

УДК 611.813.11:611.831:611.133—036.12—005:611.08

**РЕАКЦИЯ НЕЙРОГЛИИ В ЛОБНОМ ОТДЕЛЕ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ И ГОЛОВКЕ
ХВОСТАТОГО ЯДРА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПЕРЕЖАТИИ ЛЕВОЙ ОБЩЕЙ СОННОЙ
АРТЕРИИ**

Т.Г.Данилова, Г.В.Шумихина

**THE REACTION OF THE NEUROGLIA IN THE RAT'S FRONTAL LOBES OF THE CEREBRAL CORTEX
AND THE HEAD OF CAUDATE NUCLEUS UNDER CHRONIC LIGATION OF THE LEFT COMMON
CAROTID ARTERY**

T.G.Danilova, G.V.Shumihina

Ижевская государственная медицинская академия, dani_lova_tatyana@inbox.ru

Изучены изменения глиии в лобном отделе коры и головке хвостатого ядра головного мозга крыс после перевязки левой общей сонной артерии на третьи, четырнадцатые, тридцатые сутки.

Ключевые слова: лобная кора головного мозга, хвостатое ядро, пережатие левой общей сонной артерии, иммуногистохимия, глиальный фибриллярный белок

The article refers to the changes of neuroglia in the rat's frontal lobes and the head of caudate nucleus of the cerebral cortex after the ligation of the left common carotid artery on the third, fourteenth, and thirtieth days.

Keywords: frontal lobes of the cerebral cortex, caudate nucleus, ligation of the left common carotid artery, immunohistochemistry, glial fibrillar protein

Глиальные клетки создают необходимое для функционирования нейронов микроокружение. В настоящее время признается огромная роль этих клеток (особенно астроцитов) в обменных процессах, происходящих в центральной нервной системе [1]. Поэтому исследование изменений в глиоцитах при разных патологических состояниях является важным для более глубокого их понимания.

Целью исследования явилось сравнительное изучение реакций нейроглии хвостатого ядра и лоб-

ной коры больших полушарий крыс на хроническое нарушение кровоснабжения.

Материалы и методы. Исследование проведено на 71 белой крысе, в возрасте 8—9 месяцев средней массой 250—300 г, одной породы и пола (самцы). Животные содержались в стандартных условиях вивария. Локализацию исследуемых областей мозга у крыс определяли согласно рекомендациям [2]. Исследуемой структурой для детального количественного анализа являлись фронтальные срезы коры

лобного отдела коры больших полушарий на уровне FR^P и головки хвостатого ядра крыс. Данные отделы головного мозга находятся в близких условиях гемодинамики и функционально взаимосвязаны, поэтому сравнение изменений, происходящих в них при нарушении кровотока, является важной и необходимой задачей.

При проведении эксперимента соблюдались «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», национальные стандарты Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в хорошо вентилируемом помещении с достаточной освещенностью, хорошим отоплением, с регулярной уборкой. Крысы имели свободный доступ к пище и воде.

Эксперимент проводился с использованием тиопенталового наркоза. Животным I группы (контрольной) производилось оперативное вмешательство с выполнением воротничкообразного разреза на шее. Животным II группы, кроме этого, накладывалась лигатура на левую общую сонную артерию (на уровне щитовидного хряща гортани, ниже её разделения на наружную и внутреннюю сонные артерии). Выведение животных из эксперимента осуществлялось через трое, четырнадцать, тридцать суток. Данная методика неполной ишемии головного мозга умеренной тяжести применялась в ряде работ для создания ишемии фронтальных отделов головного мозга [3, 4].

Для выявления структурных изменений производили окрашивание по Нисслю и импрегнацию серебром по методу Гольджи в модификации Бюбенета. Но эти методики не могут дать полного представления об изменениях, происходящих в головном мозге, особенно при изучении влияния относительно слабого воздействия, как в данном случае, так как первая не окрашивает тел астроцитов, а вторая выявляет не более 5% клеток нервной ткани. Поэтому нами использовался и более чувствительный иммуногистохимический метод — исследование экспрессии клетками нервной ткани глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) непрямым пероксидазным методом на парафиновых срезах. Данный белок является маркером астроцитов. Применялся стандартный протокол, в соответствии с инструкцией к каждому из антител. Весь морфометрический анализ проведен на препаратах левого полушария выживших животных. Так как для изучения динамики изменения содержания глиального фибриллярного кислого белка вычислялось количество нейроглиальных клеток, приходящихся на один нейрон (нейро-глиальное отношение), срезы докрашивались толуидиновым синим для визуализации нейронов. Нейро-глиальное отношение определялось в пирамидных нейронах пирамидного и ганглионарного слоев и в нейронах головки хвостатого ядра.

Статистическую обработку полученных количественных данных проводили в соответствии с общепринятыми методами [5-7]. Они включали расчет среднего значения, ошибки средней и среднеквадратического отклонения. Поскольку распределение числовых значений в однородных группах носило нор-

мальный характер, для сравнения средних значений был использован параметрический метод статистики — *t*-критерий Стьюдента. Во всех процедурах статистического анализа принимался уровень значимости $p \leq 0,05$. Расчет проводили с привлечением программы “Microsoft Office Excel 2007”. Все результаты представлены $M \pm m$, где M — среднее значение, m — ошибка среднего.

Результаты исследования и их обсуждение.

В I группе все прооперированные животные выжили. Во II группе общая летальность составила 26,8%, причем гибель животных чаще всего происходила в первые трое суток после проведения оперативного вмешательства. Можно предположить, что причиной гибели животных являлось развитие острого нарушения мозгового кровообращения тяжелой степени, вследствие недостаточного уровня коллатерального кровотока, что объясняется индивидуальными особенностями кровоснабжения головного мозга у каждой конкретной особи.

На препаратах лобного отдела коры больших полушарий и головки хвостатого ядра крыс контрольной группы глия была представлена преимущественно протоплазматическими астроцитами, с овальными либо округлыми ядрами, содержащими крупные глыбки гетерохроматина, и слабо развитым ядрышковым аппаратом. Более темно окрашенные ядра округлой формы и меньших размеров относились к олигодендроглиоглиомам. Ядра астроцитов были распределены равномерно в пределах изучаемых отделов. Нейро-глиальное отношение составило: в пирамидном слое коры от $0,93 \pm 0,02$ до $0,98 \pm 0,02$; в ганглионарном слое от $0,94 \pm 0,02$ до $0,99 \pm 0,02$; в хвостатом ядре от $0,80 \pm 0,05$ до $0,84 \pm 0,05$.

В группе крыс с пережатием левой общей сонной артерии до вывода животных из эксперимента (II группа) через трое суток при изучении распределения нейроглии в лобной коре и в головке хвостатого ядра отмечена неравномерность расположения глиоцитов. Нередко глиальные клетки образовывали скопления, как вокруг нейронов, так и в нейроне. При подсчете соотношения количества нейронов и глии выявлена тенденция к достоверному по сравнению с контролем увеличению нейро-глиального отношения до $1,35 \pm 0,01$ ($p < 0,001$) в пирамидном, до $1,30 \pm 0,01$ ($p < 0,001$) в ганглионарном слоях. В хвостатом ядре нейро-глиальное отношение имело тенденцию к повышению до $0,93 \pm 0,07$ (в контроле $0,81 \pm 0,04$).

У крыс с пережатием левой общей сонной артерии до вывода животных из эксперимента (II группа) на четырнадцатые сутки сохранялась тенденция группового распределения глиоцитов. Ядра астроцитов были набухшими. Выявлялись скопления реактивных глиоцитов. На данном сроке нередко наблюдаются проявления нейронафагии. Нейро-глиальное отношение достоверно увеличивалось по сравнению с группой контроля в пирамидном слое до $1,38 \pm 0,01$ ($p < 0,001$), в ганглионарном слое — до $1,34 \pm 0,01$ ($p < 0,001$); в хвостатом ядре до $1,25 \pm 0,02$ ($p < 0,001$). По сравнению со II группой предшествующего срока, происходило достоверное увеличение нейро-глиального отношения в пирамидном слое ($p < 0,05$).

Через тридцать суток в группе крыс с пережатием левой общей сонной артерии до вывода животных из эксперимента (II группа) особенности распределения астроцитов были схожи с предыдущим сроком исследования. Выявляется полиморфизм распределения ядер глиоцитов в пределах каждого из слоев. Можно обнаружить скопления глиальных клеток в непосредственной близости от нейронов, так и в зонах с «выпадением» нейронов. Астроциты гипертрофированы, с крупными светлыми ядрами и четко контурирующимися ядрышками. Нейроглиальный показатель достоверно повышался во всех слоях по сравнению с контролем и составлял в пирамидном слое $1,90 \pm 0,05$ (в контроле $0,95 \pm 0,02$, $p < 0,001$), в ганглионарном слое $1,80 \pm 0,05$ (в контроле $0,96 \pm 0,02$, $p < 0,001$); в хвостом ядре $1,1 \pm 0,04$ (в контроле $0,82 \pm 0,04$, $p < 0,001$). По сравнению с группой предыдущего срока происходило достоверное увеличение нейро-глиального отношения: в пирамидном ($p < 0,001$) и ганглионарном ($p < 0,01$) слоях, в хвостом ядре ($p < 0,001$).

Импregnация по Гольджи—Бюбенету лобной коры крыс контрольной группы выявляла равномерное распределение отростков астроцитов вокруг тела клетки с минимальной распространенностью от $32,9 \pm 1,3$ до $33,5 \pm 1,0$ мкм в пирамидном слое, от $33,7 \pm 1,3$ до $33,8 \pm 1,0$ мкм в ганглионарном слое, от $39,2 \pm 2,5$ до $40,5 \pm 2,4$ мкм в хвостом ядре; и с максимальной их распространенностью от $60,5 \pm 1,0$ до $61,8 \pm 0,9$ мкм в пирамидном слое; от $71,5 \pm 1,3$ до $72,6 \pm 1,5$ мкм в ганглионарном слое; от $82,9 \pm 2,5$ до $84,2 \pm 2,6$ мкм в хвостом ядре.

В лобной коре крыс с пережатием левой общей сонной артерии до вывода животных из эксперимента (II группа) через трое суток после пережатия левой общей сонной артерии минимальная распространенность отростков астроцитов достоверно увеличивалась в пирамидном слое до $47,4 \pm 0,1$ мкм (в контроле $32,9 \pm 1,0$ мкм, $p < 0,001$), в ганглионарном слое до $48,5 \pm 0,4$ мкм (в контроле $33,7 \pm 1,3$ мкм, $p < 0,001$); в хвостом ядре до $56,8 \pm 2,4$ мкм (в контроле $82,9 \pm 2,5$ мкм, $p < 0,001$). Максимальная распространенность отростков астроцитов достоверно увеличивалась в хвостом ядре $99,3 \pm 5,3$ мкм ($p < 0,001$). В пирамидном слое данный показатель составил $61,2 \pm 0,4$ мкм (в контроле $60,5 \pm 1,0$ мкм); в ганглионарном слое $71,1 \pm 1,0$ мкм (в контроле $71,5 \pm 1,3$ мкм), т.е. в этих слоях достоверной разницы между контрольной и экспериментальной группами не было найдено.

Через четырнадцать суток после пережатия левой общей сонной артерии в лобной коре крыс с пережатием левой ОСА до вывода животных из эксперимента (II группа) имела место тенденция к групповому распределению глиоцитов. Астроциты были гипертрофированы: максимальная распространенность их отростков увеличивалась в пирамидном слое до $65,8 \pm 0,2$ мкм (в контроле $61,0 \pm 0,9$ мкм, $p < 0,001$), в ганглионарном слое до $174,4 \pm 1,3$ мкм (в контроле $72,2 \pm 1,5$ мкм, $p < 0,001$); минимальная их протяженность в пирамидном слое составляла $40,8 \pm 0,2$ мкм (в контроле $33,1 \pm 0,9$ мкм, $p < 0,001$), в ганглионарном слое — $88,5 \pm 0,6$ мкм (в контроле $33,8 \pm 1,0$ мкм, $p <$

$0,001$). В хвостом ядре максимальная протяженность увеличивалась до $107,3 \pm 5,9$ мкм (в контроле $84,2 \pm 2,6$ мкм, $p < 0,001$); минимальная — до $61,7 \pm 3,0$ мкм (в контроле $40,5 \pm 2,4$ мкм, $p < 0,001$). По сравнению с группой предыдущего срока наблюдалось достоверное увеличение максимальной и минимальной распространенности отростков астроцитов ($p < 0,001$) в пирамидном и ганглионарном слоях ($p < 0,001$).

Через тридцать суток в группе крыс с пережатием левой общей сонной артерии до вывода животных из эксперимента (II группа) распространенность отростков астроцитов достоверно увеличивалась по сравнению с контролем: максимальная их протяженность в пирамидном слое составляла $172,3 \pm 0,8$ мкм (в контроле $61,8 \pm 0,9$ мкм, $p < 0,001$), в ганглионарном слое — $174,7 \pm 1,2$ мкм (в контроле $72,6 \pm 1,5$ мкм, $p < 0,001$); минимальная протяженность в пирамидном слое увеличивалась до $116,2 \pm 3,4$ мкм (в контроле $33,5 \pm 1,0$ мкм, $p < 0,001$), в ганглионарном слое до $141,6 \pm 0,9$ мкм (в контроле $33,7 \pm 1,0$ мкм, $p < 0,001$). В хвостом ядре максимальная протяженность отростков астроцитов увеличивалась до $110,4 \pm 4,2$ мкм (в контроле $83,6 \pm 2,7$ мкм, $p < 0,001$); минимальная — до $63,1 \pm 3,0$ мкм (в контроле $39,4 \pm 2,5$ мкм, $p < 0,001$). По сравнению с группой крыс с пережатием левой ОСА до вывода животных из эксперимента (II группа) предшествующего срока наблюдалось достоверное увеличение максимальной и минимальной распространенности отростков астроцитов в пирамидном и ганглионарном слоях ($p < 0,001$).

При проведении иммуногистохимического исследования установлено, что в контрольной группе глиальный фибриллярный кислый белок умеренно экспрессировался в телах и отростках астроцитов. При этом характер расположения менее интенсивно окрашенных волокон соответствовал характеру ветвления отростков протоплазматических астроцитов, выявляемому при импregnации по Гольджи. Волокнистые астроциты отличались высокой экспрессией GFAP, поэтому выявляемость данного белка в лобном отделе была выше во внутренних слоях коры головного мозга, ближе к белому веществу. Данные закономерности сохранялись на протяжении всего изучаемого временного периода. В хвостом ядре контрольной группы глия была представлена преимущественно протоплазматическими астроцитами, но встречались и волокнистые астроциты, особенно в местах скопления нервных волокон. При визуальном сравнении микропрепаратов контрольных групп животных, выведенных из эксперимента в разные сроки, отличия в интенсивности и количестве окрашенных астроцитов не обнаружено. Белок выявлялся не во всех клетках — вокруг докрашенных толуидиновым синим ядер астроцитов зачастую регистрировалась зона, в которой методика его не выявляла. GFAP-позитивные астроциты распределялись в пределах изучаемых областей равномерно. Нейроглиальное отношение составляло в пирамидном слое от $0,97 \pm 0,02$ до $1,00 \pm 0,02$; в ганглионарном слое от $0,96 \pm 0,02$ до $1,00 \pm 0,02$; в хвостом ядре от $0,83 \pm 0,03$ до $0,86 \pm 0,02$.

На третьи сутки у крыс экспериментальной группы по сравнению с группой контроля было за-

метно увеличение выявляемости глиального фибриллярного кислого белка. Преимущественно увеличивалась экспрессия GFAP в ганглионарном (нейро-глиальное отношение составило $1,33 \pm 0,01$, в контроле $0,96 \pm 0,02$, $p < 0,001$) и пирамидном слоях (нейро-глиальное отношение составило $1,34 \pm 0,01$, в контроле $0,97 \pm 0,02$, $p < 0,001$). В хвостом ядре нейро-глиальное отношение увеличивалось до $1,28 \pm 0,02$ (в контроле $0,83 \pm 0,03$, $p < 0,001$). При выявлении GFAP-позитивных клеток, у животных регистрировалась направленность изменений, согласующаяся с результатами, полученными при анализе глии с помощью методик Ниссля и Гольджи—Бюбенета. Астроциты располагались группами вокруг тел нейронов и около сосудов. Наблюдалась высокая экспрессия белка как в телах, так и в отростках астроцитов.

К четырнадцатым суткам после пережатия левой общей сонной артерии регистрировалось общее повышение выявляемости глиального фибриллярного кислого белка, что на препаратах проявилось более высокой плотностью окраски и большим количеством GFAP-позитивных астроцитов. По сравнению с предыдущим сроком наблюдалось выраженное повышение его экспрессии в молекулярном слое, менее выраженное — в пирамидном слое (нейро-глиальное отношение составило $1,52 \pm 0,05$, в контроле $1,00 \pm 0,02$, $p < 0,001$). В этих отделах распределение GFAP носило относительно равномерный характер. В наружном зернистом слое и ганглионарном (нейро-глиальное отношение составило $1,48 \pm 0,03$, в контроле $0,98 \pm 0,02$, $p < 0,001$) выявляемость GFAP-позитивных астроцитов также значительно увеличивалась, их расположение было неравномерным, с образованием крупных групп. В хвостом ядре распределение GFAP также носило неравномерный характер, с участками глиоза. Нейро-глиальное отношение увеличивалось до $1,53 \pm 0,03$ (в контроле $0,85 \pm 0,03$, $p < 0,001$).

При сравнении с экспериментальной группой крыс предыдущего срока, наблюдалось достоверное повышение нейро-глиального отношения в пирамидном слое лобной коры и в хвостом ядре ($p < 0,001$).

Через тридцать суток после пережатия левой общей сонной артерии сохранялась тенденция к повышению уровня глиального фибриллярного кислого белка. Белок располагался в виде четко прослеживающихся радиальных тяжей вокруг ядер астроглии. Наблюдалась неравномерность распределения GFAP в коре. В ганглионарном слое (нейро-глиальное отношение составило $1,70 \pm 0,04$, в контроле $1,00 \pm 0,02$, $p < 0,001$) были видны крупные очаги скопления астроцитов. По сравнению с группой предшествующего срока они были больше, с максимально близким прилеганием их друг к другу, чаще располагались в области «выпадения» нейронов. При сравнении с группой крыс с пережатием левой общей сонной артерии до вывода животных из эксперимента (II группа) предыдущего срока, наблюдалось достоверное повышение нейро-глиального отношения в ганглионарном

слое ($p < 0,001$). В пирамидном слое нейро-глиальное отношение составило $1,60 \pm 0,05$, в контроле $0,99 \pm 0,03$. В хвостом ядре сохранялась тенденция к повышению уровня глиального фибриллярного кислого белка по сравнению с контролем. Нейро-глиальное отношение составляло $1,46 \pm 0,02$ (в контроле $0,86 \pm 0,02$, $p < 0,001$). Но по сравнению с четырнадцатыми сутками уровень глиального фибриллярного кислого белка был ниже, хотя эта разница была недостоверной.

Таким образом, на протяжении исследованного периода наблюдается тенденция к увеличению количества глиоцитов особенно — астроцитов (с их гипертрофией). Это проявляется в увеличении нейро-глиального отношения и протяженности отростков астроцитов особенно в поздние сроки эксперимента. Характер уровня экспрессии GFAP подтверждает структурные изменения астроцитов, выявляемые другими использованными методиками и свидетельствует о хороших адаптивных способностях нервной ткани при хронических дисциркуляторных расстройствах.

1. Васильев Ю.Г., Берестов Д.С. Гомеостаз и пластичность мозга. Ижевск: ФГБОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2011. 215 с.
2. Светухина В.М. Цитоархитектоника новой коры мозга в отряде грызунов (белая крыса) // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. Л., 1962. Т. XLII. № 2. С. 31–44.
3. Боголепов Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии. М., 1979. 168 с.
4. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М.: Медицина, 1989. 359 с.
5. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
6. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
7. Молчанова Л.Ф. и др. Статистическая оценка достоверности результатов научных исследований: Учеб. пособие. Ижевск, 2004. 96 с.

References

1. Vasil'ev Yu.G., Berestov D.S. Gomeostaz i plastichnost' mozga [Homeostasis and brain plasticity]. Izhevsk, 2011. 215 p.
2. Svetukhina V.M. Tsitoarkhitektonika novoy kory mozga v otryade gryzunov (belaya krysa) [Cytoarchitectonics of the neocortex of the brain in rodents (white rat)]. Arkhiv anatomii, gistologii embriologii, 1962, vol. XLII, no. 2, pp. 31–44.
3. Bogolepov N.N. Ul'trastruktura mozga pri gipoksii [The ultrastructure of the brain during hypoxia]. Moscow, 1979. 168 p.
4. Bilenko M.V. Ishemicheskie i reperfuzionnye povrezhdeniya organov [Ischemic and reperfusion organ damages]. Moscow, Meditsina Publ., 1989. 359 p.
5. Avtandilov G.G. Meditsinskaya morfometriya: Rukovodstvo [Medical morphometry: Manual]. Moscow, Meditsina Publ., 1990. 384 p.
6. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika [Biomedical statistics]. Moscow, Praktika Publ., 1998. 459 p.
7. Molchanova L.F. et al. Statisticheskaya otsenka dostovernosti rezul'tatov nauchnykh issledovaniy: Ucheb. Posobie [Statistical evaluation of the reliability of the results of researches: a tutorial]. Izhevsk, 2004. 96 p.