

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПАРИЕТАЛЬНОЙ КОРЕ И ГИППОКАМПЕ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Бонь Е. И. (kudyan@tut.by), Максимович Н. Е. (mne@grsmu.by),
Зиматкин С. М. (smzimatkina@mail.ru)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Введение. Цереброваскулярные заболевания, в том числе инсульт, занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности во всем мире. Решение проблемы инсульта предполагает углубленное изучение его патогенеза, для чего необходимо выявление морфофункциональных изменений в мозге при данной патологии на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях.

Цель. Изучение гистологических нарушений нейронов парietальной коры и гиппокампа крыс с субтотальной ишемией головного мозга.

Материал и методы. Опыты выполнены на самках беспородных белых крыс массой 230±20 г. Использование крыс в качестве экспериментальных животных обусловлено сходством ангиоархитектоники и морфологии коры головного мозга у крыс и человека. Субтотальную ишемию головного мозга моделировали путем перевязки обеих общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг).

Результаты. Субтотальная ишемия головного мозга у крыс приводит к глубоким гистологическим изменениям нейронов парietальной коры и гиппокампа. Происходит увеличение количества патологических форм нейронов, изменяются их размеры и форма.

Выводы. У крыс с субтотальной ишемией головного мозга в парietальной коре и гиппокампе отмечаются значительные изменения нейронов (размеров, формы и степени хроматофилии цитоплазмы), в большей степени выраженные в парietальной коре, нейроны которой более чувствительны к недостатку кислорода.

Ключевые слова: гистологические изменения, парietальная кора, гиппокамп, ишемия.

Введение

Ишемические повреждения головного мозга лидируют в качестве причин его патологии (85% всех инсультов обусловлено ишемией головного мозга) и как одна из главных причин смертности (около 6 млн человек в мире ежегодно) и утраты трудоспособности [1, 2]. Даже кратковременная ишемия головного мозга (ИГМ) ведет к глубоким повреждениям нервной ткани по причине недостаточной оксигенации нейронов, снижения энергообразования, нарушения транспорта потенциал-определяющих ионов, изменения кислотно-основного состояния, эксцитотоксичности, окислительного стресса и апоптоза [3, 4, 5].

С целью углубленного изучения патогенеза ишемического повреждения необходимо выявление морфологических, биохимических и функциональных изменений в мозге на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях.

Кора головного мозга – высший отдел центральной нервной системы, являющийся материальной основой сложных форм поведения, сознания, мышления, памяти, «эвристической деятельности», по филогенетическому возрасту она разделяется на: неокортекс, или новая кора (фронтальная, парietальная, темпоральная и окципитальная кора), палеокортекс (гиппокамп, зубчатая извилина, миндалина и грушевидная кора) и архикортекс (кора обонятельных бугорков).

В парietальной коре, занимающей среднюю часть новой коры больших полушарий, находится центральная часть двигательного анализатора, регулирующего целенаправленные комбинированные движения, а также центры анализа

осязательных, болевых и температурных раздражителей. При ее повреждении сохраняется способность к движению в целом, но утрачивается способность совершать целенаправленные движения [6].

Гиппокамп (часть палеокортекса) находится в глубине больших полушарий головного мозга. Он является компонентом лимбической системы, обеспечивая пространственную ориентацию и участвуя в обонятельных и оборонительных реакциях. Гиппокамп имеет важное значение в процессах памяти. При его повреждении ухудшается ориентация в пространстве, развивается ретроградная амнезия, затрудняется выработка условных рефлексов, в результате чего теряется способность к обучению [6, 7].

Нейроны коры больших полушарий головного мозга и гиппокампа (в особенности его поля CA1) наиболее чувствительны к недостатку кислорода. Функциональные и биохимические признаки повреждения нейронов выявляются уже спустя 2 минуты ишемии головного мозга [7]. Однако существует дефицит представлений о гистологических изменениях в парietальной коре и гиппокампе при ИГМ, в том числе в сравнительном аспекте.

Целью работы стало изучение влияния субтотальной ИГМ на гистологические характеристики нейронов парietальной коры и гиппокампа головного мозга крыс в сравнительном аспекте.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 20 самках беспородных белых крыс массой 230±20 г с соблюдением требований Директивы Европей-

ского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей [8]. Животных содержали в кондиционируемом помещении (22°C) при смешанном освещении на стандартном рационе вивария и свободном доступе к корму и воде, группами не более пяти особей в клетке вивария.

Использование крыс в качестве экспериментальных животных обусловлено сходством ангиоархитектоники и морфологии коры головного мозга у крыс и человека [9]. Субтотальную ИГМ моделировали путем перевязки обеих общих сонных артерий в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг). Животных декапитировали после 60-минутной ишемии. Контрольную группу составили ложнопериоперированные крысы аналогичных пола и массы, которым воспроизводились все манипуляции, за исключением перевязки сосудов (контроль).

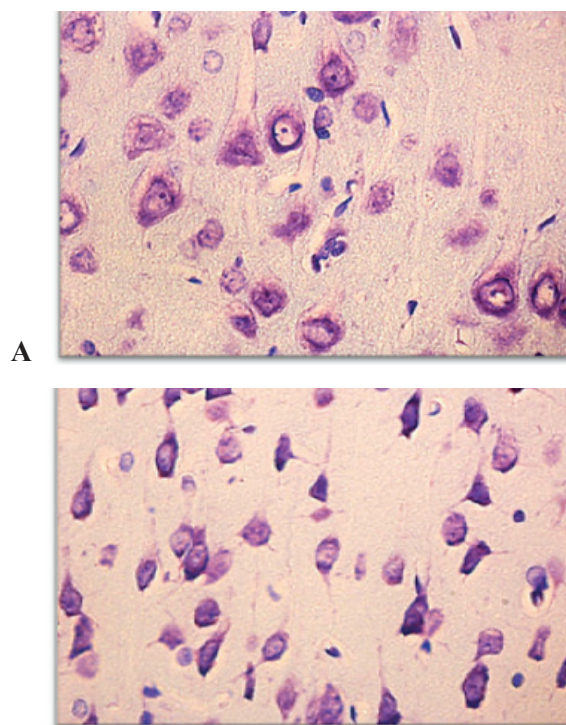
После декапитации быстро извлекали головной мозг, кусочки переднего отдела коры больших полушарий фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы окрашивали 0,1% толуидиновым синим по методу Ниссля и на выявление рибонуклеопротеинов по Эйнарсону.

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 париетальной коры и гиппокампа коры в гистологических препаратах мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [10]. 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.

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) [11].

Результаты и обсуждение

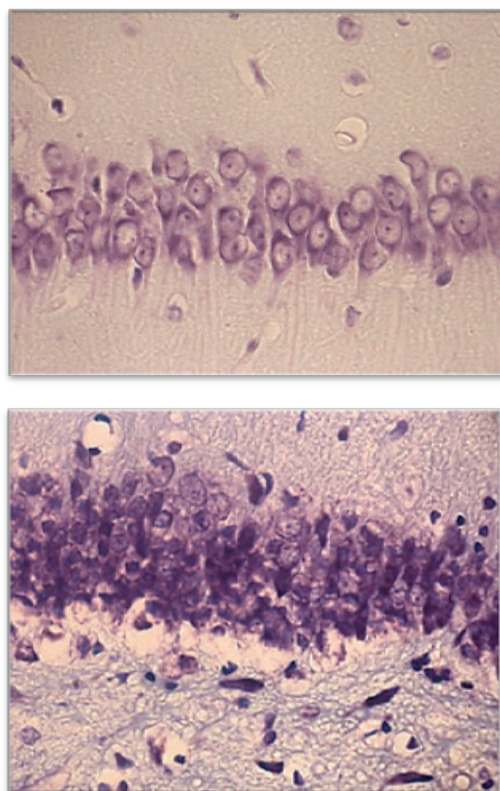
В препаратах головного мозга животных контрольной группы, окрашенных по Ниссля, преобладали нормохромные нейроны (рис. 1, 2). У крыс с ИГМ выявлено уменьшение количества нормохромных нейронов и увеличение патологических форм нейронов (гипер-, гипохромных нейронов и клеток-теней) в 5-м слое париетальной коры и пирамидном слое гиппокампа (рис. 1, 2, 3). Так, в париетальной коре количество гиперхромных нейронов увеличилось на 11%



А

Б

Рисунок 1. – Нейроны пятого слоя париетальной коры. А – контроль (преобладание нормохромных нейронов). Б – ИГМ (преобладание гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов). Цифровая микрофотография. Окраска по Ниссля. Ув. объектив $\times 40$



А

Б

Рисунок 2. – Нейроны пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа. А – контроль (преобладание нормохромных нейронов). Б – ИГМ (преобладание гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов). Цифровая микрофотография. Окраска по Ниссля. Ув. объектив $\times 40$.

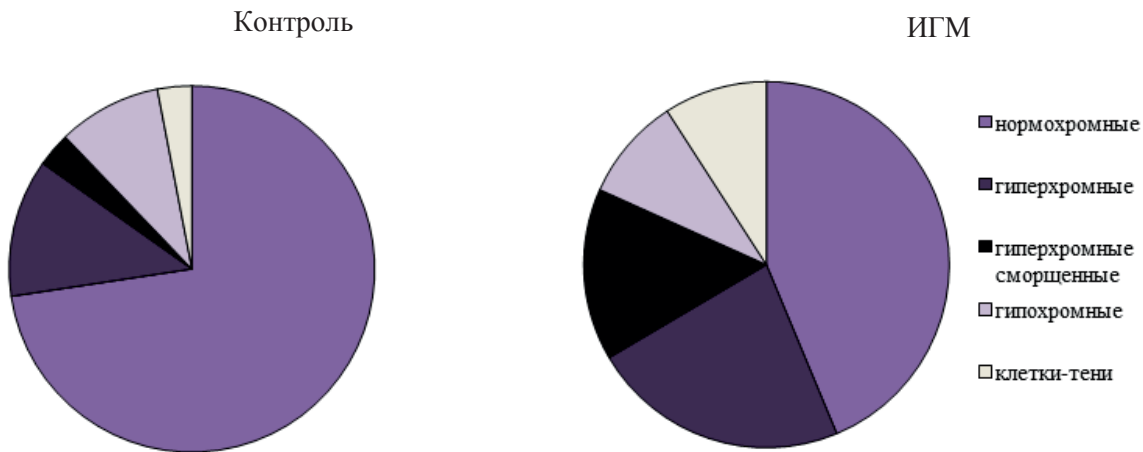


Рисунок 3. – Соотношение нейронов с разной степенью хромотофилии цитоплазмы в париетальной коре головного мозга (%)

($p < 0,05$), гиперхромных сморщенных клеток – на 12% ($p < 0,05$), клеток-теней – на 6% ($p < 0,05$). В гиппокампе количество гиперхромных нейронов увеличилось на 10% ($p < 0,05$), гиперхромных сморщенных клеток – на 13% ($p < 0,05$).

При морфометрии нейронов париетальной коры и гиппокампа выявлено значительное уменьшение площади их перикарионов – на 57% ($p < 0,05$) и 41% ($p < 0,05$), соответственно. Увеличивалась вытянутость тел нейронов (на 13% ($p < 0,05$) и 20% ($p < 0,05$), соответственно), уменьшалась их округлость (на 13% ($p < 0,05$) в каждом из отделов коры) (табл. 1, рис. 4).

Таблица 1. – Размеры и форма перикарионов нейронов (Me (LQ; UQ))

Группы животных	Зоны коры ГМ	
	париетальная кора	Гиппокамп
	площадь, мкм ²	
Контроль	170 (110; 204)	92(78; 102)
Опыт (ИГМ)	72,5 (68; 75)*	54 (46; 62)
	фактор элонгации, ед.	
Контроль	1,3 (1,25; 1,35)	1,22 (1,20; 1,25)
Опыт (ИГМ)	1,5 (1,40; 1,60)*	1,5 (1,40; 1,60)*
	форм-фактор, ед.	
Контроль	0,92 (0,90; 0,94)	0,92 (0,90; 0,94)
Опыт (ИГМ)	0,80 (0,75; 0,85)*	0,80 (0,78; 0,82)*

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с показателями в контроле

Предполагается, что данные изменения размеров и формы нейронов обусловлены водно-электролитными нарушениями, а также денатурацией белка.

Полученные результаты согласуются с данными других исследований, в которых также отмечалось уменьшение размеров нейронов, их сморщивание в коре больших полушарий головного мозга крыс в условиях ИГМ [12, 13].

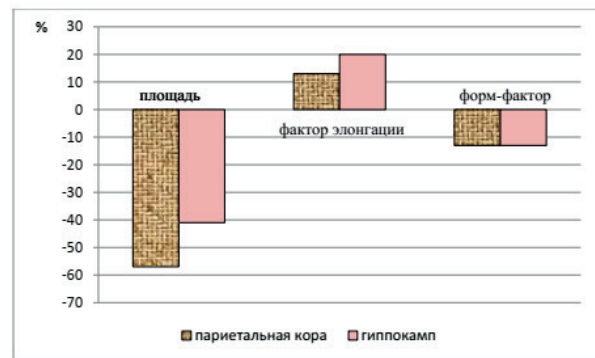


Рисунок 4. – Степень и направление изменения размеров и формы нейронов 5-го слоя париетальной коры и пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа крыс с ИГМ

Отмечалось значительное увеличение содержания рибонуклеопротеинов в цитоплазме нейронов 5-го слоя париетальной коры и гиппокампа крыс опытной группы – на 45% ($p < 0,05$) и 37% ($p < 0,05$), соответственно (табл. 2).

Таблица 2. – Содержание рибонуклеопротеинов (Me (LQ; UQ), в единицах оптической плотности)

Группы животных	Зоны коры ГМ	
	париетальная кора	гиппокамп
Контроль	0,16 (0,13; 0,17)	0,17 (0,15; 0,18)
Опыт (ИГМ)	0,29 (0,27; 0,3)*	0,27 (0,25; 0,28)*

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с показателями в контроле

После 60-минутной субтотальной церебральной ишемии в изучаемых отделах коры головного мозга значительно возрастает количество гиперхромных нейронов.

На электронно-микроскопическом уровне в их цитоплазме наблюдается уплотнение оргanelл. При этом цитоплазма и ядро гиперхромных сморщенных нейронов уменьшены в объеме, что привело к увеличению плотности расположения рибосом (соответственно, и рибонуклеопротеинов) и к 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 [14].

Как известно, выраженность нейродегенеративных изменений в головном мозге при его ишемии зависит от степени ее тяжести [7].

На морфологическом уровне при ИГМ наблюдается отек головного мозга, раннее про-

явление которого – появление признаков нарушения микроциркуляции: стаз, плазматическое пропитывание и некробиотические изменения стенок кровеносных сосудов головного мозга с повышением их проницаемости. Ведущими звеньями патогенеза повреждения ГМ при его ишемии является энергодефицит, а также избыток продуктов метаболизма, накапливающихся в зоне ишемии, что обуславливает снижение пластических процессов, развитие в нейронах дистрофических, атрофических и некротических изменений [15, 16].

Таким образом, субтотальная ишемия головного мозга приводит к значительным гистологическим нарушениям нейронов парietальной коры и гиппокампа крыс, включающим изменение размеров, формы и степени хроматофилии цитоплазмы нейронов. В большей степени изменения выражены в парietальной коре, нейроны которой более чувствительны к дефициту кислорода.

Литература

1. Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population / S. E. Sacco [et al.] // *Stroke*. – 1991. – Vol. 22 (10). – P. 1236-1241.

2. Maksimovich, Ye. N. Epidemiology of ischemic strokes in the Grodno region (Belarus) [Electronic resource] / Ye. N. Maksimovich, T. P. Pronko, N. Ye. Maksimovich // 24 European Stroke Conference : abstract e-book, Vienna, Austria, 13-15 May 2015. – Vienna, 2015. – P. 178. – Mode of access: <http://eurostroke.eu>. – Date of access: 07.02.2018.

3. Chan, P. H. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia / P. H. Chan // *Neurochemical Research*. – 2004. – Vol. 29 (11). – P. 1943-1949.

4. Chen, H. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia / H. Chen, D. Sun // *Neurological Research*. – 2005. – Vol. 27, № 3. – P. 280-286. – doi:10.1179/016164105X25243.

5. Arundine, M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury / M. Arundine, M. Tymianski // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2004. – Vol. 61, № 6. – P. 657-668. – doi:10.1007/s00018-003-3319-x.

6. Гистология, цитология и эмбриология : учебник / Ю. И. Афанасьев [и др.] ; под ред. Ю. И. Афанасьева, С. Л. Кузнецова, Н. А. Юриной. – 6-е изд., переаб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 768 с.

7. Effect of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia [Electronic resource] / M. D. Ryosuke [et al.] // *Anesthesiology*. – 2002. – Vol. 96. – P. 705-710. – Mode of access: <http://anesthesiology.pubs.asahq.org/article.aspx?ArticleId=1944408>. – Date of access: 07.02.2018. – doi: 10.1097/00000542-200203000-00029.

8. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes : text with EEA relevance 20.10.2010 [Electronic resource] // Official Journal of the European Union (Strasbourg). – 2010. – 46 p. – Mode of access: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063>. – Date of access: 07.02.2018.

9. Бонь, Е. И. Микроскопическая организация изокортекса крысы / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // *Новости медицинского биологических наук*. – 2017. – № 4. – С. 80-88.

10. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – 6th ed. – London : Academic Press, 2007. – 448 p.

11. Батин, Н. В. Компьютерный статистический анализ данных : учебно-методическое пособие / Н. В. Батин. – Минск : Институт подготовки научных кадров НАН Беларуси, 2008. – 160 с.

12. Морфологические изменения нейронов головного мозга крыс при двух-, четырехсосудистой моделях ишемического повреждения головного мозга крыс и их коррекция тадалафилом в эксперименте [Электронный ресурс] / О. В. Мартынова [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – № 6. – С. 56-61. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25953>. – Дата доступа: 07.02.2018.

13. Рукан, Т. А. Морфофункциональные изменения нейронов фронтальной коры головного мозга в условиях его ишемии-реперфузии / Т. А. Рукан, Н. Е. Максимович, С. М. Зиматкин // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. – 2012. – № 4 (40). – С. 35-38.

14. Baraskay, P. Generalization of seizures parallels the formation of "dark" neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat / P. Baraskay, Z. Szepesi, G. Orban // *Brain Research*. – 2008. – Vol. 1228. – P. 217-228.

15. Chalmers, G. Adaptability of the oxidative capacity of motoneurons / G. Chalmers, R. R. Roy, V. R. Edgerton // *Brain Research*. – 1992. – Vol. 570, iss. 1-2. – P. 1-10.

16. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury / B. C. White [et al.] // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2000. – Vol. 179, № 1-2. – P. 1-33.

References

1. Sacco SE, Whisnant JP, Broderick JP, Phillips SJ, O'Fallon WM. Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population. *Stroke*. 1991;22:1236-1241.

2. Maksimovich YeN, Pronko TP, Maksimovich NYe. Epidemiology of ischemic strokes in the Grodno region (Belarus) [Internet]. In: 24 European Stroke Conference. Abstract e-book; 2015 May 13-15; Vienna, Austria. Vienna; 2015. p. 178. Available from: <http://eurostroke.eu>.

3. Chan PH. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochemical Research*. 2004;29(11):1943-1949.

4. Chen H, Sun D. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia. *Neurological Research*. 2005;27(3):280-286. doi:10.1179/016164105X25243.
5. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004;61(6):657-668. doi:10.1007/s00018-003-3319-x.
6. Afanasev JuI, Kuznecov SL, Jurina NA, Kotovskij EF, Aleshin BV, Vinnikov JaA, Katinas GS, Radostina AI, Torbek VJe, Chencov JuS, Gorjachkina VL; Afanasev JuI, Kuznecov SL, Jurina NA, eds. *Gistologija, citologija i jembriologija* [Histology, cytology and embryology]. 6th ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2006. 768 p. (Russian).
7. Nakayama R, Yano T, Ushijima K, Abe E, Terasaki H. Effect of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia [Internet]. *Anesthesiology*. 2002;96:705-710. Available from: <http://anesthesiology.pubs.asahq.org/article.aspx?articleid=1944408>. doi: 10.1097/00000542-200203000-00029.
8. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes: text with EEA relevance 20.10.2010 [Internet]. *Official Journal of the European Union* (Strasbourg). 2010. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063>.
9. Bon EI, Zimatkin SM. Mikroskopicheskaja organizacija izokorteksa krsy [Microscopic organization of the rat isocortex]. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of medical and biological sciences]. 2017;4:80-88. (Russian).
10. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. London: Academic Press; 2007. 448 p.
11. Batin NV. Kompjuternyj statisticheskij analiz dannyh [Computer statistical analysis of data: the teaching method]. Minsk: Graduate School of the National Academy of Sciences of Belarus; 2008. 160 p. (Russian).
12. Martynova OV, Tverskoj AV, Pokrovskij MV, Martynov MA, Shkileva IJu, Sheljakina EV, Anciferov OV, Muhina TS. Morfologicheskie izmenenija neyronov golovnogogo mozga krys pri dvuh-, chetyrjohsodustoj modeljah ishemicheskogo povrezhdenija golovnogogo mozga krys i ih korrekcija tadalafilom v jeksperimente [Morphological changes in brain neurons of rats with two-, four-cavity models of ischemic damage to the brain of rats and their correction by tadalafil in the experiment] [Internet]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija* [Modern problems of science and education]. 2016;6:56-61. Available from: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25953>. (Russian).
13. Rukan TA, Maksimovich NYe, Zimatkin SM. Morfofunkcionalnye izmenenija neyronov frontalnoj kory golovnogogo mozga v uslovijah ego ishemii-reperfuzii erfuzi [Morphofunctional changes in neurons of the frontal cerebral cortex of the rats under its ischemia-reperfusion]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of the Grodno State Medical University]. 2012;4(40):35-38. (Russian).
14. Baraskay P, Szepesi Z, Orban G. Generalization of seizures parallels the formation of “dark” neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat. *Brain Research*. 2008;1228:217-228.
15. Chalmers GR, Roy RR, Edgerton VR. Adaptability of the oxidative capacity of motoneurons. *Brain Research*. 1992;570:1-10.
16. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O’Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*. 2000;179:1-33.

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE PARIETAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF RATS AFTER INCOMPLETE CEREBRAL ISCHEMIA

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

Educational Institution “Grodno State Medical University”, Grodno, Belarus

Background. Cerebrovascular diseases, including stroke, take a leading position in the structure of morbidity and mortality worldwide. Solving the problem of stroke requires an in-depth study of its pathogenesis, for which it is necessary to identify morphofunctional changes in the brain at the cellular, subcellular and molecular levels.

Purpose: To study histological disorders of neurons in parietal cortex and hippocampus of rats after incomplete cerebral ischemia.

Material and methods. The experiments were performed on female white rats weighing 230 ± 20 g. The use of rats as experimental animals was due to the similarity of angio-architectonics and morphology of the cerebral cortex in rats and humans. Incomplete cerebral ischemia was modeled by ligation of both common carotid arteries under intravenous thiopental anesthesia (40-50 mg / kg).

Results. Incomplete cerebral ischemia leads to histological changes in the neurons of the parietal cortex and hippocampus. There is a decrease in the number of normochromic and an increase in the number of pathological forms of neurons, their size and shape change significantly.

Conclusions. Incomplete ischemia of the brain leads to significant histological changes in the neurons of the parietal cortex and hippocampus of rats. The disorders are similar, but they are more pronounced in the parietal cortex, the neurons of which are more sensitive to lack of oxygen.

Keywords: histological changes, parietal cortex, hippocampus, ischemia.

Поступила: 12.02.2018

Отрецензирована: 09.04.2018