

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ДВУХ-, ЧЕТЫРЁХСОСУДИСТОЙ МОДЕЛЯХ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС И ИХ КОРРЕКЦИЯ ТАДАЛАФИЛОМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Мартынова О.В., Тверской А.В., Покровский М.В., Мартынов М.А., Шкилева И.Ю., Шелякина Е.В., Анциферов О.В., Мухина Т.С.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), Белгород, e-mail: m.olga91@mail.ru

Ишемический инсульт или инфаркт мозга является основной патологией среди тяжелых форм сосудистых поражений мозга. В России данная патология занимает первое место как причина потери трудоспособности, а второе место - в структуре общей смертности. Несмотря на многолетнюю историю исследования проблемы цереброваскулярной недостаточности, нельзя уверенно сказать, что ишемический инсульт успешно лечится. На данный момент рост числа этой патологии среди трудоспособного населения России является одним из самых острых вопросов отечественного здравоохранения. Нейроны коры лобных полушарий и гиппокампа головного мозга являются наиболее чувствительными структурами к гипоксическим и ишемическим повреждениям. Целью данного исследования было изучение структурных изменений нейронов при двух- и четырёхсосудистой модели ишемии головного мозга крыс при их коррекции тадалафилом, с использованием методов компьютерной морфометрии. Моделирование ишемии головного мозга крысам осуществляли с помощью: временного лигирования общих сонных артерий; коагулирования вертебральных артерий и, далее, лигирования общих сонных артерий. Время ишемического периода составляло 4 минуты, с последующей реперфузией. Группе крыс с коррекцией тадалафилом (1 мг/кг, в/б) моделировали четырёхсосудистую патологию. Адекватность правильно выполненной модели оценивали с помощью электроэнцефалографии. Морфологическое исследование производили через 72 часа после выполнения эксперимента. После получения цифрового изображения с помощью полуавтоматического сканера микропрепаратов оценивали минимальный и максимальный диаметр нейронов и их ядер, площадь и периметр перикариона, диаметр ядра, количество двуядрышковых нейронов, ядерно-цитоплазматическое соотношение, а также плотность расположения нейронов на единицу площади. Под влиянием ишемии как в коре лобной доли, так и в гиппокампе были выявлены выраженные цитоплазматические и ядерные повреждения нейронов, снижение их количества, гиперхромия, периваскулярный и перичеселлюлярный отёк, полнокровие и паретическое расширение капилляров. В группе крыс с предварительным введением препарата последствия ишемии были менее выражены. Достоверно отличались минимальный диаметр, периметр и площадь нейронов, диаметр, периметр и площадь ядер ($p < 0.05$). Количество двуядрышковых нейронов достоверно больше при коррекции тадалафилом ($p < 0.05$), что отражает функциональное состояние нейронов, их большую активность и способность к регенеративным и репаративным процессам. Достоверных отличий не обнаружено при измерении максимального диаметра ядер нейронов ($p > 0.05$).

Ключевые слова: ишемия головного мозга, лобная доля, гиппокамп, морфометрия, тадалафил.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN RAT NEURONAL RAT BRAIN FOR TWO-, AND FOUR VASCULAR ISCHEMIC MODELS AND THEIR CORRECTION THEIR CORRECTION IN EXPERIMENTAL TADALAFIL

Martinova O.V.¹, Tverskoi A.V.¹, Pokrovskiy M.V.¹, Martinov M.A.¹, Skileva I.Y.¹, Sheliakina E.V.¹, Anciferov O.V.¹, Mukhina T.S.¹

¹Federal state autonomous educational institution of higher education "Belgorod State National Research University" (NIU "BSU"), Belgorod, e-mail: m.olga91@mail.ru

Ischemic stroke or cerebral infarction is the primary pathology including severe vascular brain lesions. In Russia, this pathology has been ranked as a cause of disability, and the second place in the structure of total mortality. Despite the long history of research cerebrovascular insufficiency problem can not be said with certainty that ischemic stroke can be treated successfully. At the moment, the growth of this disease among the working population of Russia is one of the most pressing issues of national health care. The neurons of the cortex of the frontal hemispheres of the brain and the hippocampus are the most sensitive structures in hypoxic and

ischemic damage. The purpose of this study was to investigate the structural changes in the neurons and chetyrëhsosudistoy two models of cerebral ischemia in rats when tadalafil correction using computer morphometry methods. Modelling of cerebral ischemia in rats was carried out by: a temporary ligation of the common carotid artery; coagulation of the vertebral arteries, and further ligation of the common carotid artery. Time ischemic period was 4 minutes, followed by reperfusion. Group correction tadalafil rats (1 mg / kg, i / p) four vascular ischemic models pathology. The adequacy of the model has been correctly assessed using electroencephalography. Morphological examination was performed 72 hours after the experiment. Upon receipt of the minimum and maximum diameter of the neurons and their nuclei, area and perimeter perikaryon, core diameter, number dvuyadryshkovykh neurons nucleocytoplasmic ratio, and the density of neurons per unit area of a digital image using a semi-automatic scanner micropreparations evaluated. Under the influence of ischemia in the cortex of the frontal lobe and the hippocampus, were identified expressed cytoplasmic and nuclear neuronal damage, reducing their number hyperchromia, pericellular and perivascular edema, and hyperemia pareticheski dilation of capillaries. In the group of rats with the drug prior administration ischemia consequences were less pronounced.

Keywords: cerebral ischemia, the frontal lobe, the hippocampus, morphometry, tadalafil.

Нарушения мозгового кровообращения различной этиологии являются одной из наиболее значимых нозологий и занимают второе место в структуре общей смертности. Разработка способов профилактики и лечения до настоящего времени является одной из актуальных проблем как клинической фармакологии, так и неврологии. Поиск и использование большого количества экспериментальных моделей ишемии головного мозга обусловлено различными вариантами нарушения мозгового кровообращения. Чтобы смоделировать в эксперименте тотальную ишемию головного мозга, используют четырёхсосудистую модель ишемии головного мозга. В этой модели создается окклюзия двух позвоночных и двух общих сонных артерий. Данный вариант патологии является одним из наиболее сложно выполнимых в техническом плане и позволяет получить тотальную ишемию мозга более чем у 90% животных [1; 10]. Оценку последствий ишемии головного мозга можно провести с помощью морфометрического изучения его срезов. Нейроны лобной доли, мозжечка и гиппокампа являются наиболее чувствительными к гипоксии и ишемии. Гиппокамп обеспечивает реализацию механизмов памяти, поведенческих реакций, выполняет функцию фиксации эмоционально значимых событий [2; 3; 5]. Функциональные, биохимические и морфологические признаки ишемии и повреждения нейронов фиксируются уже после 2-минутной ишемии [7; 9].

Цель исследования: провести морфометрическое исследование нейронов коры лобной доли головного мозга и СА1 области гиппокампа крыс при моделировании тотальной ишемии ГМ (головного мозга) и при коррекции тадалафилом.

Материал и методы исследования. Исследование выполнено на 40 половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 230-260 г. Экспериментальные животные были разделены на 4 группы: 1) контрольную (n=10), 2) группу с двухсосудистой патологией (n=10), 3) группу с четырехсосудистой патологией (n=10), 4) группу с патологией и коррекцией тадалафилом (1 мг/кг, в/б), (n=10). Животные содержались в стандартных условиях вивария НИУ «БелГУ» со свободным доступом к еде и воде. Содержание

животных и постановка эксперимента проводилась в соответствии с требованием приказов № 1179 МЗ СССР от 11.10.1983 г. и № 267 РФ от 19.06.2003 г., а также по международным правилам Guide for the Care and of Laboratory Animals.

Животным 2-й группы моделировали двухсосудистую локальную ишемию: на 4 минуты перекрывали кровоток в общих сонных артериях. Крысам 3-й группы была смоделирована тотальная четырехсосудистая ишемия головного мозга с ишемическим периодом 4 минуты [8]. Животным 4-й группы за 60 минут до моделирования тотальной ишемии внутривенно вводили ингибитор фосфодиэстеразы-5, тадалафил, в дозе 1 мг/кг.

Наркотизацию животных проводили препаратом «Золетил 100», 60 мг/мл, и хлоралгидратом, 150 мг/мл. Животных выводили из эксперимента через 72 часа с момента его начала путем передозировки наркотических препаратов.

Головной мозг извлекали из полости черепа, разрезали на 3 фрагмента и фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина в течение 2-3 суток. Для получения гистологических препаратов кусочки мозга заливали в парафин по стандартной методике, после чего изготавливали серийные срезы толщиной 4 мкм на сертифицированном ротационном микротоме Leica (Германия). Для гистологического и морфометрического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином в автомате для окраски гистологических срезов и мазков (Autostainer XL ST5010; Leica, Германия), а также тионином по методике Ниссля. Морфометрию выполняли после микроскопического исследования с помощью микроскопа «Leica DM 4000 B» и создания цифрового изображения на полуавтоматическом сканере Mirax Desk (Carl Zeiss Micrimaging GmbH, Германия). Для этого использовали программу «Pannoramic Viewer 1.15». Производили подсчёт неизмененных и гиперхромных нейронов пирамидного и полиморфного слоев CA1 области гиппокампа и нейронов лобной доли, измеряли больший и меньший диаметры перикарионов, их периметр и площадь, диаметр ядер и ядрышек, определяли относительное количество нейронов в нескольких полях зрения с последующим пересчетом на 0,01 мм². У каждого животного производили 30 измерений каждого планиметрического и количественного показателя с занесением данных в таблицу MS Excel и Statistica 10.0. Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения были подсчитаны среднее значение (M) и стандартная ошибка среднего (m). В случаях ненормального распределения были рассчитаны медиана (Me) и квартильный размах (QR). Межгрупповые различия анализировались параметрическими (t-критерий Стьюдента) или непараметрическими (критерий Манна-Уитни) методами в

зависимости от типа распределения. Различия были определены при 0,05 уровня значимости. Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения Statistica 10.0.

Результаты исследования

При обзорной микроскопии у интактных животных полученные нами результаты соответствовали описаниям цитоархитектонических особенностей лобной доли и гиппокампа [4; 6]. Нейроны были преимущественно пирамидной, округлой или многоугольной формы, с крупными округлыми ядрами и мелкозернистой цитоплазмой. У многих нейронов базофильная субстанция цитоплазмы имела вид крупных глыбок, расположенных периферически. В некоторых нейронах чётко определялись одно или два центрально расположенных ядрышка (рис. 1).

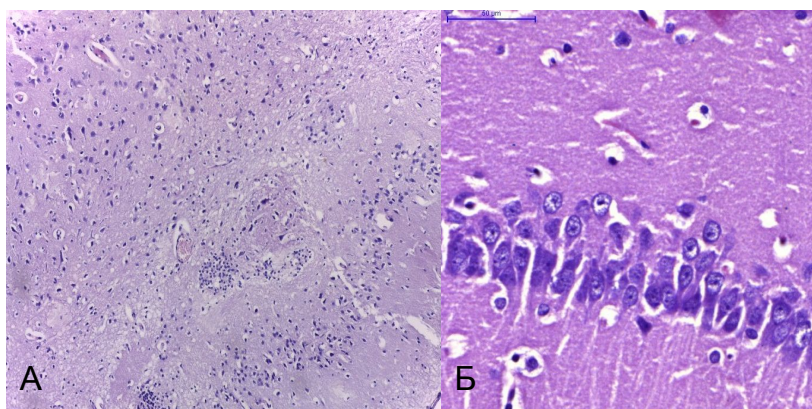


Рис. 1. А - лобная доля интактной крысы, X 100, окр. гематоксилин+эозин; Б – гиппокамп интактной крысы, X 400, окр. гематоксилин+эозин

Область лобной доли характеризовалась низкой плотностью расположения, а область СА1 гиппокампа высокой плотностью средних по размеру нейронов. Морфометрические изменения нейронов при двухсосудистой модели ишемии имели общую тенденцию к увеличению и характеризовались увеличением максимального и минимального диаметров перикарионов, их периметра и площади. Диаметр, площадь и периметр ядер нейронов также увеличивались. Общее количество гиперхромных нейронов составило 36,7%, а двуядрышковых - 16,7% (табл. 1). Изменения аналогичных показателей в области СА1 гиппокампа были менее значительны, однако общая тенденция к их увеличению прослеживалась (табл. 2).

Таблица 1

Морфометрическая характеристика нейронов лобных долей головного мозга крыс
($M \pm m$; $n=30$)

Параметры	Интактные	2-сосудистая ИГМ	4-сосудистая ИГМ	иФДЭ-5+ИГМ
Max D	12,51±0,29	13,23±0,42#	13,54±0,63#	8,57±0,35#
Min D	8,46±0,28	10,41±0,40*	6,58±0,21*	5,62±1,51*

Периметр клетки	35,87±0,90	41,58±1,27*	38,60±1,38*	23,83±4,46*
S клетки	83,33±3,25	120,48±5,81*	75,45±3,62*	40,67±1,28*
Периметр ядра	21,98±0,89	29,68±1,01*	23,58±0,65*	16,38±1,89*
S ядра	35,08±2,21	58,61±4,21*	38,90±2,02*	20,56±0,39*
D ядра	6,28±0,24	9,15±0,42*	7,37±0,24*	5,64±0,11*
D ядрышка	1,88±0,07	Гипохромные нейроны - (46,7%) - 2,65±0,50 Гиперхромные - (36,7%) Двудрышковые - (16,7%) - 2,40±0,24	Гипохромные нейроны - (10%) - 1,67±0,18 Гиперхромные - (90%) Двудрышковые -	Гипохромные нейроны - (43,4%) - 1,63±0,16 Гиперхромные - (43,4%) Двудрышковые - (13,2%) - 1,26±0,10

Примечание: * - при (p<0.05), # - при (p>0.05). За контроль принимали гр. интактных животных. В группе «иФДЭ-5+ИГМ» - гр. крыс с четырехсосудистой ИГМ.

Таблица 2

Морфометрическая характеристика нейронов гиппокампа крыс (M±m; n=30)

Параметры	Интактные	2-сосудистая ИГМ	4-сосудистая ИГМ	иФДЭ-5+ИГМ
Max D	11,85±0,29	13,64±0,16*	11,38±0,16#	8,49±0,21*
Min D	8,03±0,28	6,90±0,20*	6,34±0,20*	5,70±0,78*
Периметр клетки	33,01±0,80	37,22±0,34*	30,40±0,34*	24,30±2,30*
S клетки	68,90±2,63	77,14±2,63*	57,71±1,76*	38,94±0,81*
Периметр ядра	22,66±0,72	27,11±0,47*	20,86±0,47*	17,31±1,28*
S ядра	38,06±2,50	50,41±1,25*	29,96±1,25*	20,98±0,26*
D ядра	6,23±0,26	6,47±0,25#	7,09±0,25*	5,56±0,07*
D ядрышка	2,38±0,07	Гипохромные нейроны - Гиперхромные - (86,7%) Двудрышковые - (13,3%) - 2,03±0,11	Гипохромные нейроны - Гиперхромные - (90%) Двудрышковые - (10%) - 1,83±0,23	Гипохромные нейроны - Гиперхромные - (90%) Двудрышковые - (10%) - 1,83±0,23

Примечание: * - при (p<0.05), # - при (p>0.05). За контроль принимали гр. интактных животных. В группе «иФДЭ-5+ИГМ» - гр. крыс с четырехсосудистой ИГМ.

Качественные изменения характеризовались увеличением количества гиперхромных нейронов, хроматолизом, умеренной дезорганизацией слоев в области СА1. Тела клеток теряли чёткость контуров, деформировались. Ядерные изменения были полиморфными и проявлялись как набуханием, так и пикнозом отдельных ядер. В некоторых нейронах наблюдалось смещение ядра на периферию перикариона. Увеличение количества двудрышковых нейронов в сочетании с общим увеличением площади ядра и перикариона является морфологическим проявлением регенераторных процессов и повышением их

функциональной активности, возникающих в ответ на локальную ишемию головного мозга (рис. 2).

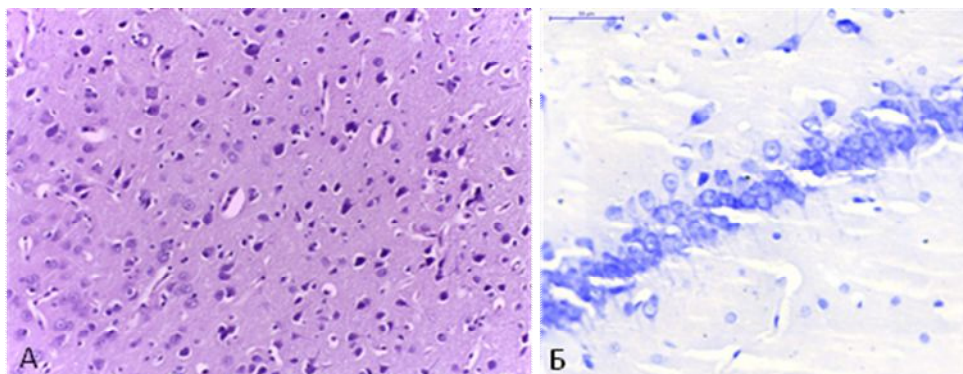


Рис. 2. Двухсосудистая модель ишемии головного мозга: А - лобная доля, окр. гематоксилин+эозин; Б – СА1 область гиппокампа, окр. тионином по Ниссля, X 400

При четырёхсосудистой модели ишемии отмечалась выраженная гиперхромия нейронов лобной доли с периваскулярным и перицеллюлярным отёком. Форма клеток была, преимущественно, многоугольной, вытянутой, ядра во многих из них не определялись. Капилляры паретически расширены, полнокровны. В области СА1 гиппокампа наблюдалась дезорганизация нейрональных слоев, хроматолиз, набухание и пикнотические изменения ядер, двуядрышковые нейроны практически не определялись (рис. 3).

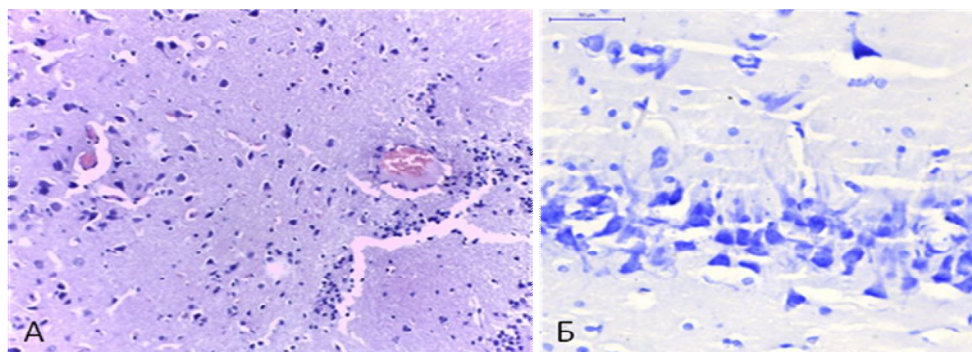


Рис. 3. Четырёхсосудистая модель ишемии головного мозга: А - лобная доля, X 400, окр. гематоксилин+эозин; Б – СА1 область гиппокампа, X 400, окр. тионином по Ниссля

При введении тадалафила в дозе 1 мг/кг за час до моделирования четырёхсосудистой патологии морфологические изменения нейронов носили преимущественно некробиотический характер. Количество погибших нейронов было значительно ниже, чем без коррекции тадалафилом. В гиппокампе нарушение стратификации слоев носило умеренный характер (рис. 4).

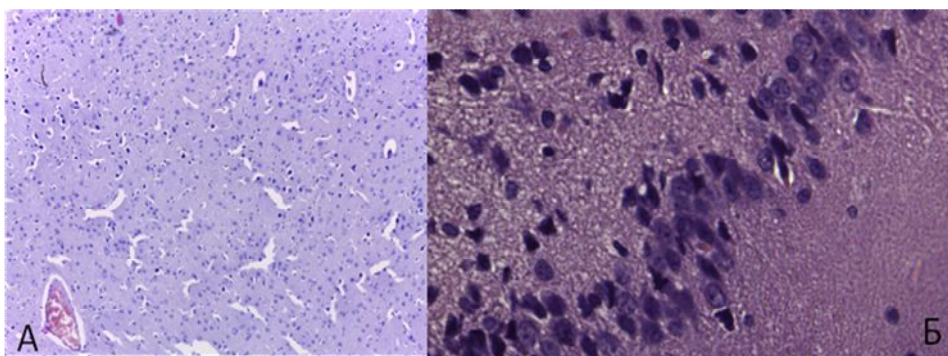


Рис. 4. Четырёхсосудистая модель ишемии головного мозга при коррекции тадалафилом:

А - лобная доля, X 100, окр. гематоксилин+эозин;

Б – гиппокамп, X 400, окр. гематоксилин+эозин

Выводы. При статистическом исследовании установлено, что ишемическое повреждение нейронов и лобной доли, и гиппокампа достоверно более выражено в группе с четырёхсосудистой моделью ишемии мозга без коррекции тадалафилом. Достоверно отличались минимальный диаметр, периметр и площадь нейронов, диаметр, периметр и площадь ядер ($p < 0.05$). Количество двуядрышковых нейронов достоверно больше при коррекции тадалафилом ($p < 0.05$), что отражает функциональное состояние нейронов, их большую активность и способность к регенеративным и репаративным процессам. Достоверных отличий не обнаружено при измерении максимального диаметра ядер нейронов ($p > 0.05$).

В настоящее время выполнен ряд научных исследований, где показывается эффективность использования ингибиторов ФДЭ-5 для профилактики, а также сокращения объема повреждений при ишемических повреждениях органов. Гипотетический механизм церебропротективного действия тадалафила, как и ФДЭ-5, заключается в воздействии на путь NO- цГМФ- протеинкиназы G. При активизации ПК-G происходит фосфорилирование K⁺ каналов, снижение чувствительности мембраны по отношению к нервным импульсам и её гиперполяризация. Далее происходит снижение концентрации свободного Ca²⁺ цитоплазмы. Эти механизмы являются основой вазодилатирующих эффектов оксида азота. Главную роль в этом механизме играет фосфодиэстераза-5. Именно она уменьшает накопление цГМФ.

Таким образом, при двухсосудистой модели ишемии головного мозга крыс отмечались умеренные некробиотические изменения с признаками активации регенераторных процессов как в нейронах лобной доли, так и гиппокампа. При четырехсосудистой модели ишемии повреждения большинства нейронов были необратимы, без признаков активации репаративных процессов. Коррекция ишемического повреждения тадалафилом показала статистически достоверное повышение устойчивости нейронов

лобной доли и СА1 области гиппокампа к гипоксии и ишемии, достоверное снижение количества погибших нейронов и большую активность репаративных процессов.

Список литературы

1. Мартынова О.В. Экспериментальные модели ишемического повреждения головного мозга / О.В. Мартынова, М.В. Покровский, В.В. Гуреев, О.В. Анциферов, М.А. Мартынов // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2014. – № 11 (182). – С. 123-126.
2. Тверской А.В. Морфологические изменения нейронов областей СА1 и СА3 гиппокампа крыс при хроническом иммобилизационном стрессе (морфометрическое исследование) / А.В. Тверской, А.А. Должиков, И.И. Бобынцев, А.А. Крюков, А.Е. Белых // Человек и его здоровье : Курский научно-практический вестник. – 2014. - № 3. – С. 37-41.
3. Bartsch T. CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and auto-noetic consciousness / T. Bartsch, J. Döhring, A. Rohr, O. Jansen, G. Deuschl // PNAS. — 2011. - Vol. 108, № 42. – P. 17562-17566.
4. Conrad C.D. Chronic Stress-Induced Hippocampal Vulnerability Hypothesis // Rev Neurosci. – 2008. - Vol. 19, № 6. – P. 395-411.
5. Dolzhicov A.A. Morphometric study of hippocampal neurons in chronic immobilization stress / A.A. Dolzhicov, A.V. Tverskoi, I.I. Bobyntsev, A.A. Kriukov, A.E. Belykh // Research result. – 2015. - Vol. 1, № 4. – P. 62-65.
6. Falougy H. The microscopical structure of the hippocampus in the rat / Falougy H., Kubikova E., Benuska J. // Bratisl. Lek Listy. – 2008. - Vol. 109, № 3. – P. 106-110.
7. Lee H.Y. Effect of ischemic preconditioning on the expression of c-myc in the CA1 region of the gerbil hippocampus after ischemia/reperfusion injury // Iran. J Basic Med Sci. – 2016. - Vol. 19, № 4. – P. 624-631.
8. Mitsuo Y. One-Stage Anterior Approach for Four-Vessel Occlusion in Rat / Y. Mitsuo, John W. Calvert, Gen Kusaka and John H. Zhang // Stroke. – 2005. - № 36. – P. 2212-2214.
9. Park S.M. Effect of ischemic preconditioning on antioxidant status in the gerbil hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia // Neural Regeneration research. – 2016. - Vol. 11, № 7. – P. 1081-1089.
10. Sugawara T. Effect of hypotension severity on hippocampal CA1 neurons in a rat global Ischemia model / T. Sugawara, M. Kawase, A. Lewen, N. Noshita, Y. Gasche, M. Fuji-mura, P.H Chan // Brain Res. – 2000. - № 877. – P. 281-287.