phylogenetically different parts of the cerebral cortex of rats in different periods after total cerebral ischemia.

Methods. The experiments were performed on 42 male outbred white rats with an initial weight of 240±20 g. Total cerebral ischemia in white outbred rats was modeled by decapitation. The material was taken at 1, 5, 15, 30, and 60th minute, as well as 5 and 24 hours following decapitation.

Results. With total cerebral ischemia, a significant decrease in the size of neurons and deformation of the perikaryon were observed. Neurochromic neurons at the 60th minute completely disappeared. The number of hyperchromic neurons increased, and then progressively decreased. Shrinkage neurons made up the majority of cells in the studied cortical sections at 30–60 minutes, and then, after 5 and 24 hours, cells with pericellular edema prevailed in the neuron population.

Conclusion. The obtained data on histological changes of neurons of phylogenetically different parts of the cerebral cortex in the dynamics of total cerebral ischemia provide the basis for further detailed study of post-mortem changes of the brain, determining the time of death, creating a fundamental basis for studying the properties of neurons, including their transition from one functional state to another.

Keywords: rats, cerebral ischemia, cerebral cortex

Введение

В настоящее время в медицине понятие о смерти основано на доказательстве устойчивого отсутствия функций мозга. Для диагностики функционирования мозга используется ряд методов: электроэнцефалография, оценка рефлексов черепных нервов, исследования мозгового кровотока. При патогистологическом исследовании посмертные изменения включают отек, кровоизлияния, инфаркты, некрозы, ишемические размягчения, сморщивание и деформация нейронов, пикноз их ядер. В полушариях мозжечка часто обнаруживается набухание и венозное полнокровие, в субталамической области и зрительном бугре – области пятнистого лизиса. Наиболее типичным гистологическим изменением при гибели мозга считается отек его тканей с последующим разрывом сосудов [8]. Ранее проведенные исследования по изучению морфологических изменений нейронов теменной и коры и гиппокампа при субтотальной церебральной ишемии головного мозга показали снижение размеров перикарионов и увеличение количества гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов [3, 10]. Вместе с тем представляет интерес количественное изучение изменения размеров, формы и степени хроматофилии цитоплазмы нейронов в различные периоды после тотальной экспериментальной церебральной ишемии.

Целью исследования явился анализ изменений морфологических характеристик нейронов таких филогенетически разных отделов коры головного мозга (теменной коры и гиппокампа) крыс в различные периоды после тотальной церебральной ишемии.

Методика

Эксперименты выполнены на 42 самцах беспородных белых крыс с начальной массой 240 ± 20 г. с соблюдением требований Директивы Европейского Парламента и Совета №2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей. Животных содержали в кондиционируемом помещении (22°C) при смешанном освещении на стандартном рационе вивария и свободном доступе к корму и воде, группами не более 5-ти особей в клетке вивария [5].

Использование крыс в качестве экспериментальных животных обусловлено сходством ангиоархитектоники и морфологии коры головного мозга у крыс и человека [2]. Тотальная церебральная ишемия у белых беспородных крыс моделировалась путем декапитации. Забор материала осуществлялся на 1-, 5-, 15-, 30- и 60-й мин., а также спустя 5 и 24 ч. после декапитации. После декапитации быстро извлекали головной мозг, кусочки переднего отдела коры больших полушарий фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы окрашивали 0,1% толуидиновым синим по методу Ниссля и на выявление рибонуклеопротеинов по Эйнарсону.

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию и денситометрию осадка хромогена в гистологических препаратах проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). Локализацию теменной коры и гиппокампа коры в гистологических препаратах мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [12]. У каждого животного оценивали не менее 30 нейронов пятого слоя париетальной коры и пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа. На парафиновых срезах определяли число больших пирамидных нейронов на единицу площади срезов коры головного мозга. Среди общего количества выделяли клетки по интенсивности окраски цитоплазмы (хроматофилии). Выделяли несколько типов: нормохромные – умеренно окрашенные; гиперхромные – темные; гиперхромные – очень темные, с деформированными перикарионами; гипохромные – светло окрашенные; клетки-тени – почти прозрачные. Подсчитывалось количество каждого типа клеток.

После предварительной проверки на нормальность распределения показателей полученные данные анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Результаты представлены в виде $Me(LQ;UQ)$, где Me –

медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между показателями контрольной и опытной групп считали достоверными при $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-test) [1].

Результаты исследования

На 15-й мин. тотальной ишемии нейроны теменной коры и гиппокампа значительно уменьшались в размерах – на 47 и 22%, соответственно ($p < 0,05$). К 30 мин. тотальной ишемии размеры пирамидных нейронов теменной коры уменьшились на 74% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем, а размеры нейронов гиппокампа – на 51% ($p < 0,05$). К 5 ч. площадь перикарионов нейронов теменной коры составляла лишь 1/6 ($p < 0,05$) от нормальной, а у нейронов гиппокампа снизилась в 3,5 раза, по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 1).

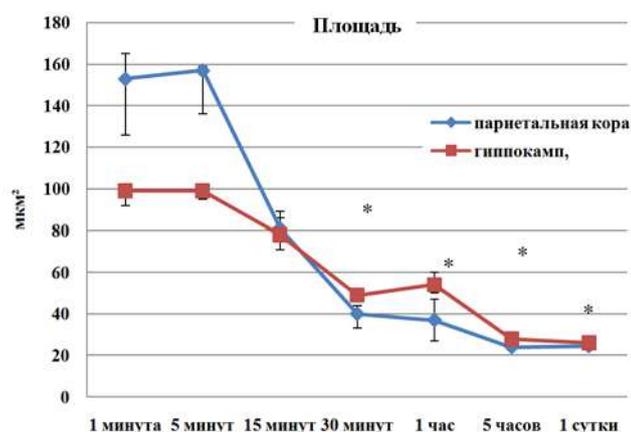


Рис. 1. Динамика изменения площади перикарионов нейронов 5-го слоя теменной коры и пирамидного слоя гиппокампа крыс, * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями при 1 мин.

Форма нейронов значительно менялась уже к 15-й мин. – они становились более вытянутыми (на 25%, $p < 0,05$). К 60-й мин. фактор элонгации нейронов теменной коры и гиппокампа возрос на 35% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, в то время как форм-фактор (показатель округлости перикарионов) снизился на 34% ($p < 0,05$) (рис. 2, 3).

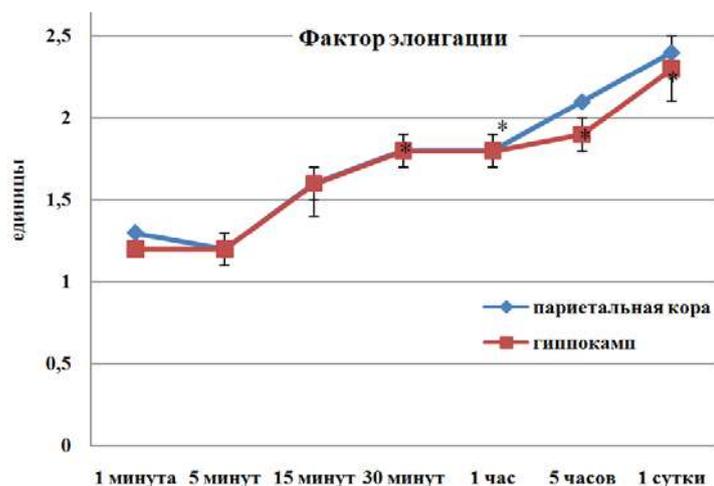


Рис. 2. Динамика изменения фактора элонгации перикарионов нейронов 5-го слоя теменной коры и пирамидного слоя гиппокампа крыс, * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями при 1 мин.

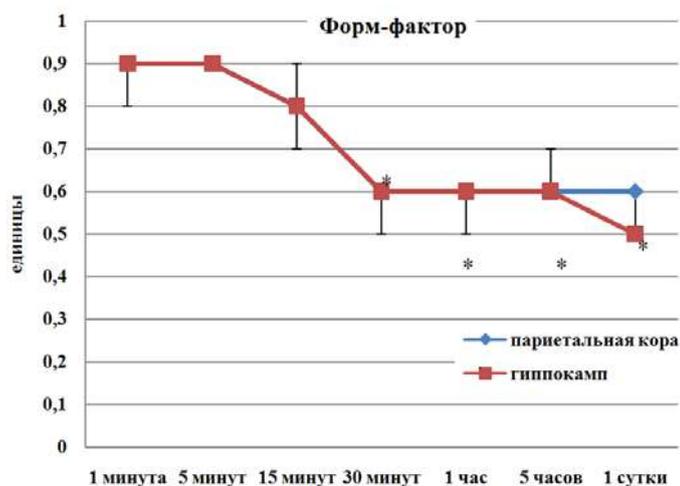


Рис. 3. Динамика изменения форм-фактора перикарионов нейронов 5-го слоя теменной коры и пирамидного слоя гиппокампа крыс, * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями при 1 мин.

На 15-й мин. количество нормохромных нейронов уменьшилось на 63% ($p < 0,05$) по сравнению с 1 мин., а на 60-й мин. они полностью исчезали. Количество гиперхромных нейронов возрастало к 15 мин. в 3 раза, а затем прогрессивно снижалось. Гиперхромные сморщенные нейроны составляли большинство клеток в изучаемых отделах коры на 30-60-й мин., а затем, спустя 5 и 24 ч., в популяции нейронов преобладали клетки с перичеллюлярным отеком (рис. 4-7). Сходным с изменением количества гиперхромных нейронов, изменялось и концентрация рибонуклеопротеинов в цитоплазме клеток, достигая максимума к 60 мин. тотальной ишемии и снижаясь к 1 сут., что объясняется большим количеством нейронов с перичеллюлярным отеком, обладающих низкой степенью хроматофилии цитоплазмы (рис. 8).

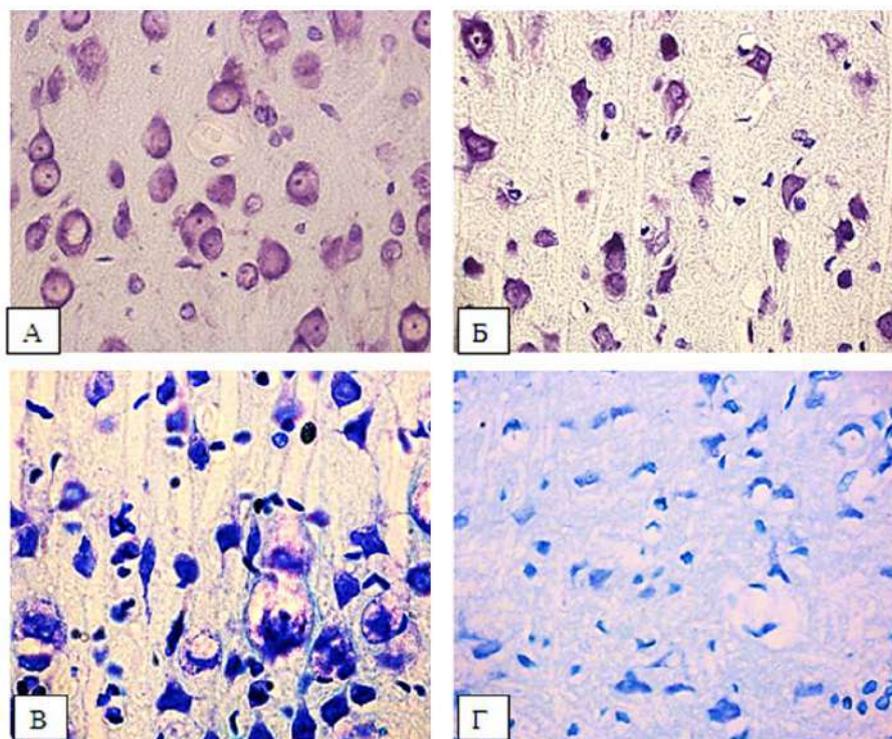


Рис. 4. Нейроны пятого слоя теменной коры. А – 1 мин. (преобладание нормохромных нейронов), Б – 30 мин. (преобладание гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов), В – 1 ч. (набухшие и гиперхромные сморщенные нейроны), Г – 1 сут. (преобладание клеток с перичеллюлярным отеком). Цифровая микрофотография. Окраска по Нисслю. Ув. объектива $\times 40$

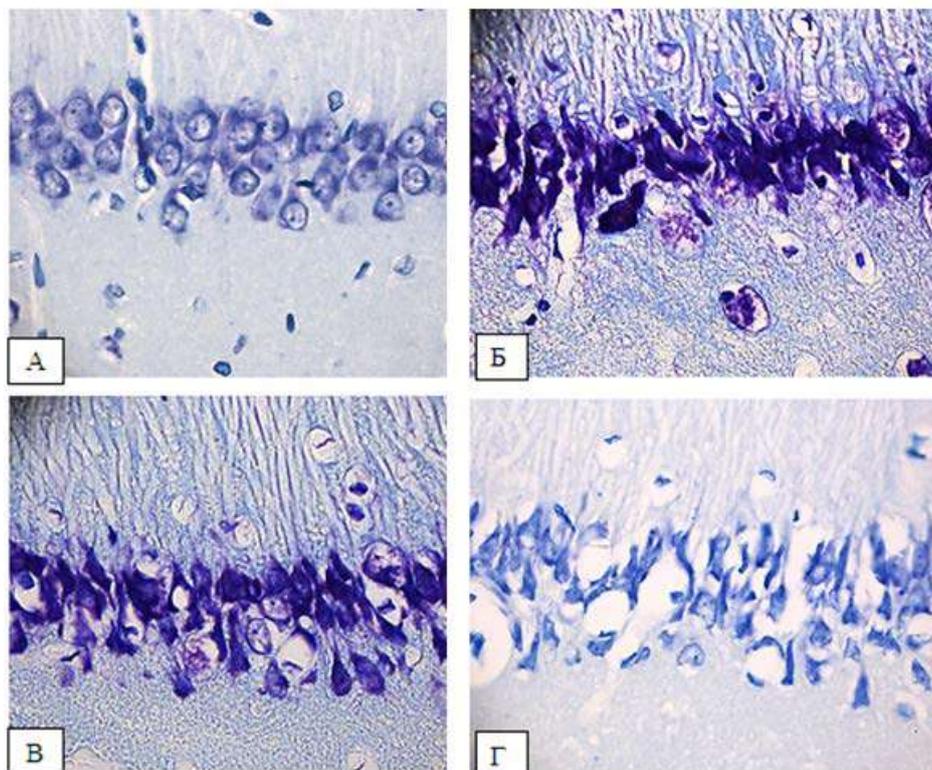


Рис. 5. Нейроны пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа. А – 1 мин. (преобладание нормохромных нейронов), Б – 30 мин. (преобладание гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов), В – 1 ч. (набухшие и гиперхромные сморщенные нейроны), Г – 1 сут. (преобладание клеток с перичеллюлярным отеком). Цифровая микрофотография. Окраска по Ниссию. Ув. объектива ×40

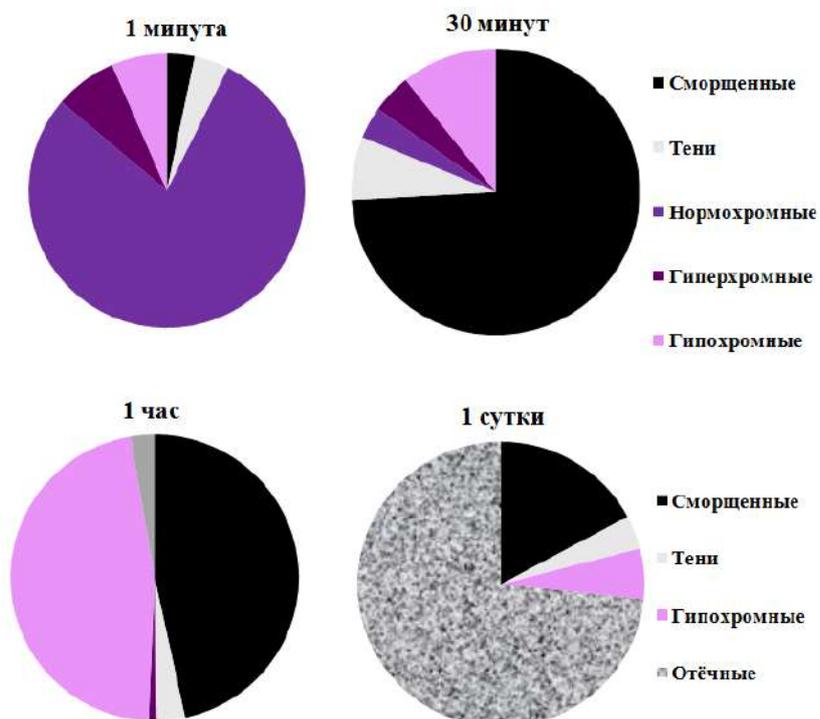


Рис. 6. Соотношение нейронов с различной степенью хромотофилии цитоплазмы в теменной коре головного мозга



Рис. 7. Динамика изменения количества гиперхромных сморщенных нейронов 5-го слоя теменной коры и пирамидного слоя гиппокампа крыс

Гиперхромные нейроны расцениваются как ишемически-измененные клетки [6]. Появление сморщенных темных клеток при гипоксических и аноксических состояниях является универсальной и наиболее тяжелой формой реактивных и патологических изменений нейронов, сопровождающихся изменениями уровня метаболизма, тинкториальных свойств цитоплазмы, кариоплазмы клеток и различной степенью ультраструктурных изменений цитоплазматических органелл. В темных несморщенных нейронах интенсивно протекает синтез РНК, а пикноморфные клетки содержат деструктивные органеллы, их ядра и цитоплазма становятся неразличимыми [7].

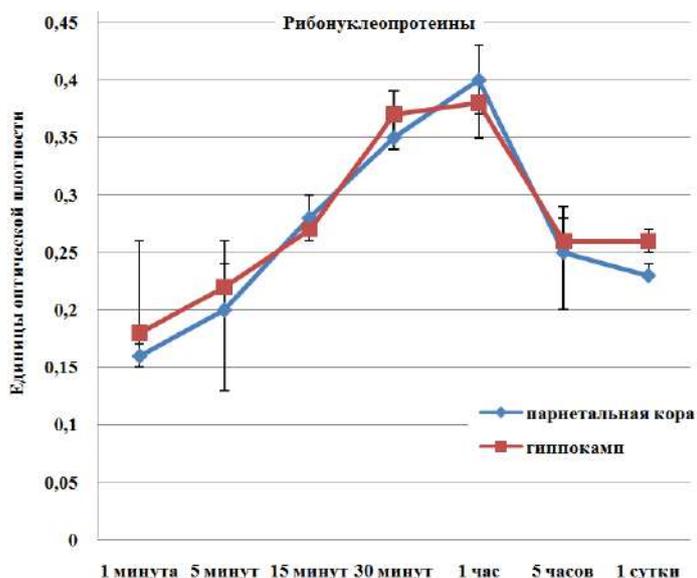


Рис. 8. Динамика изменения содержания рибонуклеопротеинов в цитоплазме нейронов 5-го слоя теменной коры и пирамидного слоя гиппокампа крыс

На электронно-микроскопическом уровне в их цитоплазме наблюдается уплотнение органелл. При этом цитоплазма и ядро гиперхромных сморщенных нейронов уменьшены в объеме, что привело к увеличению плотности расположения рибосом (соответственно и рибонуклеопротеинов) и гиперхроматозу. Количество рибосом на внешней мембране кариолеммы значительно больше, чем у животных контрольной группы. Отмечается смещение ядрышка к периферии ядра и увеличение концентрации рибонуклеопротеинов вследствие их выхода из ядрышка и значительное возрастание количества свободных рибосом в цитоплазме нейронов крыс опытной группы [7]. В сморщенных некротизирующихся нейронах глыбки тигроидного вещества и нейрофибриллы обычно склеиваются, и тогда клетки начинают диффузно и очень интенсивно прокрашиваться тионином и серебром [9].

Существуют мнения, что интенсивная окраска цитоплазмы нейронов характеризует преобладание образования белка над его утилизацией [11]. Но есть сведения и о том, что гиперхромный нейрон, посредством суперэкспрессии амплифицированных генов, является клеткой, интенсивно синтезирующей белки. Некоторые исследователи расценивают гиперхромные нейроны как гиперфункциональные и считают, что синтезированный ими белок идет на собственные их потребности [4]. Сморщенные нейроны – это клетки с угнетением функциональной активности. Характерная их форма связана с патологическими необратимыми изменениями водно-солевого обмена [4, 11].

В зависимости от условий функционирования нейроны с начальными признаками гипер- и гипохромии либо превращаются в клетки-тени (гипохромные), либо в сморщенные гиперхромные нейроны с последующим колликвационным и коагуляционным некрозом или апоптозом [7].

В гиперхромных сморщенных нейронах снижаются обменные процессы, распад нуклеопротеинов, особенно ядерных, превалирует над их синтезом. Запасы частиц рибонуклеопротеинов в ядре сохраняются, но блокируется их выведение в цитоплазму.

Согласно данным литературы, на поздних этапах ишемии наблюдается набухание нейронов, сопровождающееся растворением хроматофильного вещества, огрубением, распадом и расплавлением нейробирилл, пикнозом ядер, утолщением и распадом отростков [7, 9]. Нейропиль вакуолизируется и фрагментируется, претерпевая зернисто-глыбчатый распад, а миелин растворяется, вследствие чего по ходу нервных волокон начинают выявляться капельки липидов. Синапсы набухают, разрушаются и исчезают [9].

Изменения, наблюдаемые на 15-й мин. тотальной церебральной ишемии схожи с теми, которые были описаны на 60-й мин. субтотальной ишемии, а именно – преобладание гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов. Клетки уменьшались в размерах, становясь более вытянутыми за счет деформации перикарионов [3, 10]. В то же время изменения на 60-й мин. тотальной церебральной ишемии отражали более глубокую деструкцию мозга – нормохромные нейроны отсутствовали, появлялись набухшие нейроны. Гиперхромные нейроны почти не встречались, зато сморщенные составляли большинство клеток в изучаемых отделах коры головного мозга.

Заключение

Полученные данные о гистологических изменениях нейронов филогенетически разных отделов коры головного мозга в динамике тотальной церебральной ишемии дают основу для дальнейшего детального изучения посмертных изменений головного мозга, определения времени смерти, создавая фундаментальную базу для изучения свойств нейронов, в том числе перехода их из одного функционального состояния в другое.

Литература (references)

1. Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных: учеб.-метод. пособие. – Минск.: Институт подготовки научных кадров Национальной Академии Наук Беларуси – 2008. – 235 с. [Batin N.V. *Komp'yuternyy statisticheskiy analiz dannykh*. Computer statistical data analysis: proc. Method. allowance. – Minsk.: Institute for the Training of Scientific Personnel of the National Academy of Sciences of Belarus, 2008. – 235 p. (in Russian)]
2. Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Микроскопическая организация изокортекса крысы // Новости медико-биологических наук. – 2017. – №4. – С. 80-88. [Bon E.I., Zimatkin S.M. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of Biomedical Sciences. – 2017. – N4. – P. 80-88. (in Russian)]
3. Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М. Морфофункциональные нарушения в гиппокампе крыс при субтотальной ишемии // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2018. – N1. – С. 24-29. [Bon E.I., N.Ye. Maksimovich, S.M. Zimatkin. *Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii*. Bulletin of Smolensk State Medical Academy. – 2018. – N1(17). – P. 24-29. (in Russian)]
4. Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Темные нейроны мозга // Морфология. – 2017. – №6. – С. 81-86. [Bon E.I., Zimatkin S.M. *Morfologia*. Morphology. – 2017. – N6. – P. 81-86. (in Russian)]
5. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. – М.: Профиль-2С. – 2010. – 241 с. [Karkishchenko N.N., Gracheva S.V. *Rukovodstvo po laboratornym zhyvotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh*. Guide

- to laboratory animals and alternative models in biomedical research. – Moscow: Profil-2S, 2010. – 241 p. (in Russian)]
6. Попова Э.Н. Ультраструктура мозга, алкоголь и потомство: монография. – Москва. Изд. Научный мир, 2010. – 155 с. [Popova E.N. *Ultrastruktura mozga, alkohol' i potomstvo*. Ultrastructure of the brain, alcohol and offspring. – Moscow. Ed. The scientific world, 2010. – 155 p. (in Russian)]
 7. Семченко В.В., Степанов С.С., Алексеева Г.В. Постаноксическая энцефалопатия. – Омск, 1999. – 448 с. [Semchenko V.V., Stepanov S.S., Alekseeva G.V. *Postanoksicheskaya entsefalopatiya*. Postoxic encephalopathy. – Omsk, 1999. – 448 p. (in Russian)]
 8. Уолкер А.Э. Смерть мозга. – Москва, Медицина, 1988. – 198 с. [Walker A.E. *Smert' mozga*. Brain death. – Moscow, Medicine, 1988. – 198 p. (in Russian)]
 9. Ярыгин Н.Е., Ярыгин Н.Н. Патологические и приспособительные изменения нейрона. – Москва «Медицина», 1973. – 190 с. [Yarygin N.E., Yarygin N.N. *Patologicheskiye i prisposobitel'nyye izmeneniya neyrona*. Pathological and adaptive changes in the neuron. – Moscow "Medicine", 1973. – 190 p. (in Russian)]
 10. Bon L.L., Maksimovich N.Ye., Zimatkin S.M. Effects of experimental cerebral ischemia on metabolic characteristics of parietal cortex neurons // *Bioprocess Engineering*. – 2018. – N2(1). – P. 1-5.
 11. Gallyas F., Pal J., Bukovics P. Supravital microwave experiments support that the formation of "dark" neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system // *Brain Research*. – 2009. – N1270. – P. 152-156.
 12. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. – Academic Press, Australia, 1998. – 242 p.

Информация об авторах

Бонь Елизавета Игоревна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: asphodela@list.ru

Максимович Наталия Евгеньевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: mne@grsmu.by

Зиматкин Сергей Михайлович – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: smzimatkin@mail.ru

Валько Никита Андреевич – студент лечебного факультета УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: asphodela@list.ru

Кот Виктория Николаевна – студент лечебного факультета УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: asphodela@list.ru

Мосин Олег Вячеславович – студент лечебного факультета УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: asphodela@list.ru

Сульжицкий Александр Геннадьевич – студент лечебного факультета УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: asphodela@list.ru