

# МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ЕГО ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

Т.А. Рукав, Н.Е. Максимович, С.М. Зиматкин

УО "Гродненский государственный медицинский университет", Гродно, Беларусь

*Исследования выполнены на 21 лабораторной крысе. Установлено, что при субтотальной ишемии головного мозга крыс отмечается наличие морфологических изменений формы и размеров нейронов всех исследуемых слоев и их ядер. Увеличивается количество гипохромных, гиперхромных не сморщенных и гиперхромных сморщенных нейронов, в пятом слое появляются клетки-тени и случаи сателлитоза и нейронофагии. Отмечается снижение белоксинтетической функции нейронов. Восстановление кровотока не приводит к устранению этих морфофункциональных изменений, более того, некоторые изменения усугубляются.*

**Ключевые слова:** ишемия, реперфузия, головной мозг, нейроны, крысы

**Введение.** Одной из наиболее актуальных проблем современной медицины являются острые нарушения мозгового кровообращения. По данным ВОЗ, смертность от сосудистых поражений головного мозга занимает третье место после заболеваний сердца, онкологических заболеваний и первое место среди причин первичной инвалидности.

Ключевыми звеньями патогенеза церебральной ишемии являются остро возникающий недостаток поступления кислорода в мозг [5], угнетение в тканях мозга аэробного и активация анаэробного пути утилизации глюкозы, снижение энергообразования, нарушение транспорта различных ионов, изменение кислотно-основного состояния [4]. Даже кратковременная ишемия головного мозга ведет к его глубоким повреждениям из-за недостатка образования энергии [2], нарушения синтеза белков, эксцитотоксичности, активации воспалительного процесса, окислительного стресса [5].

Существует два критических уровня мозгового кровотока: первый (20 мл/100 г/мин) - для биоэлектрической активности клетки, второй (15 мл/100 г/мин) - для клеточных насосов и поддержания ионного гомеостаза. Клетки с объемным кровотоком, находящимся между двумя этими уровнями, образуют зону ишемической "полутени". При этом функция клеток временно приостанавливается, нарушается, но структурных необратимых повреждений еще нет. При лечении ишемии мозга происходит борьба за восстановление функции этой зоны ишемической "полутени".

Для практической медицины интерес представляют не только патогенетические изменения при ишемии, но и так называемые реперфузионные изменения. Вслед за восстановлением кровотока, который может возникнуть как спонтанно, так и после медикаментозного или хирургического его восстановления, возникает каскад патологических процессов, связанных с реперфузией - постишемический реперфузионный синдром [2]. При этом кровь поступает в зону ишемизированной артерии, с повышенной проницаемостью сосудистой стенки, это вызывает свой комплекс патогенетических механизмов, который также необходимо учитывать. После гипоксии вновь поступающий кислород включается в процессы свободнорадикального окисления, что ведет к цитотоксическому действию [5]. Усугубляются мембранные повреждения, изменяется водно-электролитный баланс между вне- и внутриклеточными областями. При этом нарастает энергодефицит в зоне постишемической реперфузии [2].

Учитывая значительную роль заболеваний, связанных

с нарушением мозгового кровообращения ишемического генеза, представляется важным выявление морфофункциональных изменений нейронов фронтальной коры головного мозга в условиях его ишемии-реперфузии в ранние сроки.

**Цель исследования.** Изучить влияние экспериментальной ишемии-реперфузии головного мозга крыс в ранние (30 минут) сроки реперфузии на морфофункциональное состояние нейронов фронтальной коры.

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на 21 лабораторной крысе-самце, массой 210-290 г, которые получены из вивария Гродненского государственного медицинского университета (ГрГМУ). Длительность акклиматизационного периода для всех животных составляла 14 дней. Животные содержались на свободном потреблении корма (стандартный рацион для лабораторных крыс) и имели свободный доступ к воде. Все эксперименты одобрены этическим комитетом ГрГМУ. Выбор экспериментальных животных был обусловлен сходством ангиоархитектоники головного мозга крыс и человека.

Животные разделены на 3 группы, по 7 крыс в каждой группе. Ишемию головного мозга моделировали с помощью двусторонней перевязки общих сонных артерий продолжительностью 30 минут под внутривенным тиопенталовым наркозом (40-50 мг/кг). Животных забивали после 30-минутной ишемии (1 группа) и спустя 30 минут после восстановления кровотока (2 группа). Контрольную группу (контроль) составили ложнопериоперированные животные аналогичных пола и массы, которым воспроизводились наркотизация, кожный разрез и выделение артерий без последующей перевязки сосудов.

После декапитации быстро извлекали головной мозг, кусочки фронтальной коры фиксировали в жидкости Карнуа, после чего материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, пропитывали ксилолом и заключали в парафин. Для светооптического исследования готовили фронтальные серийные срезы толщиной 8-10 мкм и окрашивали по Эйнарсону (выявление РНК), по Нисслю [3], по Викторову (для выявления погибающих нейронов) [6]. Содержание РНК в цитоплазме нейронов 2-го, 3-го и 5-го слоев фронтальной коры оценивали с помощью компьютерного анализатора изображений, используя программу Image Warp (США). Микрофотографирование препаратов осуществляли с помощью микроскопа Axioscope 2 plus и цифровой видеокамеры Leica DFC 320. В ходе морфометрического анализа определяли размер и форму нейронов 2-го, 3-го и 5-го слоев и их ядер, количество нейронов и относительное (%) содержание нормохромных, ги-

похромных, гиперхромных сморщенных, гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней.

Результаты выражали в виде медианы (Me) и рассеяния (25, 75 процентилей). Для сравнения величин использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ . Статистическую обработку данных осуществляли с применением пакета STATISTICA 6.0.

**Результаты исследований и обсуждение.** После ишемии и ишемии с реперфузией во всех изученных слоях фронтальной коры численная плотность нейронов не изменилась. Однако увеличилось количество гиперхромных сморщенных, гипохромных и гиперхромных не сморщенных нейронов (рис.1). При этом гипохромия, гиперхромия без сморщивания расцениваются как изменения обратимого характера, а образование "клеток-теней", гиперхромии и сморщивание относят к "тяжелым" необратимым изменениям нейронов [1]. В опытных группах преимущественно в 5-м слое появились клетки-тени, отмечались случаи сателлитоза и нейронофагии (рис.2). При этом относительное количество нормохромных нейронов в группе с ишемией уменьшилось на 17% во втором слое, на 14% - в третьем и на 24% - в пятом слое ( $p=0,002$ ). В группе с реперфузией относительное количество нормохромных нейронов уменьшилось на 29% во 2-м и 3-м слоях и на 26% - в 5-м слое по сравнению с контролем ( $p=0,002$ ) и в 3-м слое на 15% по сравнению с ишемией ( $p=0,01$ ). В 3-м и 5-м слоях коры обеих опытных групп встречаются клетки с расширенным апикальным отростком, в гиперхромных сморщенных нейронах он штопорообразно извивается. В цитоплазме некоторых нейронов 5-го слоя отмечается частичный лизис хроматофильного вещества. Ядрышки в ядрах некоторых нейронов всех слоев расположены эксцентрично.

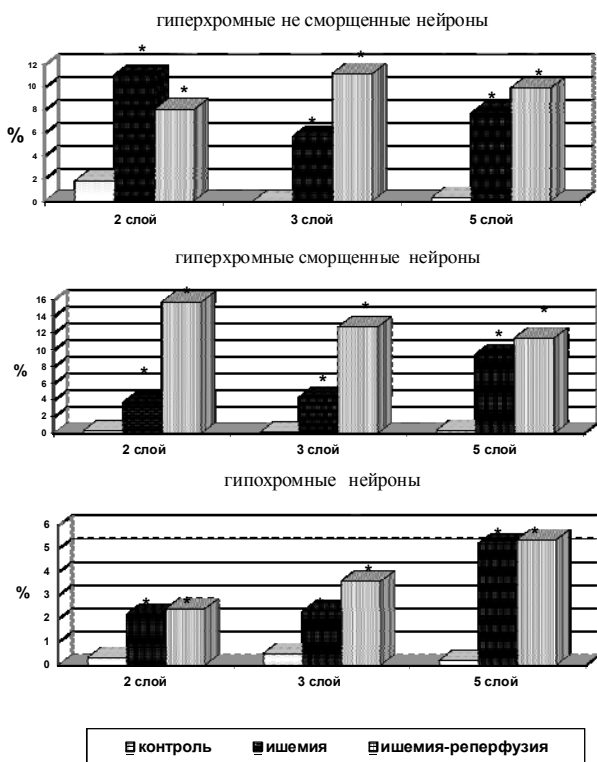


Рисунок 1 - Процентное содержание нейронов фронтальной коры головного мозга при окраске по методу Ниссля

Примечание - \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

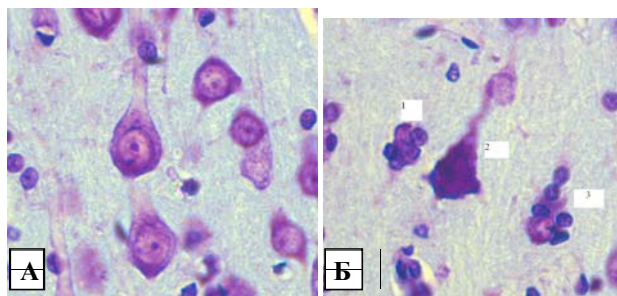


Рисунок 2 - Нейроны 5-го слоя фронтальной коры головного мозга крыс. Окраска по Ниссля. Ув. 400.

Цифровая микрофотография.  
А - в контрольной группе; Б - в группе с ишемией-реперфузией (1 - нейронофагия, 2 - гиперхромный сморщенный нейрон, 3 - сателлитоз)

При окраске по Викторову на выявление погибающих нейронов установлено, что они практически отсутствуют у контрольных животных (не более 1-2%) и появляются во всех исследуемых слоях как при ишемии, так и при реперфузии. Во 2-м слое фронтальной коры погибающие нейроны составляют среди всех нейронов 18% в группе с ишемией и 28% - в группе с реперфузией по сравнению с группой контроль ( $p=0,002$ ). В 3-м слое процент погибающих нейронов составляет 17% и 28% у крыс с ишемией и ишемией-реперфузией ( $p=0,002$ ), и при ишемии-реперфузии их количество увеличивается на 12% по сравнению с группой с ишемией ( $p=0,006$ ). В 5-м слое при ишемии погибающие нейроны составляют 17% ( $p=0,002$ ), а при ишемии-реперфузии - 27% ( $p=0,002$ ), что на 10% больше, чем в опытной группе без восстановления кровотока ( $p=0,03$ ).

Морфологические показатели нейронов 2-го слоя и их ядер при тридцатиминутной субтотальной ишемии статистически не отличаются от таковых в контрольной группе. В группе с тридцатиминутной реперфузией нейроны 2-го слоя теряют свою сферичность, о чем свидетельствует уменьшение форм-фактора на 1,7% по сравнению с контролем ( $p=0,03$ ). Ядра нейронов этого слоя удлиняются, о чем свидетельствует увеличение фактора элонгации на 4% и уменьшение минимального диаметра ядра на 5% по сравнению с контролем ( $p=0,03$  и  $p=0,04$ , соответственно).

При анализе морфометрических показателей нейронов 3-го слоя и их ядер статистически значимых различий не выявлено ни при ишемии, ни при реперфузии по сравнению с контролем. Однако минимальный диаметр при реперфузии статистически значимо уменьшается на 7% по сравнению с ишемией ( $p=0,03$ ).

Нейроны 5-го слоя при ишемии уменьшаются в размерах, о чем свидетельствует уменьшение площади нейронов, максимального диаметра и периметра по сравнению со значениями в контроле. Статистически значимо уменьшаются площадь ядер нейронов, их периметр, максимальный и минимальный диаметры по сравнению со значениями в контроле.

При сравнении нейронов 5-го слоя при реперфузии с нейронами в контрольной группе отмечается уменьшение их размеров, о чем свидетельствует уменьшение площади нейронов, максимального и минимального диаметров и периметра. Клетки теряют свою сферичность как в сравнении с контролем, так и с ишемией (т.к. уменьшается форм-фактор), нейроны при этом более длинные, чем в группе с ишемией, о чем свидетельствует увеличение фактора элонгации (табл.1). Ядра нейронов также уменьшаются, однако форма их не изменяется (табл.2).

**Таблица 1** - Морфометрическая характеристика нейронов 5-го слоя фронтальной коры головного мозга (Ме (25%;75%))

Параметры	Нейроны 5-го слоя		
	контроль	ишемия	ишемия-реперфузия
Площадь (мкм)	220,48 (198,57; 37,34)	179,15* (163,43; 216,30)	164,95* (145,51; 197,18)
фактор элонгации	1,37 (1,34; 1,52)	1,37 (1,30; 1,37)	1,40 <sup>^</sup> (1,37; 1,54)
форм-фактор	0,85 (0,82; 0,87)	0,84 (0,83; 0,85)	0,82* <sup>^</sup> (0,80; 0,83)
D max	20,56 (19,05; 21,16)	18,16* (17,46; 19,50)	18,31* (17,16; 19,71)
D min	13,66 (12,69; 14,27)	12,53 (11,93; 13,85)	12,04* (11,48; 12,79)
периметр (мкм)	56,63 (53,71; 59,74)	53,07* (48,83; 55,47)	51,44* (49,02; 54,80)

Примечание - \* - статистически значимые различия с контролем,  $p < 0,05$

<sup>^</sup> - статистически значимые различия с ишемией,  $p < 0,05$

D max - максимальный диаметр

D min - минимальный диаметр

**Таблица 2** - Морфометрическая характеристика ядер нейронов 5-го слоя фронтальной коры головного мозга (Ме (25%;75%))

Параметры	Ядра нейронов 5-го слоя		
	контроль	ишемия	ишемия-реперфузия
Площадь (мкм)	89,96 (83,69; 101,21)	71,74* (68,31; 79,3)	70,63* (68,98; 75,62)
D max	12,37 (11,74; 12,73)	10,93* (10,66; 11,72)	10,97* (10,92; 11,29)
D min	9,21 (8,77; 9,47)	8,51* (8,07; 8,59)	8,24* (8,13; 8,38)
периметр (мкм)	36,04 (34,75; 38,00)	32,31* (31,64; 33,60)	32,41* (31,66; 33,30)

Примечание - \* - статистически значимые различия с контролем,  $p < 0,05$

D max - максимальный диаметр

D min - минимальный диаметр

Установлено уменьшение содержания РНК в цитоплазме нейронов всех исследуемых слоев фронтальной коры. В нейронах 2-го слоя в 1-й и во 2-й группах отмечалось уменьшение содержания РНК на 23% и 26,5%, соответственно, по сравнению с контролем ( $p=0,002$ ). В нейронах 3-го слоя содержание РНК также уменьшается в группе с ишемией и в группе с ишемией-реперфузией на 26% и 25%, соответственно, по сравнению с контролем ( $p=0,002$ ). В нейронах 5-го слоя отмечается снижение содержания РНК на 26% в обеих опытных группах по сравнению с контролем ( $p=0,002$ ) (табл.3).

**Таблица 3** - Содержание РНК в цитоплазме нейронов фронтальной коры головного мозга крыс (окраска по Эйнарсону), ед. опт. пл. (Ме (25%;75%))

Слой фронтальной коры	контроль	ишемия	ишемия-реперфузия
2-й слой	0,219 (0,215; 0,235)	0,169* (0,161; 0,172)	0,161* (0,149; 0,165)
3-й слой	0,217 (0,210; 0,229)	0,160* (0,156; 0,164)	0,162* (0,155; 0,174)
5-й слой	0,235 (0,220; 0,250)	0,173* (0,163; 0,176)	0,173* (0,163; 0,174)

Примечание - \* - статистически значимые различия с контролем,  $p < 0,05$

При кратковременной ишемии и ишемии-реперфузии головного мозга увеличивается количество гипохромных, гиперхромных не сморщенных, гиперхромных сморщенных нейронов и появляются клетки-тени, что свидетельствует о перенапряжении одних нейронов и необратимых изменениях в других клетках. Значительно увеличивается количество ацидофильных нейронов. Известно, что ацидофилия свидетельствует о тяжелом повреждении нейронов и их гибели. При этом количество гибнущих нейронов (по Викторову) возрастает во всех слоях коры. Однако общая численная плотность нейронов в обеих опытных группах при этом не изменяется.

При субтотальной ишемии отмечают выраженные структурные и биохимические (содержание РНК в цитоплазме) нарушения нейронов фронтальной коры мозга, что свидетельствует о нарушении биосинтетических процессов. Восстановление мозгового кровотока после ишемии не приводит к улучшению нейрогистологических показателей, что свидетельствует о необратимости ряда структурных повреждений, подтверждая опасность для мозга изучаемых расстройств мозгового кровообращения.

### Выводы

1. В нейронах коры головного мозга крыс, подвергнутых кратковременной субтотальной ишемии, развиваются значительные морфофункциональные изменения. Они проявляются появлением значительного количества гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней, а также погибающих нейронов, уменьшением размеров и изменением формы перикарионов нейронов и их ядер.

2. Морфологические изменения нейронов при ишемии сопровождаются нарушением биосинтетических процессов, о чем свидетельствует снижение РНК в цитоплазме нейронов изучаемых слоев фронтальной коры головного мозга крыс.

3. Восстановление мозгового кровотока в течение 30 минут не приводит к нормализации структурно-функциональных изменений, а даже способствует усугублению изменений отдельных показателей.

### Литература

1. Жаботинский, Ю.М. Нормальная и патологическая морфология нейрона / Ю.М. Жаботинский - Л.: Медицина, 1965. - 323с.
2. Максимович, Н.Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга / Н.Е. Максимович. - Гродно, 2004. - 184с.
3. Меркулов, Г.А. Курс патологической анатомии и гистологии / Г.А. Меркулов - Л.: Медицина, 1969. - 423с.
4. Нечипуренко, Н.И. Основные патологические механизмы ишемии головного мозга / Н.И. Нечипуренко, И.Д. Пашковская, Ю.И. Мусиенко // Медицинские новости. - 2008. - № 1. - С. 7-13.

5. Чугунов, А.В. Коррекция свободнорадикального окисления - патогенетический подход к лечению острого ишемического инсульта / А.В. Чугунов, П.Р. Камчатнов, Н.А. Михайлова // Журнал неврологии и психиатрии. - 2009. - №10. - С. 65-67.

6. Victorov, I.V. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin / I.V. Victorov, K. Prass, U. Dirnagl // Brain Research Protocols. - 2000. - №5. - P. 135-139.

## MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN NEURONS OF THE FRONTAL CEREBRAL CORTEX OF RATS UNDER ITS ISCHEMIA-REPERFUSION

T.A. Rukan, N.Ye. Maksimovich, S.M. Zimatkin

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

---

*The experiments were carried out on 21 laboratory rats. It was established that subtotal ischemia of rat brain was associated with morphologic changes in the shape and size of the neurons of all the studied layers and their nuclei. The number of hypochromic, hyperchromic non-contracted neurons and that of hyperchromic contracted neurons increased. There were ghost cells and cases of satellitosis and neuronophagy in the fifth layer. Protein synthetic function of neurons decreased. Blood flow recovery did not result in the elimination of these morphofunctional changes, moreover, some changes worsened.*

**Key words:** ischemia, reperfusion, brain, neurons, rats.

---

Поступила 12.10.2012