

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 19, №2

2020



УДК 616.831.31-005.4.-092.913:618.33

14.03.03 Патологическая физиология

DOI: 10.37903/vsgma.2020:2.4

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ТЕМЕННОЙ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С СУБТОТАЛЬНОЙ И ТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ

© Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М.

*Гродненский государственный медицинский университет, 230009, Респ. Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80**Резюме*

Цель. Сравнительный анализ гистологических изменений нейронов теменной коры головного мозга крыс в условиях субтотальной и тотальной ишемии.

Методика. Эксперименты выполнены на 20 самках беспородных белых крыс. Субтотальную церебральную ишемию моделировали путем перевязки обеих общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза. Тотальную церебральную ишемию моделировали путем декапитации. Забор головного мозга производился спустя один час и одни сут. после моделирования церебральной ишемии.

Результаты. При сравнительном анализе гистологических нарушений нейронов в условиях субтотальной и тотальной ишемии выявлено уменьшение их размеров и изменение формы, развитие перичеллюлярного отека. Выявленные при субтотальной ишемии спустя 1 сут. изменения в целом аналогичны нарушениям в группе с тотальной ишемией в течение 1 ч., но менее выражены.

Заключение. Полученные данные о гистологических изменениях нейронов коры головного мозга при субтотальной и тотальной церебральной ишемии важны для дальнейшего изучения патогенеза ишемических повреждений головного мозга, создавая морфологическую базу для установления механизмов перехода нейронов из одного функционального состояния, обратимого, в другое – необратимое.

Ключевые слова: теменная кора, нейроны, ишемия

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE NEURONS OF THE PARIETAL BRAIN CORTEX OF RATS WITH SUBTOTAL AND TOTAL ISCHEMIA

Bon L.I., Maksimovich N.E., Zimatkin S.M.

*Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic Belarus**Abstract*

Objective. Comparative analysis of histological changes in neurons of the parietal cortex of rats under conditions of subtotal and total ischemia.

Methods. The experiments were performed on 20 females of outbred white rats. Subtotal cerebral ischemia was modeled by ligation of both common carotid arteries under conditions of intravenous thiopental anesthesia. Total cerebral ischemia was modeled by decapitation. Brain was taken one hour and one day after modeling cerebral ischemia.

Results. A comparative analysis of histological disorders of neurons in the conditions of subtotal and total ischemia revealed a decrease in their size and a change in shape, the development of pericellular edema. The changes detected during subtotal ischemia after 1 day are generally similar to the disorders in the group with total ischemia within 1 hour, but less pronounced.

Conclusion. The obtained data on histological changes in neurons of the cerebral cortex during subtotal and total cerebral ischemia are important for further study of the pathogenesis of ischemic brain damage, creating a morphological basis for establishing the mechanisms of transition of neurons from one functional state, that is reversible, to another – the irreversible

Keywords: parietal cortex, neurons, ischemia

Введение

Лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности во всем мире занимают сердечно-сосудистые и цереброваскулярные заболевания. Ежегодно в мире от сердечно-сосудистых заболеваний умирает около 7 млн., а от цереброваскулярных – около 6 млн. человек [27]. В России частота инсульта колеблется от 460 до 560 случаев на 100 тыс. населения [1]. До 85% всех инсультов обусловлено ишемией головного мозга (ИГМ), что предполагает необходимость проведения дальнейших исследований в этом направлении. Даже кратковременная ИГМ ведет к глубоким повреждениям нервной ткани по причине недостаточной оксигенации нейронов, снижения энергообразования, нарушения транспорта потенциалопределяющих ионов, изменения кислотно-основного состояния, эксайтотоксичности, окислительного стресса и апоптоза [9, 10]. При ИГМ происходит дистрофия нейронов, в которой выделяют несколько фаз. В начале возникают молекулярные и ультраструктурные изменения, в большинстве случаев обратимые. Затем наблюдаются обратимые морфологические нарушения, которые включают умеренный гиперхроматоз и незначительное набухание нейронов. В заключении возникает ряд необратимых дистрофических нейронов, которые проявляются сморщиванием и выраженным набуханием нейронов с их последующим апоптозом и некрозом [7]. Ранее проведенные исследования по изучению морфологических нарушений нейронов теменной коры головного мозга (ГМ) при субтотальной ишемии выявили уменьшение размеров перикарионов и увеличение количества гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов [3, 8]. Субтотальная ИГМ моделируется путем перевязки обеих общих сонных артерий (ОСА), несущих до 90% крови к ГМ. Представляет интерес изучение в сравнительном аспекте морфологических изменений при субтотальной и тотальной ИГМ (ТИГМ). Последняя представляет собой полное прекращение его кровоснабжения по обеим сонным и обеим базилярным артериям.

Цель работы – сравнительный анализ гистологических изменений нейронов теменной коры головного мозга крыс в условиях субтотальной и тотальной ишемии.

Методика

Эксперименты выполнены на 20 самках беспородных белых крыс массой 230±20 г. с соблюдением требований Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, использующихся для научных целей. Субтотальную ИГМ моделировали путем перевязки обеих ОСА в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг) – группа СИГМ (n=6). Тотальную церебральную ишемию моделировали путем декапитации – группа ТИГМ (n=6). Забор ГМ производился спустя один час и одни сут. после компрессии ОСА. Контрольную группу составили ложнопериоперированные крысы аналогичных пола и массы – контроль (n=6). После декапитации кусочки теменной коры больших полушарий фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы окрашивали 0,1% толуидиновым синим по методу Ниссля и на выявление рибонуклеопротеинов (РНП) по Эйнарсону.

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию и денситометрию осадка хромогена в гистологических препаратах проводили с помощью цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия), микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). Локализацию теменной коры в гистологических препаратах определяли с помощью стереотаксического атласа [2]. У каждого животного оценивали не менее 30 нейронов пятого слоя теменной коры, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа. В парафиновых срезах определяли количество больших пирамидных нейронов на единицу площади срезов коры ГМ. Среди общего количества различали клетки по интенсивности окраски цитоплазмы (хроматофилии): нормохромные – умеренно окрашенные, гиперхромные – темные, гиперхромные сморщенные – очень темные, с деформированными перикарионами, гипохромные – светло окрашенные, клетчатки – почти прозрачные, а также гиперхромные сморщенные нейроны с перичеселлюлярным отеком. Подсчитывали количество клеток каждого типа на 1 мм² ткани мозга. Для изучения размеров и формы перикарионов нейронов измеряли их площадь, форм-фактор и фактор элонгации.

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-WhitneyU-test) [1].

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении изменения хроматофилии цитоплазмы нейронов у крыс с СИГМ спустя 1 ч. отмечалось уменьшение количества нормохромных нейронов на 38% ($p < 0,05$), а спустя 1 сут. – на 61% ($p < 0,05$), по сравнению с показателями в контрольной группе. В группе ТИГМ они полностью отсутствовали, но наблюдали увеличение количества патологических форм нейронов: гиперхромных сморщенных, нейронов с перичеселлюлярным отеком и клеток-теней (рис. 1).

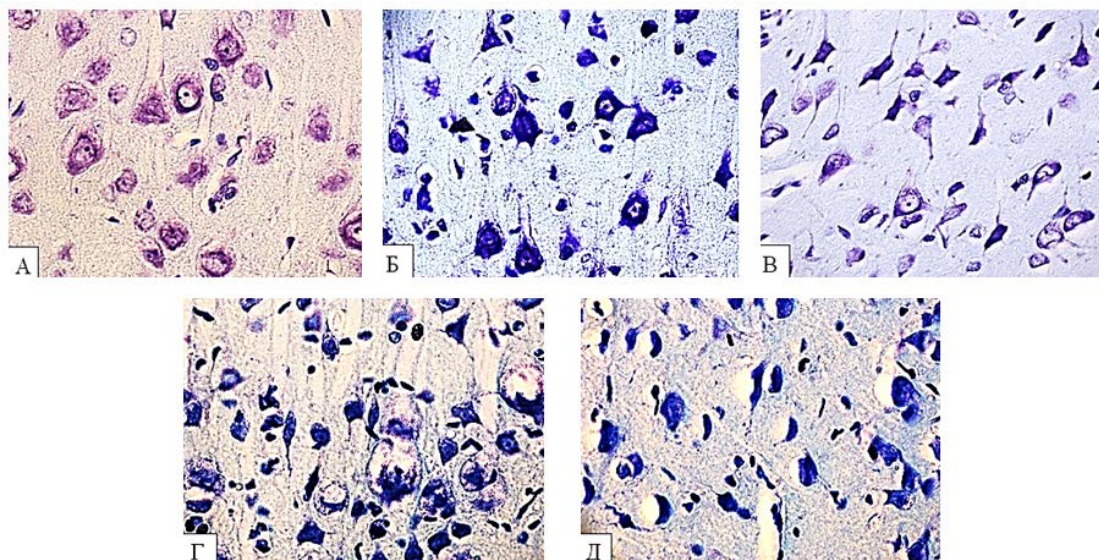


Рис. 1. Нейроны 5-го слоя теменной коры головного мозга крыс. А – контроль, Б – СИГМ 1 ч., В – СИГМ 1 сут., Г – ТИГМ 1 ч., Д – ТИГМ 1 сут. Цифровая микрофотография. Окраска по Нисслию. Ув. объектив Ч40. СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга; ТИГМ – тотальная ишемия головного мозга

При односторонней ИГМ, по сравнению с показателями в контроле, в группе СИГМ количество гиперхромных нейронов увеличилось на 79%, гиперхромных сморщенных – на 80% ($p < 0,05$), клеток-теней – на 60% ($p < 0,05$). У крыс с ТИГМ количество гиперхромных нейронов уменьшилось на 67% ($p < 0,05$), в то время как количество гиперхромных сморщенных нейронов возросло на 96% ($p < 0,05$), клеток теней – на 43% ($p < 0,05$), появились отечные набухшие нейроны ($p < 0,05$). При этом количество гиперхромных нейронов в группе ТИГМ было на 93% меньше ($p < 0,05$), а гиперхромных сморщенных нейронов – на 80% больше ($p < 0,05$), по сравнению с показателями в группе СИГМ.

Кроме изменений хроматофилии изучали изменения размеров (площадь, S) и формы (форм-фактор, фактор элонгации) нейронов. При односторонней ИГМ, по сравнению с показателями в контрольной группе, у крыс с СИГМ и ТИГМ отмечали уменьшение S перикарионов на 52% ($p < 0,05$) и 74,5% ($p < 0,05$), форм-фактора – на 10% ($p < 0,05$) и 33% ($p < 0,05$), и увеличение фактора элонгации на 20% ($p < 0,05$) и 33% ($p < 0,05$), соответственно (табл.).

Таблица. Размеры (площадь), показатели, характеризующие форму перикарионов нейронов теменной коры мозга крыс и содержание рибонуклеопротеинов (РНП) в цитоплазме нейронов, Me (LQ; UQ)

Группы	Площадь, мкм ²	Форм-фактор, ед.	Фактор элонгации, ед.	Содержание РНП, ед.	
Контроль	145(130;154)	0,9(0,9;0,9)	1,2(1,1;1,2)	0,15(0,14;0,16)	
СИГМ	1 ч.	69(67;74)*	0,8(0,8;0,9)	1,5(1,4;1,5)*	0,26(0,23;0,29)*
	1 сут.	56(53;61)*	0,6(0,6;0,7)	1,8(1,7;1,9)*	0,3(0,3;0,32)*
ТИГМ	1 ч.	37(27;47)**	0,6(0,6;0,6)*	1,8(1,7;1,8)*	0,4(0,35;0,43)**
	1 сут.	24(23;25)**	0,6(0,5;0,6)*	2,4(2,3;2,5)**	0,35(0,3;0,36)*

Примечание: * – $p < 0,05$ различия достоверны по сравнению с показателями в контроле, + – $p < 0,05$ по сравнению с показателями в группе СИГМ. СИГМ – субтотальная ишемия головного мозга; ТИГМ – тотальная ишемия головного мозга

При этом, по сравнению с показателями в группе СИГМ, в группе ТИГМ S нейронов уменьшилась на 46% ($p < 0,05$), форм-фактор – на 25% ($p < 0,05$), а фактор элонгации увеличился на 17% ($p < 0,05$). Это свидетельствует о более выраженном водно-электролитном дисбалансе и более глубоких повреждениях цитоскелета нейронов у крыс с ТИГМ.

При ИГМ продолжительностью 1 сут. в группе СИГМ и ТИГМ S нейронов уменьшилась на 61% ($p < 0,05$) и на 56% ($p < 0,05$), форм-фактор – на 33% ($p < 0,05$), а фактор элонгации возрос на 33% ($p < 0,05$) и на 50% ($p < 0,05$), соответственно. По сравнению с одночасовой ИГМ, в группе СИГМ S нейронов при суточной ИГМ уменьшилась на 19% ($p < 0,05$), а в группе ТИГМ – на 34% ($p < 0,05$), форм-фактор уменьшился на 25% ($p < 0,05$) в группе СИГМ, а в группе ТИГМ – изменений данного показателя не отмечалось ($p > 0,05$). Фактор элонгации же увеличился в группе СИГМ спустя 1 сут. ишемии на 17% ($p < 0,05$), по сравнению с одночасовой СИГМ, а в группе ТИГМ – на 25% ($p < 0,05$). Эти результаты свидетельствуют о прогрессировании нарушений систем регуляции водно-электролитного баланса клетки и усугублении повреждения цитоскелета нейронов.

Изменение содержания рибонуклеопротеинов. В условиях ИГМ в цитоплазме нейронов теменной коры мозга крыс выявлено значительное увеличение содержания в обеих группах РНП. При одночасовой ИГМ, по сравнению со значениями в контрольной группе, у крыс с СИГМ содержание РНП увеличилось на 42% ($p < 0,05$), в группе ТИГМ – на 62,5% ($p < 0,05$) (табл.).

При суточной ИГМ, у крыс с субтотальной ИГМ содержание РНП увеличилось на 50% ($p < 0,05$), у крыс с тотальной ИГМ – на 57% ($p < 0,05$), по сравнению со значениями в контрольной группе. При этом содержание РНП в группе ТИГМ было больше на 35% ($p < 0,05$), по сравнению со значениями у крыс с СИГМ при одночасовой ишемии. Значимых различий между значениями РНП в группах СИГМ и ТИГМ не наблюдалось ($p > 0,05$). Морфологические изменения (уменьшение размеров и деформация перикарионов нейронов, появление нейронов с периферическим отеком), выявленные в условиях ТИГМ спустя 1 сут. после моделирования церебральной ишемии в целом аналогичны нарушениям в группе СИГМ при 1-часовой ишемии, но более выражены. Так, в группе ТИГМ после 1-часовой ишемии отсутствовали нормохромные нейроны, практически не встречались гиперхромные, большую долю клеточной популяции составляли гиперхромные сморщенные нейроны. В соответствии с данными литературы изменения размеров и формы нейронов обусловлены водно-электролитными нарушениями, а также денатурацией белков цитоскелета нейронов [4, 11].

Полученные результаты согласуются с данными предыдущих исследований, в которых также отмечалось уменьшение размеров и сморщивание нейронов в коре больших полушарий головного мозга крыс в условиях одночасовой СИГМ [3, 8]. Спустя 1 сут. после моделирования тотальной церебральной ишемии наблюдалось превалирование нейронов с перичеселлюлярным отеком, тогда как в группе СИГМ такие клетки составили только 16% от общего количества нейронов. При тотальной церебральной ишемии нейроны с начальными признаками гиперхромии спустя 1 ч. ИГМ превращаются в сморщенные гиперхромные нейроны с последующим колликативным и коагуляционным некрозом или апоптозом спустя 1 сут. [4]. Гиперхромные нейроны расцениваются как гипоксически-измененные клетки. Появление сморщенных темных клеток при гипоксических и аноксических состояниях является универсальным проявлением патологических состояний нейронов, отражающим тяжесть повреждения вследствие глубокого энергодефицита, вызванного повреждением мембран, изменением водно-электролитного баланса и кислотно-основного состояния, ведущих к необратимым последствиям [4, 6, 7, 11].

На электронно-микроскопическом уровне в цитоплазме гиперхромных сморщенных нейронов наблюдается уплотнение органелл. При этом их ядро уменьшено в объеме, что приводит к увеличению плотности расположения свободных рибосом (соответственно и повышению концентрации РНП) и гиперхроматозу. Отмечается смещение ядрышка к периферии ядра и увеличение концентрации РНП вследствие их выхода из ядрышка и преобладания свободных рибосом над связанными. В гиперхромных сморщенных нейронах подавляются обменные процессы, в ядре блокируется выведение рибонуклеопротеинов в цитоплазму. Эти изменения являются причиной более интенсивного поглощения красителя [4, 6, 7, 11]. Для поздних этапов ишемии ГМ характерно развитие отека нейронов, пикноза ядер, деструкции органелл, распада нейрофибрилл и нейропиля. Наблюдаемые изменения нейронов (сморщивание и выраженное набухание) относятся к необратимым дистрофическим нарушениям и являются признаком некроза [6, 7].

Заключение

Таким образом, при сравнительном анализе гистологических нарушений нейронов теменной коры головного мозга крыс в условиях субтотальной и тотальной ишемии выявлено уменьшение их

размеров и изменение формы, развитие перипеллюлярного отека. Выявленные при СИГМ спустя 1 сут. изменения в целом аналогичны нарушениям в группе с ТИГМ в течение 1 ч., но менее выражены. Так, при ТИГМ продолжительностью 1 ч. отсутствовали не только нормохромные, но и гиперхромные нейроны, большую долю клеточной популяции составляли гиперхромные сморщенные нейроны. Спустя сут. у крыс с ТИГМ наблюдалось превалирование нейронов с периферическим отеком, тогда как в группе СИГМ они составили только 16% от общего количества.

Полученные данные о гистологических изменениях нейронов коры головного мозга при субтотальной и тотальной церебральной ишемии важны для дальнейшего изучения патогенеза ишемических повреждений головного мозга, создавая морфологическую базу для установления механизмов перехода нейронов из одного функционального состояния, обратимого, в другое – необратимое.

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'yuternyyu 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 zhitvotnym 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. 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)]
7. 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)]
8. Bon L.I., 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.
9. Chen H. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia // *Neurol. Res.* 2005. – V.27. – P. 280-286.
10. Clemens J.A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – V.28. – P. 1526-1531.
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 Наталья 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