

УДК 616.831–005.4

© Коллектив авторов, 2018

<https://doi.org/10.18499/2225-7357-2018-7-2-85-89>

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК НЕЙРО-ГЛИО-СОСУДИСТЫХ КОМПЛЕКСОВ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ, ГИППОКАМПА И МИНДАЛЕВИДНОГО ТЕЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС В РАННЕМ ПОСТИШЕМИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ

А. С. Степанов, В. А. Акулинин, Д. Б. Авдеев, А. В. Горбунова
ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Омск, Россия

Цель исследования – изучить функциональную и пролиферативную активности клеток сенсомоторной коры (СМК), гиппокампа и миндалевидного тела (МТ) головного мозга белых крыс в норме и после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий (без гипотонии).

Материал и методы. С помощью световой микроскопии и иммуногистохимии были изучены нейроны, астроциты, олигодендроглиоциты и микроглиоциты головного мозга в норме (n=5) и через 6 ч, 1, 3 сут (n=15) после острой ишемии. Использовались антитела к глиальному фибриллярному белку (GFAP) и Ki67 (производитель: Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

Результаты. После реперфузии, на фоне повреждения нейронов (отека-набухания, дистрофических и некробиотических изменений), активировались процессы пролиферации клеток нейроглии, усиливалась экспрессия GFAP (гипертрофия астроцитов), увеличивался нейроглиальный индекс, вокруг крупных нейронов СМК появлялось большое количество сателлитарных астроцитов. Через 3 сут в СМК содержание Ki67-позитивных клеток увеличивалось до 18,6% (95% ДИ: 13,5–24,7%) от всех глиоцитов, в гиппокампе и МТ – соответственно – до 7,5% (95% ДИ: 4,3–12,1%) и 10,7% (95% ДИ: 6,8–15,9%). Таким образом, между сравниваемыми отделами головного мозга были выявлены статистически значимые различия.

Заключение. В остром периоде после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий в СМК, гиппокампе и МТ усиливалась функциональная и пролиферативная активность астроцитов, олигодендроглиоцитов и микроглиоцитов, которые, вероятно, функционировали как единая интегрированная защитная и saniрующая клеточная система с выраженной региональной специфичностью.

Ключевые слова: крысы; острая ишемия; реперфузия; нейро-глио-сосудистый комплекс; ультраструктура; морфометрия.

© A. S. Stepanov, V. A. Akulinin, D. B. Avdeev, A. V. Gorbunova, 2018

Omsk State Medical University, Ministry of healthcare, Omsk, Russia

Functional and Proliferative Activity of Cells of Neuro-Glio-Vascular Complexes of Sensorimotor Cortex, Hippocampus and Amygdala of White Rats Brain During Early Postischemic Period

The aim of the study is to determine functional and proliferative activity of sensorimotor cortex (SMC), hippocampus and amygdala (AM) cells of the brain of white rats in normal and after 20-minute occlusion of the common carotid arteries (without hypotension).

Material and methods. Using light microscopy and immunohistochemistry were studied neurons, astrocytes, oligodendroglia and microglia brain normal (n=5) and after 6 h, 1, 3 days (n=15) after acute ischemia. Antibodies to glial fibrillar acid protein (GFAP) and Ki67 (manufacturer: Leica Biosystems Newcastle Ltd, UK) were used.

Results. After reperfusion, against the background of neuronal damage (swelling, dystrophic and necrobiotic changes), processes of neuroglia cell proliferation were activated, expression of GFAP (hypertrophy of astrocytes) increased, neuroglial index increased, a large number of satellite astrocytes appeared around large neurons of the SMC. After 3 days in the SMC the content of Ki67-positive cells increased to 18.6% (95% CI: 13.5–24.7%) of all gliocytes, in the hippocampus and AM – respectively – to 7.5% (95% CI: 4.3–12.1%) and 10.7% (95% CI: 6.8–15.9%). Thus, statistically significant differences were revealed between the compared parts of the brain.

Conclusion. In the acute period after a 20-minute occlusion of the common carotid arteries in the SMC, the hippocampus and the AM increased functional and proliferative activity of astrocytes, oligodendroglia and microglia, which functioned as a single integrated protective and insulating cellular system with a strong regional specificity.

Key words: rat; acute ischemia; reperfusion; neuro-glio-vascular complex; ultrastructure; morphometry.

Введение

Известно, что в реперфузионном периоде после острой ишемии в головном мозге запускается сложный комплекс механизмов повреждения, защиты и восстановления нервной ткани [3, 5]. При этом активируются аст-

роциты, олигодендроглиоциты и микроглиоциты, функционирующие как единая интегрированная saniрующая клеточная система с выраженной региональной специфичностью [1, 2].

Цель исследования – изучение функциональной и пролиферативной активности

клеток сенсомоторной коры, гиппокампа и миндалевидного комплекса головного мозга белых крыс после 20-минутной двусторонней окклюзии общих сонных артерий в раннем постишемическом периоде.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России. Данное исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ОмГМУ. В качестве экспериментальных животных использовали белых беспородных крыс (n=15, самцы) массой 180–200 г. Исследования проводили в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных.

На фоне премедикации (сульфатом атропина 0.1 мг/кг, подкожно) и общей анестезии (Zoletil 100, 10 мг/кг) моделировали острую 20-минутную ишемию мозга путем пережатия общих сонных артерий (2-сосудистая модель неполной глобальной ишемии без гипотонии). Взятие материала проводили через 6 ч, 1 и 3 сут после ишемии. Контролем (норма, n=5) служили животные без окклюзии артерий того же возраста. Головной мозг фиксировали путем перфузии смеси 1% раствора глутарового альдегида, 4% раствора параформа на 0.1 М фосфатном буфере (pH=7.4) и 5% раствора сахарозы через восходящую часть дуги аорты. Фронтальные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, тионином по Нисслю и с помощью иммуногистохимических методов. Использовались первичные антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) и Ki67 (производитель: Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Окраска осуществлялась согласно рекомендациям фирмы производителя реагентов. С помощью микроскопа Leica DM 1000 получали цифровые микрофотографии (по 200 полей зрения с каждого отдела). Морфометрический анализ проводили с помощью программы Image 1.46. Определяли общую численную плотность нейронов, относительное содержание реактивно и некробиотически измененных клеток, содержание Ki67-позитивных клеток и относительную площадь GFAP-позитивного материала. Проверку статистических гипотез осуществляли с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни, ANOVA (однофакторный дисперсионный анализ) Краскела–Уоллиса, Фридмана и критерия χ^2 (StatSoft Statistica 8.0). Результаты представлены как медиана (нижний, верхний квартили) и в процентах (95% доверительный интервал – 95% ДИ). В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Использованная модель острой 20-минутной ишемии приводила к диффузно-очаговым изменениям пространственной и структурной организации сенсомоторной коры (СМК), гиппокампа и миндалевидного тела (МТ). Через 6 ч, 1 и 3 сут в поле зрения встречались единичные клетки-тени, гиперхромные и нормохромные нейроны. В течение 3 сут содержание нормохромных нейронов (в сравнении с контролем) статистически значимо уменьшалось во всех изученных отделах мозга: в СМК – на 58.3% ($\chi^2=34.6$, $p < 0.001$), в СА₁ гиппокампа – на 54.4% ($\chi^2=23.8$, $p < 0.001$) и МТ – на 29.6% ($\chi^2=48.9$, $p < 0.001$). Значимые различия выявлены при сравнении МТ и СМК ($\chi^2=8.2$, $p=0.001$), МТ и гиппокампа ($\chi^2=7.0$; $p=0.001$). Содержание нормохромных нейронов в СМК и гиппокампе не различалось ($\chi^2=1.1$; $p=0.27$).

Таким образом, в остром периоде после ишемии 30–60% нейронов подвергались реактивным и некробиотическим изменениям. В результате общая численная плотность нейронов в СМК и гиппокампе, в сравнении с контролем, статистически значимо снижалась. Так, у контрольных животных в слое V СМК (на 1 мм² поля зрения) выявлялось 279.8 (246.2–291.5) нейронов, а через 3 сут после ишемии – 233.2 (214.6–267.8), $p < 0.01$. В области СА₁ гиппокампа было соответственно 2136.5 (1722.4–2357.5) и 1709.2 (1507.5–2062.3), $p < 0.01$. В МТ статистически значимых изменений общей численной плотности нейронов через 3 сут после ишемии выявить не удалось: контроль – 199.8 (167.3–216.5), а через 3 сут – 173.2 (152.5–208.2), $p > 0.05$ (критерий Манна–Уитни). Отмечалась динамика выявленных изменений в течение 3 сут (ANOVA Фридмана, $p < 0.05$), различия между отделами в контроле и по срокам исследования (ANOVA Краскела–Уоллиса, $p < 0.01$).

Изменения нейронов сопровождались реорганизацией нейроглии и увеличением нейроглиального индекса через 3 сут в 1.2–1.5 раза ($\chi^2 > 8.2$; $p < 0.01$). Так, общая площадь частиц GFAP-позитивного материала астроцитов в контроле на срезах СМК составляла 16.2% (95% ДИ: 11.4–22.1%), а через 3 сут после ишемии этот показатель в СМК увеличивалась до 52.2% (95% ДИ: 45.0–59.3%; $\chi^2=10.2$, $p < 0.001$). В гиппокампе – 8.1% (95% ДИ: 4.7–12.8%) и 16.2% (95% ДИ: 4.8–12.8%; $\chi^2=3.4$, $p=0.02$) соответственно. В МТ – 12.6% (95% ДИ: 8.3–18.0%) и 21.2% (95% ДИ: 16.6–28.6%; $\chi^2=3.2$, $p=0.03$) соответственно.

Гипертрофия зрелых астроцитов проявлялась увеличением диаметра, степени ветвления, длины их отростков (рис. 1б), а также активацией пролиферативных процессов в

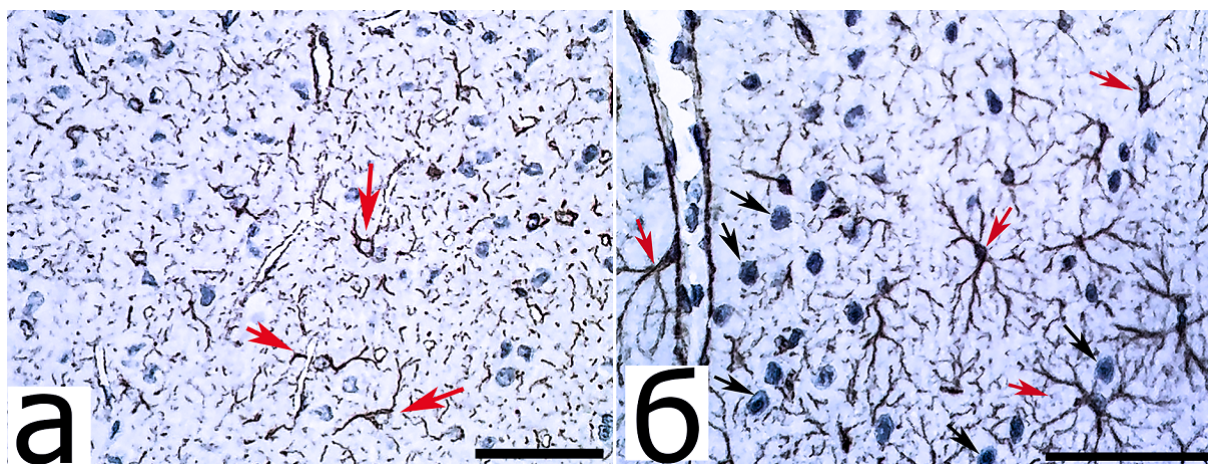


Рис. 1. Глиальные клетки (тела и отростки, коричневый цвет, отмечено красными стрелками) слоя III сенсомоторной коры головного мозга белой крысы в постинишемическом периоде (а – 6 ч, б – 3 сут): гипертрофия астроцитов через 3 сут реперфузии. Нейроны между глиальными клетками отмечены черными стрелками. Окраска: иммуногистохимия, моноклональные антитела к глиальному кислому фибриллярному белку (GFAP). Об. 40, шкала – 50 мкм.

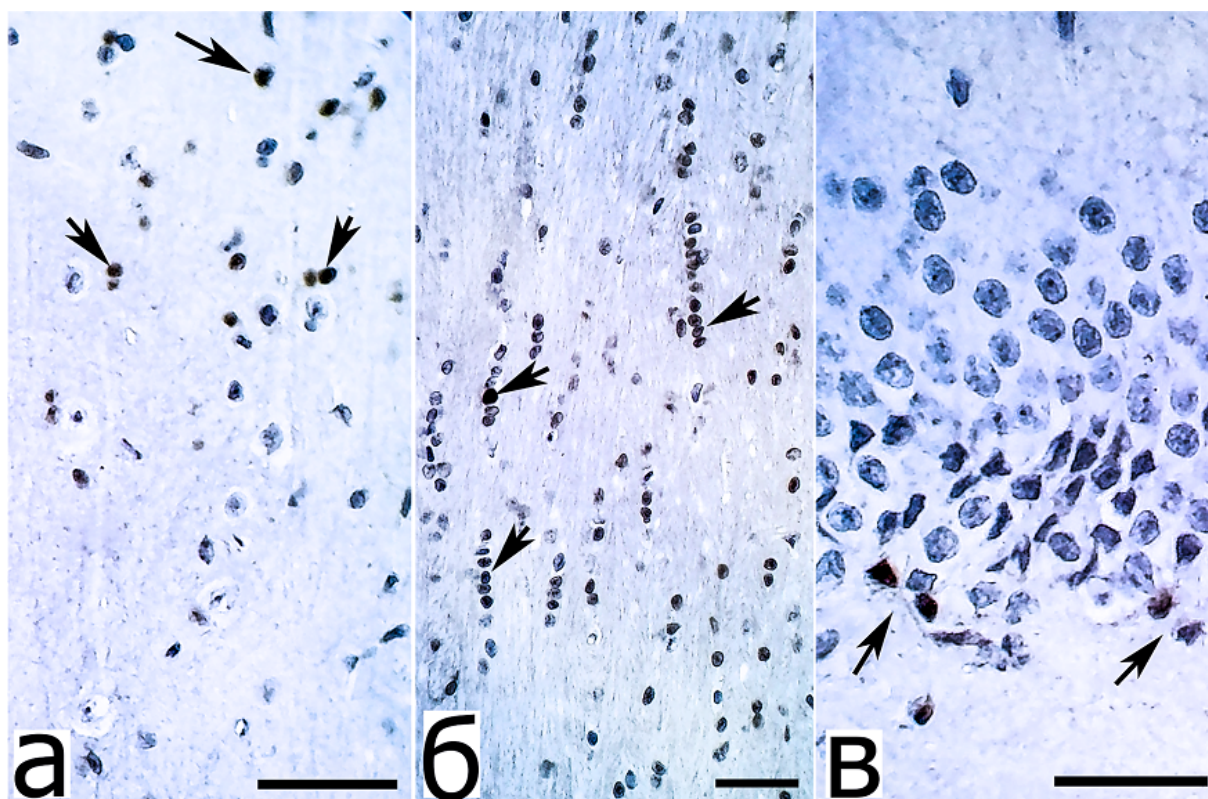


Рис. 2. Сенсомоторная кора (а), белое вещество (б) и зубчатая фасция (в) головного мозга белой крысы через 3 сут постинишемического периода: пролиферация астроцитов (а), олигодендроглиозитов (б) и нейронов (в); Ki67-позитивные ядра отмечены стрелками. Окраска: иммуногистохимия, антитела к Ki67. Об. 40, шкала – 50 мкм.

соседних клетках. Появлялось большое количество Ki-67-позитивных глиальных клеток (рис. 2а, б, в). В контроле отмечались единичные Ki-67-позитивные глиальные клетки.

С помощью иммуногистохимии были выявлены единичные клетки и конгломераты пролиферирующих глиоцитов с высокой плотностью в ядре меток к Ki67 (рис. 1б, 2а). Особенно это проявлялось в белом веществе головного мозга, и было характерно для олигодендроглиозитов. Эти клетки выявлялись в виде цепочек между нервными волокнами (рис. 2б).

В сером веществе СМК содержание пролиферирующих Ki67-позитивных клеток (астроцитов) с интенсивным окрашиванием ядра через 3 сут статистически значимо увеличивалось (по сравнению с контролем) до 18.6% (95% ДИ: 13.5–24.7%) от всех глиоцитов, а в гиппокампе и МТ – до 7.5% (95% ДИ: 4.3–12.1%) и 10.7% (95% ДИ: 6.8–15.9%) соответственно.

Через 6 ч и 1 сут после ишемии, на фоне отека-набухания нервной ткани, проявления гипертрофии (GFAP) и пролиферации (Ki67) астроцитов отмечены не были (рис. 1а).

Следует отметить, что в нейронах СМК, полей СА₁–СА₄ гиппокампа и МТ (в контроле и в течение 3 сут после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий) пролиферативные процессы не активировались – Ki67-позитивные ядра нейронов не выявлялись. Метка локализовалась только в ядрах глиальных клеток, очень редко – в перикитах. Однако в зубчатой фасции гиппокампа, среди зернистых нейронов, были найдены единичные меченные антителами к Ki67 ядра, по размерам соответствующие этим нейронам (рис. 2в).

Заключение

Настоящее исследование показало, что в остром периоде после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий в сенсомоторной коре, гиппокампе и миндалевидном теле усиливалась функциональная и пролиферативная активность астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов, которые, вероятно, функционировали как единая интегрированная защитная и санирующая клеточная система с выраженной региональной специфичностью. Активация и пролиферация глиальных клеток описаны ранее и на других моделях повреждения головного мозга [7, 4, 8]. Имеются работы, посвященные изучению гистоархитектоники нервной ткани и ультраструктуры клеток нейро-глио-сосудистого комплекса головного мозга белых крыс после острой ишемии [1, 2]. Однако, в сравнительном аспекте сенсомоторной коры, гиппокампа и миндалевидного тела с помощью иммуногистохимических методов не изучались, что затрудняло понимание особенностей защиты и восстановления этих отделов головного мозга в реперфузионном периоде [6].

Полученные нами данные убедительно показали схожие по сути, но гетероморфные по проявлениям структурные изменения в сенсомоторной коре, гиппокампе и миндалевидном теле в ответ на острую ишемию. Во всех изученных отделах, кроме гипертрофии, отмечалась активация процессов пролиферации глиальных клеток, а в зубчатой фасции, вероятно, – и мелких звездчатых нейронов. По данным литературы, в зубчатой фасции располагается нейрогенная ниша стволовых клеток, которая обладает специфическими факторами, необходимыми для деления предшественников нейронов, а также дифференцировки и интеграции новообразовавшихся нейронов. В этой зоне гиппокампа происходит активация образования незрелых клеток с последующей их миграцией в зону ишемической деструкции [6].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что функциональная и пролиферативная активность клеток нервной ткани в сенсомоторной коре, гиппокампе и миндале-

видном теле имели топографические особенности, зависели, вероятно, от клеточного состава и пространственной организации этих отделов мозга.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» №14 от 15.12.2017г. и внутреннего гранта ГБОУ ВО Омского государственного медицинского университета №574 от 24.11.2017 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Степанов А. С., Акулинин В. А., Степанов С. С. и др. Клеточные системы восстановления и утилизации поврежденных нейронов головного мозга белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2017; 103(10): 1135–1147.
2. Степанов А. С., Акулинин В. А., Мыцк А. В. и др. Нейро-глио-сосудистые комплексы головного мозга после острой ишемии. Общая реаниматология. 2017; 13(6): 6–17.
3. Baron J-C. Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease. J Cereb Blood Flow Metab. 2014; 34: 2–18.
4. Burda J. E., Sofroniew M. V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. Neuron. 2014; 81: 229–248.
5. Maurer L. L., Philbert M. A. The mechanisms of neurotoxicity and the selective vulnerability of nervous system sites. Handb Clin Neurol. 2015; 131: 61–70.
6. Ming G. L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. Neuro. 2011; 70(4): 687–702.
7. Saab A. S., Tzvetanova I. D., Nave K. A. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. Curr. Opin. Neurobiol. 2013; 23: 1065–72.
8. Zuchero J. B., Barres B. A. Glia in mammalian development and disease. Development. 2015; 142(22): 3805–09.

References

1. Stepanov A. S., Akulinin V. A., Stepanov S. S. et al. Kletochnye sistemy vosstanovleniya i utilizatsii povrezhdennykh neuronov golovnogogo mozga bel'lykh kry's posle 20-minutnoy okklyuzii obshchikh sonnykh arteriy [Cellular systems recovery and recycling of damaged neurons in the albino rats brain after acute global ischemia]. Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova. 2017; 103(10): 1135–47 (in Russian).
2. Stepanov A. S., Akulinin V. A., Mytsik A. V. et al. Neuro-glio-sosudistye kompleksy golovnogogo mozga posle ostroy ishemii [Neuro-glio-vascular complexes of the brain after acute ischemia]. Obshchaya reanimatologiya. 2017; 13(6): 6–17 (in Russian).
3. Baron J-C. Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease. J Cereb Blood

- Flow Metab. 2014; 34: 2-18.
4. Burda J. E., Sofroniew M. V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014; 81: 229-48.
 5. Maurer L. L., Philbert M. A. The mechanisms of neurotoxicity and the selective vulnerability of nervous system sites. *Handb Clin Neurol*. 2015; 131: 61-70.
 6. Ming G.L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuro*. 2011; 70(4): 687-702.
 7. Saab A. S., Tzvetanova I. D., Nave K. A. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2013; 23: 1065-72.
 8. Zuchero J. B., Barres B. A. Glia in mammalian development and disease. *Development*. 2015; 142(22): 3805-09.

Сведения об авторах

Степанов Александр Сергеевич – аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России. 644043, г. Омск, ул. Ленина, 12. E-mail: ctepan55@yandex.ru

Акулинин Виктор Александрович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России. 644043, г. Омск, ул. Ленина, 12. E-mail: akulinin@omsk-osma.ru

Авдеев Дмитрий Борисович – канд. ветеринар. наук, доцент кафедры безопасности жизнедеятельности, медицины катастроф ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России. 644043, г. Омск, ул. Ленина, 12. E-mail: avdeev86@inbox.ru

Горбунова Анна Владимировна – ординатор кафедры онкологии, лучевой терапии ДПО ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России. 644043, г. Омск, ул. Ленина, 12. E-mail: double_energy@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2018 г.

Для цитирования: Степанов А.С., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Горбунова А.В. Функциональная и пролиферативная активность клеток нейро-глио-сосудистых комплексов сенсомоторной коры, гиппокампа и миндалевидного тела. Журнал анатомии и гистопатологии. 2018; 7(2): 85–89. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-2-85-89

For citation: Stepanov A.S., Akulinin V.A., Avdeev D.B., Gorbunova A.V. Functional and proliferative activity of cells of neuro-glio-vascular complexes of sensorimotor cortex, hippocampus and amygdala of white rats brain during early postischemic period. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2018; 7(2): 85–89. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-2-85-89