

# ПОЛНАЯ ИШЕМИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА. ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОНОВ ТЕМЕННОЙ КОРЫ И ГИППОКАМПА КРЫС

Бонь Е. И., Максимович Н. Е., Зиматкин С. М., Пумпур М. П.

Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

**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.

**Цель.** Анализ изменений морфологических характеристик нейронов таких филогенетически разных отделов коры головного мозга (теменной коры и гиппокампа) крыс в различные периоды после тотальной церебральной ишемии.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на 42 самцах беспородных белых крыс с начальной массой  $240 \pm 20$  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 ( $22^{\circ}\text{C}$ ) 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 минуте, а также спустя 5 и 24 часа 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 и обсуждение.** На 15-й минуте тотальной ишемии нейроны теменной коры и гиппокампа значительно уменьшались в размерах – на 47 и 22%, соответственно ( $p < 0,05$ ). К 30 минутам 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 часам 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 ( $p < 0,05$ ).

Форма нейронов значительно менялась уже к 15-й минуте – они становились более вытянутыми (на 25%,  $p < 0,05$ ). К 60-й минуте 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% ( $p < 0,05$ ).

На 15-й минуте количество нормохромных нейронов уменьшилось на 63% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с 1 минутой, а на 60-й минуте они полностью исчезали. Количество гиперхромных нейронов возрастало к 15 минутам в 3 раза, а затем прогрессивно снижалось. Гиперхромные сморщенные нейроны составляли большинство клеток в изучаемых отделах коры на 30-60-й минутах, а затем, спустя 5 и 24 часа, в популяции нейронов преобладали клетки с перипеллюлярным отеком. Сходным с изменением количества гиперхромных

нейронов, изменялось и концентрация рибонуклеопротеинов в цитоплазме клеток, достигая максимума к 60 минуте тотальной ишемии и снижаясь к 1 суткам, что объясняется большим количеством нейронов с перичеселлюлярным отеком, обладающих низкой степенью хроматофилии цитоплазмы.

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].

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 нейрофибрилл, 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 минуте тотальной церебральной ишемии схожи с теми, которые были описаны на 60-й минуте 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 минуте 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.

**Выводы.** 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.

#### Список литературы:

1. Батин, Н. В. Компьютерный статистический анализ данных: учеб.-метод. пособие. – Минск : Институт подготовки научных кадров Национальной Академии Наук Беларуси, 2008. – 235 с.
2. Бонь, Е. И. Микроскопическая организация изокортекса крысы / Е. И. Бонь, С. . Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2017. – № 4. – С. 80-88.
3. Бонь, Е. И. Морфофункциональные нарушения в гиппокампе крыс при субтотальной ишемии / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович, С. М. Зиматкин // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2018. – N 1. – С. 24-29.
4. Зиматкин, С. М. Темные нейроны мозга / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Морфология. – 2017. – № 6. – С.81-86.
5. Каркищенко, Н. Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева // М. : Профиль-2С, 2010. – 241 с.
6. Попова, Э. Н. Ультраструктура мозга, алкоголь и потомство: монография / Э. Н. Попова. – Москва. Изд. Научный мир, 2010. – 155 с.
7. Семченко, В. В. Постаноксическая энцефалопатия / В. В. Семченко, С. С. Степанов, Г. В. Алексеева. – Омск, 1999. – 448 с.
8. Уолкер А. Э. Смерть мозга / А. Э. Уолкер. – Москва : Медицина, 1988. – 198 с.
9. Ярыгин, Н. Е. Патологические и приспособительные изменения нейрона / Н. Е. Ярыгин, Н. Н. Ярыгин. – Москва «Медицина», 1973. – 190 с.
10. Bon, L. I. Effects of experemental cerebral ischemia on metabolic characteristics of parietal cortex neurons / L. I. Bon, N. Y. Maksimovich, S. M. Zimatkin // Bioprocess Engineering. – 2018. – N 2, Vol. 1. – P. 1-5.
11. Gallyas, F. Supravital microwave experiments support that the formation of "dark" neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system / F. Gallyas, J. Pal, P. ukovics // Brain Research. – 2009. – N 1270. – P. 152-156.
12. Paxinos, G. The Rat Brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Waton. – Academic Press, Australia, 1998. – 242 p.