

На правах рукописи

Мыщик Алексей Владимирович

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ОТНОШЕНИЙ
ЛОБНОЙ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОСТРОЙ И
ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Акулинин Виктор Александрович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор Обухова Лидия Александровна
(Новосибирский государственный университет, профессор кафедры физиологии факультета естественных наук)

Доктор медицинских наук, профессор Шурлыгина Анна Вениаминовна
(Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Новосибирск, заведующий лабораторией иммуноморфологии)

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___»_____2013г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.05, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52, тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52)

Автореферат разослан «___»_____2013г.

Ученый секретарь диссертационного совета

А.В.Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Лобная кора большого мозга (ЛКБМ) человека представляет собой самое сложное и исторически самое новое образование больших полушарий. Она обладает очень сложным строением, созревает позднее остальных отделов, имеет богатые и многообразные системы связей (Лурия А.Р., 1962; Беритов И.С., 1969; Богданов, О.В. и др., 1986; Савельев С.В., 2001; Braak H., 1980).

Существуют морфологические исследования коры большого мозга, выполненные на биопсийном материале головного мозга человека (Bauer K.F., 1968; Cragg B.G., 1976; Ong W.Y., Garey L.J., 1991). В настоящее время широко используются методы иммуногистохимической идентификации специфических нейрональных и глиальных белков, которые длительно сохраняются в нейронах в аутопсийном материале и после фиксации (Lyck L. et al., 2008).

Получение, в результате исследований, большого объема данных о структуре нервной ткани сопряжено с необходимостью увеличения точности морфометрической оценки структурно-функционального состояния клеток и синапсов с помощью методов автоматизированного компьютерного анализа изображений, а так же с облегчением использования и автоматизацией применения системного статистического анализа. Оптимальным инструментом для решения этих задач в настоящее время является программа ImageJ 1.46, которая обеспечивает быстрый и качественный анализ графических объектов (Ferreira T.A., Rasband W., 2010; Ho S-Y. et al., 2011), упрощает перенос данных в программы статистического анализа.

Кора большого мозга человека в норме относительно хорошо изучена с помощью анатомических, гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования. Значительно меньше публикаций посвящено детальному сравнительному морфологическому иммуногистохимическому изучению нейронов, глии и межнейронных синапсов различных отделов и слоев ЛКБМ при острой и хронической ишемии. Таким образом, по данным литературного обзора, имеется методологическая и методическая основа для дальнейшего изучения морфологии головного мозга человека в норме и при различных патологических состояниях. Работ, посвященных изучению пирамидных нейронов лобной коры большого мозга человека в норме, при острой и хронической ишемии в сравнительном аспекте, в доступных базах данных мы не нашли.

Цель исследования. Исследовать закономерности реорганизации цито- и синаптоархитектоники разных слоев лобной коры головного мозга человека при

острой и хронической ишемии методами иммуноморфологии и автоматической морфометрии.

Задачи исследования

1. Получить новые данные о цито- и синаптоархитектонике, а также об особенностях реорганизации межклеточных взаимоотношений разных слоев лобной коры большого мозга человека в норме, при острой и хронической ишемии.

2. С помощью сравнительного гистологического и иммуногистохимического морфометрического исследования оценить структурно-функциональное состояние пирамидных нейронов, астроцитарной глии и синапсов слоя III и V лобной коры большого мозга человека в норме, при острой и хронической ишемии.

3. Определить взаимосвязи структурных и функциональных изменений нейронов, глиальных клеток и синапсов различных слоев лобной коры большого мозга человека в норме, при острой и хронической ишемии путем сопоставления результатов гистологического (метод Ниссля) и иммуногистохимического морфометрического исследования.

4. Изучить закономерности реорганизации пирамидных нейронов, астроцитов и синапсов на гистологических и иммуногистохимических препаратах коры большого мозга человека в норме и при ишемии, используя математическую модель полученных данных в программе ImageJ 1.46.

Научная новизна. Впервые проводился анализ различных морфотипов пирамидных нейронов, глиальных клеток и синапсов лобной коры большого мозга человека при гистологическом и иммуногистохимическом исследовании биопсийного материала. Проведено сравнительное иммуногистохимическое изучение структурно-функциональных изменений нейронов, глиальных клеток и синапсов различных слоев лобной коры большого мозга человека в норме, при острой и хронической ишемии. Выявлена высокая функциональная активность и компенсаторная реорганизация сохранившихся нейронов и глиальных клеток в перифокальной зоне лобной коры при острой и хронической ишемии. Новые данные о структурно-функциональной основе постишемической реорганизации лобной коры получены с помощью адаптированных для конкретных задач настоящего исследования программных модулей (плагинов) автоматической морфометрии из программы ImageJ 1.46.

Практическая значимость. Полученные новые оригинальные данные позволяют объяснить общие закономерности и специфические особенности структурно-функциональной реорганизации разных слоев лобной коры большого

мозга человека при острой и хронической ишемии. Выявленные в ходе проведенных исследований изменения нейронов, глиальных клеток и синапсов позволяют оценить жизнеспособность нейронов в инцизионных биоптатах коры большого мозга человека, а также характер и особенности отдаленной структурной реорганизации перифокальной зоны ишемического повреждения. Разработанные способы автоматизированного морфометрического анализа микроскопического изображения существенно улучшают качество его морфометрической оценки и повышают степень объективности исследования в целом.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Острая и хроническая ишемия (в перифокальной зоне) приводят к выраженному снижению общей численной плотности пирамидных нейронов в слое III и V лобной коры большого мозга человека. При этом сохраняется значительное количество нейронов, содержащих большое количество нейронспецифической енолазы и способных активно функционировать. Компенсаторная активация метаболизма части сохранившихся нейронов сопровождается активацией синапсов и пролиферацией астроцитов.

2. Во всех изученных слоях лобной коры для обеспечения функционирования сохранившихся нейронных сетей при ишемии требуется существенно большее количество синапсов и значительные энергетические затраты. Имеются выраженные специфические особенности иммуногистохимических морфометрических изменений содержания нейронспецифической енолазы, синаптофизина и глиального кислого белка в мелко- и крупноклеточных популяциях пирамидных нейронов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на Всероссийской конференции с международным участием «Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга» (Москва, 2010), на X Конгрессе международной ассоциации морфологов «Структурная реорганизация нейронов головного мозга человека при ишемии» (Ярославль, 2010), на 40-й ежегодной конференции Neuroscience (Сан Диего, Калифорния, США, 2010), на 41-й ежегодной конференции Neuroscience (Вашингтон, округ Колумбия, США, 2011).

Внедрение. Основные научные данные, теоретические положения, разработанные на их основе, практические рекомендации настоящего исследования внедрены в процесс преподавания на кафедрах: гистологии, цитологии и эмбриологии; биологии; патологической анатомии; патологической физиологии; анатомии человека; судебной медицины с курсом правоведения Омской

государственной медицинской академии, – при изучении вопросов морфологии и функционирования нервной ткани, органов центральной нервной системы человека в условиях нормы и при диффузно-очаговых ишемических повреждениях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 7 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов для публикаций материалов диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертация представлена на 160 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав описаний собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 47 рисунками. Список литературы содержит 235 источников, в том числе 27 отечественных и 208 зарубежных авторов.

Личный вклад автора. Все материалы, представленные в диссертации, получены, обработаны и проанализированы лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Омской государственной медицинской академии (протокол № 53 от 15.01.2013).

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Для исследования были выбраны две группы пациентов с острой и хронической недостаточностью кровоснабжения коры головного мозга. При черепно-мозговой травме (группа «острая ишемия») всегда наблюдались явления отека-набухания мозга. В группе «хроническая ишемия» у пациентов наблюдались вторичные микроциркуляторные нарушения в результате внутричерепной гипертензии по причине опухоли. Контролем служил мозг погибших в результате несчастных случаев. Аутопсийный материал забирали из левого полушария спустя 5-10 ч после смерти. Исследовалась лобная кора (поле 10 по Бродману).

Гистологические методы. Интраоперационный и контрольный материал в количестве 24 образцов сразу после получения фиксировался в 4 % растворе формалина в 0,1М фосфатном буфере при pH 7,2–7,4 и хранился в холодильнике при температуре +4°C.

Материал заключался в парафин, затем изготавливались серийные срезы толщиной 4 мк через все слои коры большого мозга, которые были помещены на предметные стекла и окрашены для обзорной микроскопии гематоксилин-эозином,

следующая серия фронтальных срезов окрашивалась тионином. С помощью микроскопа Leica DM 1000 делались цифровые микрофотографии всех слоёв коры большого мозга на различных увеличениях. На полученных микрофотографиях проводили общую и морфометрическую оценку структурно-функционального состояния основных типов пирамидных и непирамидных нейронов на уровне всех слоев коры.



Рис. 1. Дизайн исследования

Иммуногистохимические методы. Используя ранее изготовленные парафиновые блоки, на микротоме с системой водного транспорта были сделаны серийные фронтальные срезы толщиной 4 μ через все слои коры большого мозга. С каждого блока было сделано последовательно три среза, которые помещались на предметные стёкла. Стекла со срезами были помещены в 10 mM цитратный буфер (pH 6,0) и инкубированы 10 минут при температуре +90°C, затем охлаждены при комнатной температуре, затем они были промыты 0,05 % фосфатным буфером дважды, нанесены первичные антитела. Использовались следующие первичные кроличьи поликлональные антитела (ImG) к: 1) синаптофизину, p-38; 2) нейрон-специфической енолазе, NSE; 3) глияльному фибриллярному кислому белку, GFAP. Антитела инкубировались на качающейся поверхности при комнатной температуре, потом стекла были промыты 0,05 % фосфатным буфером дважды.

Для визуализации иммунной реакции были использованы поликлональные вторичные антитела, ядра клеток были докрашены DAPI.

На микроскопе Axioskop 40, оснащённом ртутной лампой HBO 100, камерой на CCD датчике – AxioCam MRc и объективом EC Plan-Neofluar x40, апертура 0.9, делались цифровые микрофотографии размером изображения 1300x1030 пикселей, реальным размером 220x174 μ .

Программой AxioVision производился захват изображения с каждого среза общей площадью 382800 μ^2 через все слои неокортекса. Затем эти изображения анализировались с помощью программы ImageJ, определялись количественные характеристики частиц флюорохромов, для Texas Red® и DAPI отдельно: количество, интенсивность окраски, площадь, периметр, длина, ширина. Эти данные позволили сделать выводы о морфофункциональном состоянии клеток неокортекса, рассчитать ядерно-цитоплазматическое отношение. Программа использовалась также для дефиниции общей численной плотности нейронов, определении их площади, периметра, продольного и поперечного диаметров; содержания реактивно, дистрофически и некробиотически изменённых клеток в различных слоях неокортекса, ядерно-цитоплазматического отношения, распределения синаптофизина, енолазы, фибриллярного кислого белка.

Полученные результаты обработаны в программе MedCalc®, (www.medcalc.be) при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни (Реброва), который был выбран из-за достаточной устойчивости к ошибкам первого и второго рода, в том числе при небольшом числе значений признака. В каждой сравниваемой группе

количество измерений определялось требованиями выявления статистической значимости при $p < 0,05$, что является достаточным для медико-биологических исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гиперхромные несморщенные и сморщенные нейроны, нормохромные нейроны, гипохромные и вакуолизированные нейроны представляют собой морфотипы, различающиеся по размеру, интенсивности окраски, геометрии. Под визуальным контролем, на препаратах, окрашенных тионином, были определены эти характеристики пирамидных нейронов, написана подпрограмма, объединяющая эти данные в универсальную модель анализа, дискриминации и подсчета необходимых параметров.

Таким образом, с учетом морфологических характеристик различных морфотипов нейронов программа ImageJ позволяет их успешно идентифицировать, а также рассчитывать их количество, размеры, площади.

В слоях IIIb и Va лобной коры (поле 10) большого мозга (ЛКБМ) лиц из контрольной группы преобладали нормохромные пирамидные нейроны, которые, при окраске по Нисслю, представляли собой клетки крупного и среднего размера с хорошо прокрашенной сомой. В цитоплазме нормохромных пирамидных нейронов видны темные глыбки вещества Ниссля – гранулярной эндоплазматической сети, в центре – ядро, занимающее основную часть тела клетки, с темноокрашенным ядрышком. При этом контрастируется только начальный сегмент проксимального дендрита (рис. 2).

При острой и хронической ишемии в слоях IIIb и Va ЛКБМ человека наряду с нормохромными пирамидными нейронами появлялось большое количество реактивно и деструктивно измененных клеток – гиперхромных несморщенных и сморщенных, гипохромных нейронов, клеток-теней, а также фагоцитируемые нейроны.

Гиперхромные несморщенные пирамидные нейроны (рис. 3) отличались более интенсивной окраской, что свидетельствовало об изменении тинкториальных свойств хроматофильного вещества, нуклеиновых кислот, белка. Структура клеток менялась незначительно, все компоненты нейрона хорошо верифицировались, на значительном расстоянии прокрашивались апикальные и базальные дендриты. Объем клетки в целом, как правило, немного уменьшался, что свидетельствовало о незначительной дегидратации.

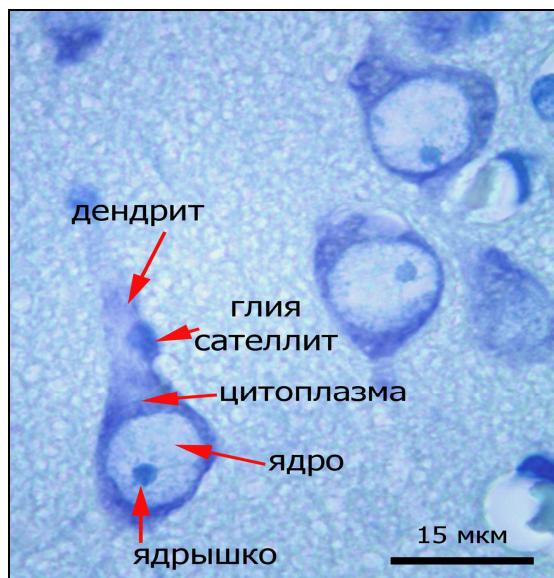


Рис. 2. Лобная кора (поле 10) большого мозга человека, группа контроля. Типичные нормохромные нейроны слоя IIIb на большом увеличении, об. x100. Окраска по Нисслю.

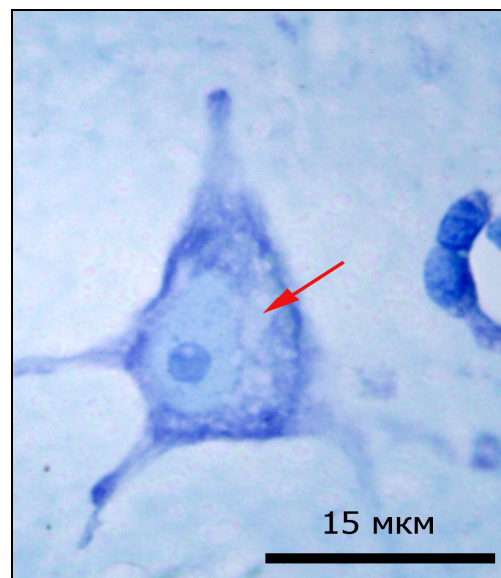


Рис. 3. Лобная кора (поле 10) большого мозга человека, группа острой ишемии. Вакуолизация, смещение ядра на периферию несморщенных нейронов, слой IIIb, об. x100. Окраска по Нисслю.

В части гиперхромных клеток наблюдались очаги хроматолиза, вакуолизация, ядра уменьшались в объеме и смещались на периферию (рис. 3).

По данным светооптического исследования препаратов, окрашенных по Нисслю, установлено, что в сравнении с контролем, острая и хроническая ишемия головного мозга приводит к выраженным изменениям формы и тинкториальных свойств части пирамидных нейронов ЛКБМ человека. Появляются типичные для ишемии вакуолизированные, гиперхромные сморщенные нейроны, клетки-тени, фигуры фагоцитоза необратимо поврежденных нейронов. Однако на этом фоне сохраняется значительное количество нейронов без признаков необратимых изменений структуры ядра и цитоплазмы, это гиперхромные несморщенные, гипохромные и даже нормохромные нейроны. Именно эти нейроны в конечном итоге определяют исход реорганизации перифокальной ишемизированной зоны.

Наличие NSE позволяет оценить количество функционально активных нейронов, а также, по занимаемой площади среза относительную активность процессов гликолиза.

Проведена автоматическая морфометрия по трем группам (норма, острая и хроническая ишемия) в IIIb и V слоях лобной коры (поле 10) на тех же блоках (серийных срезах), которые использовались для окраски по Нисслю (рис. 4).

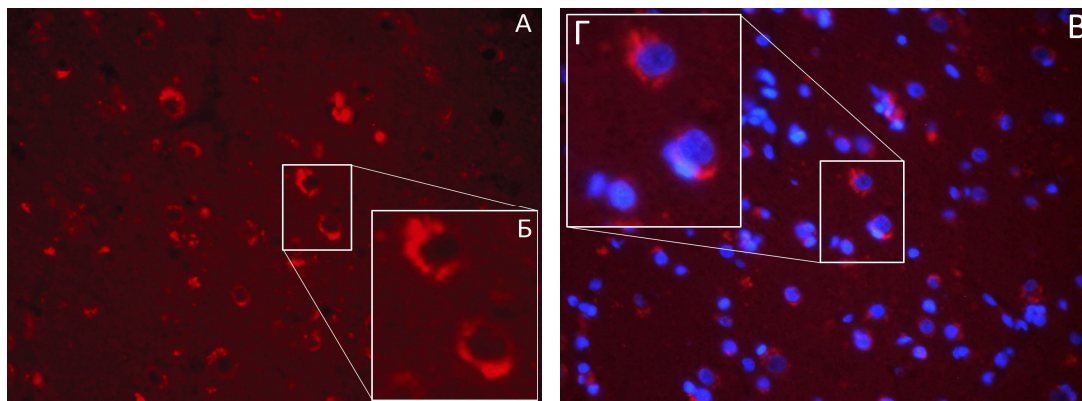


Рис. 4. Распределение гранул NSE в III слое лобной коры большого мозга человека поле 10 Об. x40 (острая ишемия: А – флюорохром TexasRed, Б – увеличенный фрагмент; В – дополнительное окрашивание ядер DAPI, выраженный глиоз, Г – увеличенный фрагмент).

Морфометрический анализ показал, что в сравнении с нормой при ишемии происходило изменение характера распределения, статистически значимое изменение, количества, размеров и формы флуоресцирующих меток NSE в ЛКБМ. Так, в слое IIIб лобной коры большого мозга общая площадь флуоресцирующих NSE-позитивных гранул (частиц, конгломератов) при острой ишемии увеличивалась в 1,9 раза, а при хронической ишемии — в 1,5 раза по сравнению с контролем.

Необходимо отметить, что при острой ишемии общая численная плотность нейронов в слое III уменьшалась на 40,9 %, а в слое V — на 19,6 %. При хронической ишемии дефицит нейронов в слое III составил 53,1 %, а в слое V — 39,3 %. Кроме того, острая и хроническая ишемия сопровождались существенным уменьшением относительного содержания нормохромных нейронов (на 63,1 % – 91,6 %) и увеличением содержания реактивно измененных нейронов. Это свидетельствует о том, что даже на фоне выраженного дефицита и деструкции нейронов после ишемии общая площадь NSE-позитивных гранул имеет явную тенденцию к увеличению, вероятно, за счет компенсаторной активации и гипертрофии сохранившихся нейронов.

В результате проведенного сравнительного исследования было установлено, что при острой ишемии происходит компенсаторная активация метаболизма сохранившихся нейронов только слоя III, а при хронической ишемии — III и V слоёв ЛКБМ.

Полученные данные, свидетельствовали и о том, что при длительной хронической ишемии истощались компенсаторные возможности пула крупных

пирамидных нейронов и часть этих клеток, устойчивых к острой ишемии, подвергалась необратимым деструктивным изменениям на фоне активации метаболизма в соседних клетках.

Общая площадь GFAP-позитивного материала в срезах ЛКБМ при ишемии статистически значимо увеличивалась. В слое III при острой ишемии площадь по сравнению с контролем увеличивалась на 7,6 %, а при хронической ишемии – на 36,4 %. В слое V – соответственно на 29,3 % и 33,5 %.

Увеличение общей площади GFAP-позитивного материала в слое III при хронической ишемии, в отличие от нейронов, сопровождалось увеличением общей численной плотности клеток на 16,3 %. При этом средняя площадь одного астроцита в слое IIIb при острой ишемии не изменялась, а при хронической увеличивалась на 24,3 %.

Астроциты слоя V были более разветвленными, чем в слое IIIb. В результате их площадь была примерно в 2 раза больше. В слое V при острой ишемии средняя площадь увеличивалась только на 8,3 %, а при хронической ишемии не изменялась. То есть, в этом слое общая площадь при ишемии увеличивалась преимущественно за счет пролиферации клеток, а в слое IIIb еще и за счет их гипертрофии.

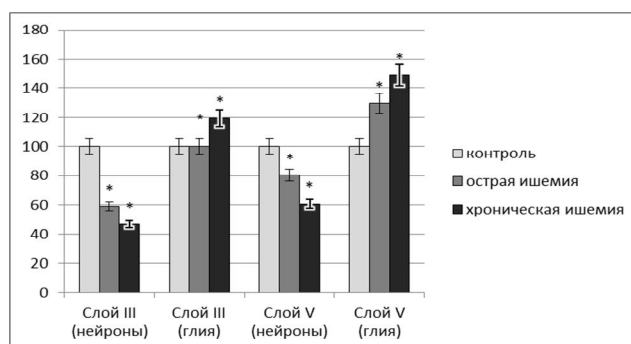
Таким образом, по данным морфометрического исследования иммуногистохимических препаратов установлено, что при острой и хронической ишемии в ЛКБМ человека происходит увеличение общей площади гранул GFAP-позитивного материала, что свидетельствует о компенсаторной активации функционирования пула астроцитов за счет их пролиферации и гипертрофии.

Количество синапсов в группах с острой и хронической ишемией было больше, чем в контроле, на 43,0 % и 21,7 % соответственно. Различия между основными группами были также статистически значимы. Наиболее выражено фрагментация конгломератов p38-позитивного материала на теле нейронов происходила при острой ишемии. Средняя площадь частиц при острой ишемии была на 48,5 % меньше, чем в норме, и на 34,0 % меньше, чем при хронической ишемии. В слое V общая площадь p38-позитивных частиц была статистически значимо меньше (на 46,5%), чем в контроле, только при хронической ишемии. При этом количество p38-позитивных частиц на телах крупных нейронов было больше на 18,8 %, а средняя площадь частицы меньше на 42,9 %, чем в контроле.

По данным морфометрического исследования, установлено, что при острой и хронической ишемии в сохранившихся неповрежденных нейронах ЛКБМ происходит

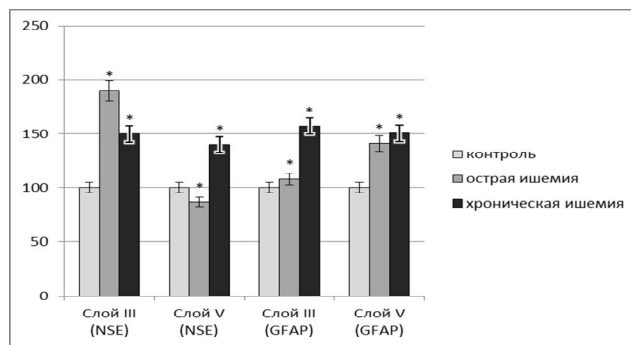
компенсаторное увеличение содержания NSE выше контрольных значений, что, вероятно, свидетельствует об их высокой функциональной активности. Активация метаболизма части сохранившихся нейронов сопровождается выраженной деструкцией межнейронных синапсов ЛКБМ. В пользу этого свидетельствуют данные об уменьшении количества р38 в слоях IIIb и V ЛКБМ при острой и хронической ишемии. В ЛКБМ человека при острой и хронической ишемии сохраняется значительный резерв нейронов, способных активно функционировать (экспрессия белка NSE). Однако, интегрирование этих нейронов в единую пространственную нейронную сеть на фоне вторичных нарушений микроциркуляции и отека мозга существенно затруднено, в результате чего нарушается интегративно-пусковая функция ЛКБМ и не реализуется репаративный потенциал сохранившихся нейронов.

Установлено, что при острой и хронической ишемии в сохранившихся неповрежденных нейронах ЛКБМ происходит компенсаторное увеличение содержания NSE выше контрольных значений, что, вероятно, свидетельствует о высокой функциональной активности этих нейронов. Компенсаторная активация метаболизма части сохранившихся нейронов сопровождается активацией пула астроцитов с образованием новых клеток. Подобные изменения нейроглиальных взаимоотношений обеспечивают наиболее оптимальные условия для постишемической реабилитации функций нейронных сетей в поврежденном головном мозге (рис 5, 6).



* – различия статистически значимы в сравнении с контролем при $p < 0,02$ (критерий Манна-Уитни)

Рис. 5. Изменение общей численной плотности (%) пирамидных нейронов (метод Ниссля) и глиальных клеток (GFAP) в поле 10 лобной коры большого мозга человека в норме, при острой и хронической ишемии



* – различия статистически значимы в сравнении с контролем при $p < 0,04$ (критерий Манна-Уитни)

Рис. 6. Изменение общей площади NSE- и GFAP-позитивного материала в поле 10 лобной коры большого мозга человека в норме, при острой и хронической ишемии

Несмотря на значительную компенсаторную активацию метаболических процессов в сохранившихся пирамидных нейронах на фоне их общего дефицита при ишемии не происходило полной компенсации утраченного объема р38-позитивного материала межнейронных контактов.

В слое IIIb происходило уменьшение общей площади флуоресцирующей метки в поле зрения в одинаковой степени при острой и хронической ишемии, а фрагментация конгломератов синаптофизин-позитивного материала на теле нейронов наиболее выражено происходила при острой ишемии. В слое V при острой ишемии фрагментация р38-позитивного материала не сопровождалась уменьшением его общей площади. При хронической ишемии в слое V существенно уменьшалась общая площадь флуоресцирующего материала в поле зрения, что свидетельствовало о необратимой деструкции крупных нейронов и истощении компенсаторных возможностей сохранившихся.

В слое V эта закономерность была характерна только для группы лиц с хронической ишемией. В этом слое в норме на один нейрон приходилось 84 мкм^2 гранул р38-позитивного материала, при острой ишемии – $60,5 \text{ мкм}^2$ (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$), а при хронической ишемии – $96,7 \text{ мкм}^2$ ($p < 0,05$).

Все это свидетельствует о том, что при ишемии для обеспечения функционирования нейронных сетей требуется существенно больше синаптических пузырьков и более значительных энергетических затрат сохранившихся нейронов.

Таким образом, в настоящем исследовании с помощью комплекса гистологических, иммуногистохимических, морфометрических методов проведен анализ структурно-функционального состояния различных морфотипов пирамидных нейронов, глиальных клеток и синапсов лобной коры большого мозга человека. Дана

сравнительная характеристика изменений клеток и синапсов различных слоев лобной коры большого мозга в норме, при острой и хронической ишемии. Найденные изменения позволяют уточнить наши представления о закономерностях адаптивной и репаративной реорганизации cito- и синаптоархитектоники этого важного отдела головного мозга человека при его ишемическом повреждении.

ВЫВОДЫ

1. Острая и хроническая ишемия головного мозга человека приводят к выраженным изменениям cito- и синаптоархитектоники лобной коры большого мозга человека, которые заключаются в том, что общая численная плотность пирамидных нейронов при острой ишемии (в сравнение с контролем) в слое IIIb снижалась на 40,9 %, а в слое V – только на 19,6 %. При хронической ишемии численная плотность пирамидных нейронов в слое IIIb уменьшалась на 53,1 %, а в слое V – на 39,3 %, что статистически значимо больше, чем при острой ишемии.

2. По данным гистологического (высокое содержание нормохромных нейронов) и иммуногистохимического (экспрессия белка NSE) исследования, при острой и хронической ишемии сохранялось значительное количество нейронов, сохранивших структуры, обеспечивающие клетки энергией и структурную целостность, а значит способных активно функционировать.

3. Выявлены признаки компенсаторной активации сохранившихся нейронов. В слое III общая площадь флуоресцирующих NSE-позитивных гранул при острой ишемии увеличивалась в 1,9 раза, а при хронической ишемии – в 1,5 раза по сравнению с контролем. В слое V при острой ишемии площадь NSE-позитивных гранул уменьшалась на 13,2 %, а при хронической ишемии – увеличивалась в 1,4 раза.

4. Компенсаторная активация метаболизма части сохранившихся нейронов (экспрессия белка NSE) сопровождалась активацией пула астроцитов с образованием новых клеток. По сравнению с контролем общая площадь GFAP-позитивного материала (на 1 мм²) в слое III при острой ишемии увеличивалась на 7,6 %, при хронической ишемии – на 36,4 %, а в слое V – соответственно на 29,3 % и 33,5 %.

5. По данным иммуногистохимического исследования для обеспечения функционирования нейронных сетей лобной коры при ишемии требуется существенно больший объем синапсов (что подтверждается значительным увеличением p38 позитивных гранул) и более значительные энергетические затраты сохранившихся нейронов (увеличение содержания NSE положительного материала). В норме в слое IIIb на один функционирующий пирамидный нейрон приходилось

34,1 мкм² флуоресцирующих гранул р38-позитивного материала, при острой ишемии этот показатель составил 50,8 мкм², при хронической – 62,9 мкм². В слое V эта закономерность характерна только для хронической ишемии.

6. Для морфометрической оценки цито- и синаптоархитектоники неокортекса человека в норме и при ишемии целесообразно использовать программу ImageJ 1.46, которая позволяет очень точно определять площадь и кривизну контуров изучаемых структур, углов их наклона, отношение диаметров эллипса и длины периметра, а также тинкториальные особенности ткани. На начальных этапах построения математической, геометрической и тинкториальной моделей исследуемой ткани обязателен визуальный контроль результатов автоматического анализа изображений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для использования программы ImageJ 1.46 необходима стандартизация приготовления препаратов, режимов микрофотосъемки, ориентации экранных образований головного мозга, исходных порогов и установок программы.

2. При анализе простых объектов, каковыми являются иммуногистохимические метки, ядра нейронов и клеток глии, существует возможность автоматической стандартной обработки серий микрофотографий.

3. Для верификации и морфометрического изучения объектов со сложной пространственной организацией (нейроны) необходима индивидуальная настройка входных параметров для каждого конкретного поля зрения и увеличения, а также расширение набора регистрируемых параметров.

4. Добавление к дискриминационной модели дополнительных параметров (наклон, размер осей, интенсивность окраски) изучаемых объектов позволяет существенно повысить ее специфичность и правильно идентифицировать 94 % – 95 % объектов.

5. Визуальный контроль специалиста является обязательным этапом для сопоставления цифрового и аналогового анализа изображения.

6. При окраске препаратов на DAPI программу ImageJ 1.46 целесообразно использовать для дискриминации пула ядер нейронов и глиальных клеток.

7. Дискриминацию по форме и размерам компонентов клеток можно использовать только на этапе предварительного анализа нейро-глиальных отношений и преимущественно в норме. Для объективной оценки количества этих клеток в мелкоклеточных популяциях при ишемии необходимо проведение дополнительно иммуногистохимических реакций на специфические белки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мыщик А.В.** Структурно-функциональная реорганизация популяции нейронов лобной коры большого мозга человека при хронической ишемии различной степени тяжести / **А.В. Мыщик** // **Омский научный вестник**. – № 1(94). – Омск, 2010. – С. 13-16.
2. **Мыщик А.В.** Использование программы Image J для автоматической морфометрии в гистологических исследованиях / **А.В. Мыщик** // **Омский научный вестник**. – № 2(100). – Омск, 2011. – С. 187-189.
3. **Мыщик А.В.** Иммунофлуоресцентная верификация и морфометрия аксосоматических синапсов неокортекса человека при острой и хронической ишемии / **А.В. Мыщик**, В.А. Акулинин, С.С. Степанов, А.В. Сергеев, П.М. Ларионов // **Морфологические ведомости**. – 2012, – №3 – С. 53-60.
4. Акулинин В.А. Структурно-функциональное состояние пирамидных нейронов коры большого мозга человека в постреанимационном периоде / В.А. Акулинин, **А.В. Мыщик**, С.С. Степанов, П.М. Ларионов, П.В. Беличенко // **Вестник НГУ**. –2012. – Т.10, №4. – С. 21-28.
5. **Мыщик А.В.** Актуальные проблемы изучения нейроглиальных взаимоотношений коры большого мозга человека в постишемическом периоде / **А.В. Мыщик**, С.С. Степанов, П.М. Ларионов, С.М. Горбачева, В.А. Акулинин // **Сибирский медицинский журнал**. – 2012. – Т.113, № 6. – С. 48-51.
6. Степанов С.С. Морфометрическая автоматическая оценка морфологии митохондрий коры большого мозга экспериментальных животных и человека в норме и в постишемическом периоде / С.С. Степанов, П.В. Беличенко, **А.В. Мыщик**, В.А. Акулинин // **Вестник новых медицинских технологий**. –2012.–Т. 19, №3.–С. 14-18.
7. **Мыщик А. В.** Влияние ишемии на нейроглиальные взаимоотношения лобной коры большого мозга человека / **А.В. Мыщик**, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, П. М. Ларионов // **Омский научный вестник**. – № 1(118). – Омск, 2013. – С. 74-77.
8. **Мыщик А.В.** Актуальные проблемы изучения структурно-функционального состояния нейронов коры большого мозга человека в постишемическом периоде / **А.В. Мыщик**, С.С. Степанов, П.М. Ларионов, В.А. Акулинин // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2012. – Т. 1, № 1. – С.37-47.
9. Акулинин В.А. Архитектоника нейронов мозга человека в отдаленном постишемическом периоде / В.А. Акулинин, **А.В. Мыщик**, А. Дальстрем // Модернизация образовательных программ для онкологической службы в Омском регионе : материалы международной научно–практической конференции. - Омск,

Сб..науч..тр., 2009. – С. 45-48.

10. Akulinin V.A. Plasticity of neuronal networks in the late postischemic period: Dendritic alterations of pyramidal neurons in the sensorimotor cortex in adults / V.A. Akulinin, **A.V. Mytsik**, P.V. Belichenko // 40 Annual meeting, NEUROSCIENCE, 13-17 November 2010. – San Diego, California, USA. – R9 56.4.

Акулинин В.А. Пластичность нейронных сетей в позднем постишемическом периоде: дендритные изменения пирамидальных нейронов в сенсомоторной коре / В.А. Акулинин, **А.В. Мыщик**, П.В. Беличенко // 40 Годовое собрание Neuroscience, 13-17 ноября 2010. - Сан-Диего, Калифорния, США. – R9.56.4.

11. Akulinin V.A. Interneurons of the human neocortex in subjects surviving after acute myocardial infarction and controls / V.A. Akulinin, A.V. Sergeev, **A.V. Mytsik**, S.S. Stepanov, P.V. Belichenko // 41 Annual meeting, NEUROSCIENCE, 12-16 November 2011. – Washington D.C., USA. – Y8 292.18-Su.

Акулинин В.А. Выживание интернейронов человека в после острого инфаркта миокарда, сравнение с нормой / В.А. Акулинин, А.В. Сергеев, **А.В. Мыщик**, С.С. Степанов, П.В. Беличенко // 41 Годовое собрание Neuroscience, 12-16 ноября 2011. - Вашингтон округ Колумбия, США. - 292,18 Y8-Su.

12. **Мыщик А.В.** Структурная реорганизация нейронов головного мозга человека при ишемии / **А.В. Мыщик** // **Морфология:** матер. докл. X Конгресса междуна. ассоц. морфологов, посвящается 200-летию со дня рождения Н.И. Пирогова. – 2010. – Т.137, № 4. – С.138.

13. **Мыщик А.В.** Структурно-функциональные предпосылки формирования асимметрии перифокальной зоны коры головного мозга человека при глиальных опухолях / **А.В. Мыщик** // Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга : матер. Всеросс. конф. с междунар. участием. 2-3 декабря, Москва, 2010. – С.202-205.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛКБМ	лобная кора большого мозга
MPT	магнитно-резонансная томография
МСКТ	многослойная компьютерная томография
ЦНС	центральная нервная система
ANOVA	Analysis of Variance (однофакторный дисперсионный анализ)
NSE	нейрон-специфическая енолаза
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
p38	синаптофизин
GFAP	глиальный фибриллярный кислый белок