

На правах рукописи

Макарьева Любовь Михайловна

**ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОГЛИАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ПЕРЕВЯЗКЕ ОБЩИХ
СОННЫХ АРТЕРИЙ**

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Акулинин Виктор Александрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент

Ишунина Татьяна Александровна

(Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, профессор кафедры)

доктор биологических наук

Колдышева Елена Владимировна

(Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Институт молекулярной патологии и патоморфологии, лаборатория молекулярных механизмов патологических процессов, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории, г. Новосибирск)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.05, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, ул. Залесского, д. 4; тел. 8 (383) 222-68-35); <http://ngmu.ru/dissertation/533>)

Автореферат разослан «_____» _____ 202 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. Важнейшей и актуальной проблемой нейробиологии является изучение реакции нервной ткани на ишемию и постишемическое повреждение (Сергеева С. П. и др., 2017). В этом направлении накоплен значительный экспериментальный материал по всем научным направлениям, включая и морфологические науки (Данилова Т. Г., Шумихина Г. В., 2015; Ветровой О. В. и др., 2017; Гельцер Б. И. и др., 2019; Бонь Е. И., Максимович Н. Е., 2021). Дисциркуляторные энцефалопатии признаются одной из ведущих причин смертности и инвалидности в мире (Пизова Н. В., 2018). Хроническое нарушение мозгового кровотока может вызвать неврологический дефицит и деменцию (Старчина А. Ю., Захаров В. В., 2021). Основной причиной сосудистого когнитивного нарушения является тяжелая гипоперфузия (Nadim S. Jiwa, 2010).

Цито-, дендро-, синапто- и глиоархитектоника сенсомоторной коры (СМК) в норме и после ишемии в настоящее время хорошо изучены и суммированы в многочисленных обзорах (Мыщик А. В. и др., 2012; Семченко В. В. и др., 2014; Qian H. Z. et al., 2018; Koizumi S. et al., 2018). Известно, что после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий (ПОСА) у крыс сохранен определенный уровень кровотока благодаря неравномерному его снижению в разных отделах головного мозга и существованию коллатерального кровообращения (Бонь Е. И., Максимович Н. Е., 2018; Ohta H. et al., 1997; Hossmann K. A., 1998; Rami A., 2009; Hui Gong et al., 2013). При данной модели неполной глобальной ишемии происходит деструкция и гибель нейронов в высокочувствительных к ишемии отделах головного мозга, в том числе СМК, особенностью модели на белых крысах является диффузный характер повреждения нейронов (Гельцер Б. И. и др. 2019; Jessica Duncombe et al., 2017; Kazuo Washida et al., 2019).

Особый интерес в последнее время связан с изучением нейронов и глиальных клеток в составе их интегрированных структурно-функциональных систем, например, нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов (Hailong Li et al., 2014; Min Kyung Song et al., 2020; Yu Zhao et al., 2020; Claudia Alia et al., 2021). Астроциты в этих комплексах выполняют существенную роль для сохранения ионного гомеостаза, клиренса нейротрансмиттеров, обладают ангиогенным, нейропротекторным действием и моделируют синаптическую передачу (Jha M. K. et al., 2016;

Гомазков О. А., 2019). Микроглиоциты являются компонентом собственной иммунной системы головного мозга и принимают участие в санации нервной ткани при повреждении (Colonna M., Butovsky O., 2017). Однако реакция астроцитов и микроглиоцитов при неполной глобальной ишемии требует дальнейшего изучения и уточнения. Таким образом, более детальное изучение однонаправленной реорганизации интегрированных нейро-глио-сосудистых микроструктурных комплексов приведет к появлению новых данных о закономерностях реорганизации нервной ткани СМК головного мозга при длительной неполной глобальной ишемии после двусторонней необратимой перевязки общих сонных артерий.

Степень разработанности темы диссертации. Анализ литературных данных свидетельствует о недостаточности информации для понимания фундаментальных механизмов нейроглиальных взаимоотношений при диффузном повреждении СМК после необратимой двусторонней ПОСА. Таких работ мало, плохо изученными являются закономерности пространственной реорганизации цитоархитектоники и отростков астроцитов в сравнительном аспекте – в слоях I, III и V СМК. Данное диссертационное исследование вносит вклад в изучение тяжелой степени ишемии головного мозга, ее структурной нейропластичности, служит для уточнения прогноза и выработки дополнительных критериев алгоритма оценки постишемического состояния организма.

Предметом планируемого исследования был поиск новых научных знаний о закономерностях реорганизации цитоархитектоники, межнейронных и нейроглиальных взаимоотношений в СМК головного мозга белых крыс при диффузно-очаговых ишемических повреждениях, вызванных необратимой двусторонней ПОСА. Объектом исследования были нейроны, межнейронные синапсы и глиальные клетки.

Цель исследования. Выявить особенности структурно-функциональной реорганизации сенсомоторной коры белых крыс после перевязки общих сонных артерий.

Задачи исследования

1. Изучить цито-, дендро-, синаптоархитектонику и дать сравнительную иммуногистохимическую характеристику нейронов, глиальных клеток и синапсов

слоев I, III и V сенсомоторной коры мозга крыс в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после перевязки общих сонных артерий.

2. С помощью фрактального анализа оценить количественные изменения и особенности пространственной реорганизации отростков астроцитов сенсомоторной коры мозга крыс в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после перевязки общих сонных артерий.

3. Изучить количественные особенности структурных проявлений отека-набухания нервной ткани сенсомоторной коры через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после перевязки общих сонных артерий.

Научная новизна. Получены новые данные о наличии динамики прижизненных дегенеративных изменений нейронов СМК. Образование дегенеративно измененных нейронов и снижение общей численной плотности (ЧП) нейронов происходит на протяжении всего исследуемого периода с сохранением высокой ЧП необратимо поврежденных нейронов через 30 сут после ПОСА. Это свидетельствует о том, что восстановление нейронов после ПОСА происходило на фоне существования вторичных повреждающих факторов и требовало значительно большего времени. Установлен гетерохронный и гетероморфный характер реорганизации нейроглиальных и межнейронных взаимоотношений в разных слоях СМК. Впервые с помощью иммуногистохимических и морфометрических методов установлено наличие статистически значимых сильных корреляционных связей между площадью р38-позитивного материала и выраженностью отека-набухания нейропиля. В большей степени страдал вторичный проекционный комплекс СМК. Реорганизация нейроглиальных и межнейронных взаимоотношений происходила на фоне выраженных проявлений гипергидратации нейропиля.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты данной работы дополняют информацию о морфологии головного мозга экспериментальных животных в норме и после неполной глобальной ишемии. В исследовании получены важные данные для понимания процессов повреждения, компенсации и восстановления, происходящих в сенсомоторной коре головного мозга белых крыс через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий. Количественные данные позволили оценить особенности нейроглиальных взаимоотношений межнейронной коммуникации сенсомоторной коры в ответ на

ишемическое/гипоксическое воздействие. Полученные результаты будут полезны в экспериментальной гистологии, фармакологии, нейрофизиологии и неврологии, могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах гистологии при изучении разделов «Нервная система», «Сосудистая система», «Нервная ткань», на кафедрах физиологии и кафедрах неврологии медицинских вузов.

Методология и методы диссертационного исследования. В соответствии с целью и задачами научно-квалификационной работы стало изучение изменений СМК крыс линии Wistar в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после полной перевязки общих сонных артерий. В работе применен комплексный подход для количественного и качественного исследования нейронов, синапсов и глиальных клеток, для этого мы использовали гистологические, иммуногистохимические и морфометрические методы исследования. В частности, с помощью программы ImageJ 1.53 мы осуществляли количественную оценку нейронов, глиальных клеток, синаптических терминалей СМК мозга крыс в норме и в постишемическом периоде. Пространственную реорганизацию отростков глиальных клеток изучали с помощью фрактального анализа. Все это позволило оценить процессы повреждения и компенсаторно-восстановительной структурно-функциональной реорганизации нейронов, синапсов и глиальных клеток после ишемического воздействия.

Положения, выносимые на защиту

1. В сенсомоторной коре в остром периоде (1–7 сут) после перевязки общих сонных артерий активируются и преобладают деструктивные изменения нейронов и глиальных клеток: появляются сморщенные и несморщенные гиперхромные нейроны, клетки-тени, гипохромные нейроны, нейроны с признаками отека-набухания, разрушением перикариона, усилением фагоцитоза. Происходит деструкция цитоскелета перикариона, дендритного дерева нейронов и глиальных клеток, изменяется количество и форма синаптических терминалей.

2. В подостром периоде (14–30 сут) после перевязки общих сонных артерий, на фоне сохранения проявлений гипер- и дегидратации нервной ткани в сенсомоторной коре, реализуются компенсаторно-восстановительные процессы. Снижается доля темных нейронов, уменьшаются проявления отека-набухания, восстанавливается цитоскелет нейронов, увеличиваются площадь терминалей и

количество мелких ветвей астроцитов. В результате усложняется пространственная организация дендритного дерева и астроцитов.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов объясняется достаточным объемом исследуемых групп и корректным формированием изучаемых выборок, а также применением контрольных групп при проведении эксперимента, использованием способов описательной статистики и критериев анализа в зависимости от типа данных, а также адекватностью математических методов обработки данных поставленным задачам с использованием актуального пакета статистического программного обеспечения.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной гистологии», посвященной 90-летию кафедры гистологии и эмбриологии им. проф. А. Г. Кнорре (Санкт-Петербург, 2022), на 5-м Национальном конгрессе с международным участием «Здоровые дети – будущее страны» (Санкт-Петербург, 2021), на Всероссийской конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях» (Москва, 2021), at the Society for Neuroscience 50 Annual meeting (Chicago, USA, 2021).

Диссертационная работа апробирована на совместном заседании кафедр: гистологии, цитологии и эмбриологии; биологии; анатомии человека; патологической анатомии; судебной медицины, правоведения, – Омского государственного медицинского университета (Омск, 2022).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы Омского государственного медицинского университета по теме: «Изменение нейроглиальной организации сенсомоторной коры белых крыс при перевязке общих сонных артерий», номер государственной регистрации АААА-А19-119012190022-4.

Внедрение результатов исследования. Данные, полученные в результате исследования и сформированные в виде зарегистрированной базы данных «Морфологическая характеристика пирамидных нейронов сенсомоторной коры белых крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий», внедрены в учебный процесс в объеме образовательных программ дисциплин «гистология, эмбриология, цитология», «биология», «патологическая физиология»

кафедр: гистологии, цитологии и эмбриологии, биологии и патофизиологии Омского государственного медицинского университета.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных и 12 статей в научных журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 4 статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования (Scopus).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста и состоит из введения, главы собственных данных, обсуждения результатов, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 241 источником, из которых 161 – в зарубежных изданиях. Полученные результаты иллюстрированы с помощью 1 таблицы и 55 рисунков.

Личный вклад автора. Эксперимент, забор материала, приготовление препаратов, микрофотографирование, морфометрический анализ изображений и статистическая обработка полученных данных производились автором самостоятельно.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе Омского государственного медицинского университета, одобрена этическим комитетом университета (протокол № 123 от 09 октября 2020 года). В качестве экспериментальных животных использовали белых крыс линии Wistar массой 250–300 г. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями Международного комитета по работе с лабораторными животными, принятыми ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей».

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Экспериментальная модель. Неполную глобальную ишемию головного мозга моделировали путём необратимой двусторонней перевязки общей сонной артерии (2-сосудистая модель неполной глобальной ишемии, без гипотонии). Состояние животных в послеоперационном периоде оценивалось в баллах с учётом принципов исследования физиологии и патофизиологии головного мозга (Корпачев В. Г. и др., 1982). Животных наркотизировали введением Zoletil 100 (10 мг/кг, внутримышечно). Поочередно выделяли сосудисто-нервные пучки, препарировали обе общие сонные артерии и поднимали их на лигатуры (без соединительной ткани и сопутствующих пучков нервных волокон), проводили перевязку – на каждую артерию накладывали по 2 лигатуры на расстоянии 2–3 мм друг от друга. Эксперимент проведен на самцах белых крыс линии Wistar (n = 36). Забор материала проводили через 1, 3, 7, 14 и 30 сут (n = 30) после ПОСА. Контролем служили интактные крысы (n = 6). Летальность в эксперименте составила 33,3 %.

Гистологические методы. Вывод животных из эксперимента проводили через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ПОСА под наркозом (Zoletil 100). Сосудистое русло мозга промывали введением 100–125 мл раствора 0,9 % NaCl и Фрагмина (5 000 единиц) в левый желудочек сердца, мозг фиксировали перфузией 30 мл 4 % раствора параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4) через аорту под давлением 90–100 мм рт. ст. в течение 15 мин. Материал хранился в холодильнике при температуре +4 °С.

Головной мозг экспериментальных животных заключали в парафин. Выделяли сенсомоторную область коры головного мозга с использованием стереотаксических атласов мозга крысы. Серийные фронтальные срезы изготавливались толщиной 2–4 мкм через весь мозг на уровне 1.2 – (–3.0) от Брегмы (Рахинос G., Watson C., 2005) и окрашивали гематоксилин-эозином на автоматическом стейнере Sacura, тионином по методу Ниссля. Для иммуногистохимических реакций использовали по 5 срезов на срок. С каждого среза фотографировали 10–15 полей зрения СМК головного мозга крыс. При морфометрическом анализе брали 200 (на срок) случайно выбранных полей зрения.

С помощью светового микроскопа Leica DM 1 000 делались цифровые микрофотографии (tif, 2 048 × 1 536 пикселей) на увеличении × 4, × 10, × 40 и × 100. На препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, выявляли ишемические изменения нейронов в виде резко выраженной эозинофилии их цитоплазмы. На препаратах, окрашенных тионином по методу Ниссля, проводилась оценка состояния нейронов и глиальных клеток (Гулевская Т. С., Моргунов В. А., 2009), также идентификация глиальных клеток (астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов) (Снесарев П. Е., 1946). Общую ЧП пирамидных нейронов, астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов определяли на препаратах, окрашенных тионином по методу Ниссля.

Иммуногистохимические методы. Используя ранее изготовленные парафиновые блоки, на микротоме с системой водного транспорта были сделаны серийные фронтальные срезы СМК толщиной 4 мкм. Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах, помещенных на маркированные предметные стекла Snowcoat X-TRA, цветное поле для маркировки – Snowcoat X-TRA M/Slides (США). Использовали первичные антитела к IBA1 (ionized calcium binding adapter protein 1) – кальций-связывающему белку, специфичному для микроглии (PA5-21274) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 : 100 (ThermoFisher, USA); GFAP (glial fibrillary acidic protein) – глиальному фибриллярному кислому белку астроцитов (MA5-12023, клон ASTRO6) – мышинные моноклональные антитела, разведение 1-2 µg/mL (ThermoFisher, USA); NSE (neuron-specific enolase) – нейрон специфической енолазе (PA5-27452) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 : 100 (ThermoFisher, USA); p38 (synaptophysin) – синаптофизин (E2174) – кроличьи

поликлональные антитела, разведение 1 : 300 (Spring Bioscience, USA). После реакции с первичными антителами срезы инкубировали с соответствующими вторичными антителами, хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол. Для визуализации использовали набор реагентов на основе полимера NovoLink и пероксидазы NovoLink Polymer Detection System (Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии).

В процессе приготовления препаратов использовали: отмывочный раствор Бонд (Bond Wash Solution 10X Concentrate, 1 L), Буфер для демаскировки pH9 (Epitope Retrieval Solution pH 9 (× 10 Conc) 1 L), раствор для разведения антител (Bond Primary Antibody Diluent) (страна происхождения: Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии).

Морфометрический анализ проведен с использованием программы ImageJ 1.53 (Мыщик А. В. и др., 2012; Ferreira T. A., Rasband W., 2010). Согласно литературным данным, в нейроморфологии достаточным количеством экспериментальных животных на срок для получения достоверных результатов является 6–8 животных в группе, 5–6 серийных срезов и 5–10 случайных полей зрения объекта (отдела головного мозга) на каждом срезе (Bolon B. et al., 2005; Ooigawa H. et al., 2006). В настоящем исследовании мы сравнивали по 25 рандомизированных полей зрения на срок.

Фрактальный анализ. Фрактальный анализ использовали для оценки астроцитарных сетей СМК с помощью плагина FracLac 2.5 (Box Counting Sampling Methods) по разработанным ранее подходам (Karperien A., 2013). Маски и контуры GFAP-позитивных тел и отростков на бинарных изображениях представлены как срезы единой объемной сети в плоскости фрактального пространства. Таким образом получена информация о заполнении нервной ткани фрактальной структурой (в частности, ветвящимися отростками астроцитов) и мерой сложности пространственной организации астроцитов. Ранее уже применялось определение фрактальной размерности для глиальных клеток головного мозга (Pirici D. et al., 2009). В настоящем исследовании измерения закономерно показали более высокие значения фрактальной размерности и позволили оценить лакунарность астроцитарной сети СМК.

Статистический анализ. Биометрический анализ осуществлялся с использованием программы Statistica 8.0 и возможностей программы Microsoft Excel.

Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p принимался равным 0,05. Проверка нормальности распределения проводилась с помощью критерия Shapiro – Wilk (Statistica 8.0), статистических гипотез – с помощью непараметрических методов статистики. При получении статистически значимого результата проводили парное сравнение с помощью Mann – Whitney U-test, ANOVA Kraskel – Wallis для независимых выборок и Wilcoxon test для зависимых выборок. Использовались также критерий χ^2 и Фишера. Материал представлен в процентах (95 % доверительный интервал – 95 % ДИ) как медиана (Q2) нижний (Q1) и верхний (Q3) квартили (StatSoft Statistica 8.0; MedCalc 11.6.1.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 1, 3 и 7 сут после двусторонней необратимой ПОСА встречались нейроны с деструктивными изменениями. Отмечено изменение тинкториальных свойств в сторону усиления (гиперхромные нейроны) и уменьшения (гипохромные нейроны) интенсивности окрашивания ядра и цитоплазмы. Встречались нейроны с признаками некробиотических (клетки-тени, гиперхромные сморщенные нейроны), нейроны с признаками отека-набухания и фагоцитоза. Часть нейронов с усилением интенсивности окрашивания не имела признаков грубых деструктивных изменений, перикарион таких нейронов не имел нарушений конфигурации (гиперхромные несморщенные нейроны).

Через 14 и 30 сут после ПОСА выявлялись нейроны с гомогенизацией цитоплазмы и ядра, обнаруживались очаги «выпадения» нейронов и клетки-тени. Встречались гиперхромные сморщенные нейроны, у части нейронов просветление цитоплазмы и перичеселлюлярный отек. Отмечались нейроны с тигролизом, бледно окрашенной цитоплазмой, нечеткими контурами ядра и эксцентричным расположением ядрышка. Максимальное содержание гиперхромных сморщенных нейронов наблюдалось в слое III СМК.

Через 1 и 3 сут после ПОСА на фоне статистически значимого снижения общей ЧП нейронов (Mann – Whitney U-test; $p = 0,0001$) и ЧП нормохромных нейронов ($p = 0,0001$) слоев III и V СМК отмечено увеличение нейронов с патологическими изменениями. Уже с 1 сут встречались нейроны с необратимыми дегенеративными изменениями, отмечено увеличение ЧП гиперхромных сморщенных нейронов, появились клетки-тени. Через 30 сут после ПОСА наблюдался пик уменьшения

нормохромных нейронов, снижение в слое III СМК составило 75,9 %, в слое V СМК мозга крыс – 72,6 %. Происходило накопление нейронов с необратимыми дегенеративными изменениями на фоне статистически значимого снижения общей ЧП нейронов. Нейроглиальные взаимоотношения характеризовались статистически значимым снижением всех глиальных клеток. Что свидетельствует о смещении баланса в сторону образования и накопления необратимо измененных нейронов с прогрессивным истощением резервов саногенетических механизмов.

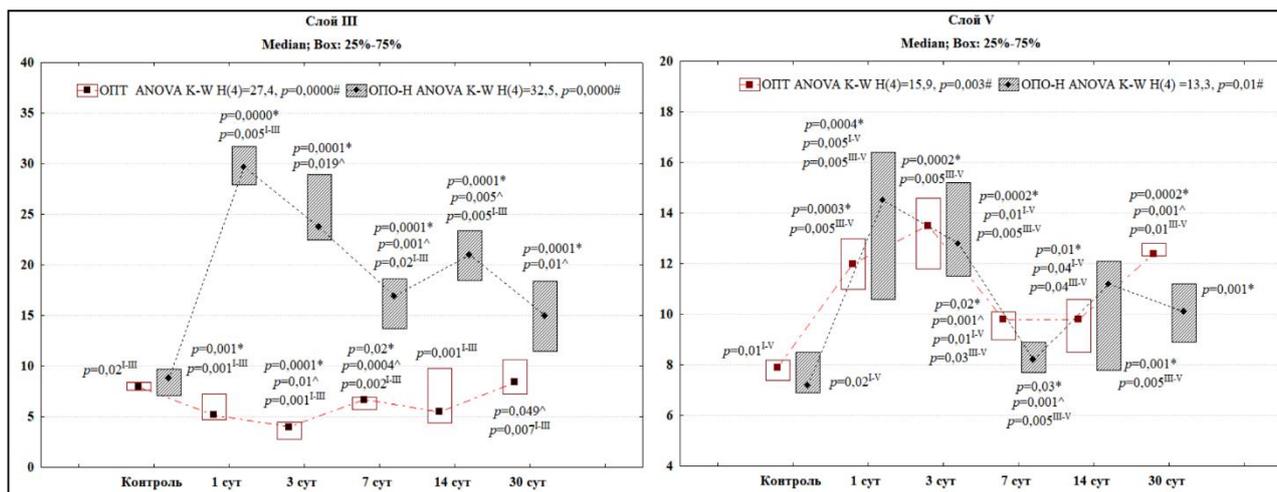
По данным иммуногистохимического типирования IBA1, в слоях III и V СМК происходила активация микроглиоцитов и увеличение их ЧП в слоях III и V СМК в острый период ишемии (1 и 3 сут), нейроглиальные взаимоотношения характеризовались статистически значимым увеличением ЧП микроглиоцитов через 1 и 3 сут после ПОСА, в слое III СМК их ЧП увеличилась на 16,7 % и 5 % соответственно, в слое V СМК – 14,3 % и 11,4 %. Через 7–30 сут с момента начала ишемии отмечено снижение ЧП микроглиальных клеток. Через 7 сут ЧП олигодендроцитов в слое V СМК увеличилась на 2,6 % от контрольных значений. Через 14 сут после ПОСА ЧП астроцитов статистически значимо увеличилась в слое III СМК – на 4,3 %, в слое V СМК – на 2,6 % в сравнении с контролем и достигла максимальных значений за весь период наблюдения. Реорганизация межнейронных отношений СМК происходила с участием всех глиальных клеток – астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов. В слоях III и V СМК мозга крыс уже через 1 сут после ПОСА происходило статистически значимое увеличение нейроглиального индекса. Рост нейроглиального индекса в слоях III и V СМК отмечен через 10–14 сут с достижением максимальных значений через 14 сут после ПОСА. Через 30 сут отмечено статистически значимое снижение нейроглиального индекса по сравнению с предыдущим сроком. Эти изменения свидетельствуют о том, что уже через 1 сут после ПОСА один нейрон получал большую «помощь» от глиальных клеток, чем в контроле. В течение наблюдения происходило изменение функциональной активности нейронов и наблюдалась реактивность глиальных клеток.

При иммуногистохимическом исследовании постишемической компенсаторно-восстановительной реорганизации нервной ткани СМК нами выявлены два основных структурных компартмента, для которых характерны максимальные изменения. Это отростки астроцитов GFAP и зоны, обеспечивающие

межнейронную коммуникацию – терминали (синаптофизин – p38). Эти компартменты локализуются в нейропиле, поэтому именно в нем происходят основные структурные изменения, связанные с приспособлением СМК к новым условиям функционирования при перманентном уменьшении количества нейронов.

После ПОСА во всех слоях СМК общая плотность терминалей статистически значимо уменьшалась уже через 1 сут (в слое III – 46,9 %, V – 46,4 %) и сохранялась примерно на этом уровне в течение всего наблюдения. Уменьшение общей ЧП терминалей после ПОСА сопровождалось статистически значимыми изменениями их размеров и относительной площади. Однако динамика этих изменений была не такая однозначная и различалась по срокам и слоям. В большей степени деструкции подвергались синаптические пузырьки терминалей в нейропиле слоя III СМК. Именно в этом слое выявлены самые низкие значения переменной. В слое V СМК отмечалась явная тенденция, вероятно, адаптивного формирования крупных терминалей, в сравнении с контролем, начиная уже через 1 сут после ПОСА и сохраняясь выше контрольных значений на протяжении всего исследуемого периода (Рисунок 2).

Полученные при иммуногистохимическом исследовании данные можно объяснить ультраструктурными изменениями терминалей: отек-набухание терминалей, деструкция и агглютинация синаптических пузырьков с их смещением и сморщиванием, а также разрушение цитоскелета и митохондрий. В большей степени эти изменения проявлялись в слое III СМК. Мы полагаем, что именно за счет этого в слое III СМК выявлялись небольшие скопления p38-позитивного материала при практически равной их общей ЧП. После двусторонней ПОСА в слоях III и V СМК крыс были выявлены деструктивные и компенсаторно-восстановительные изменения аксональных терминалей. Реорганизация межнейронных взаимоотношений происходила на фоне выраженных проявлений гипергидратации нейропиля. Максимальное разрушение синаптических терминалей отмечалось в слое III СМК, а их адаптивные изменения – в слое V СМК.



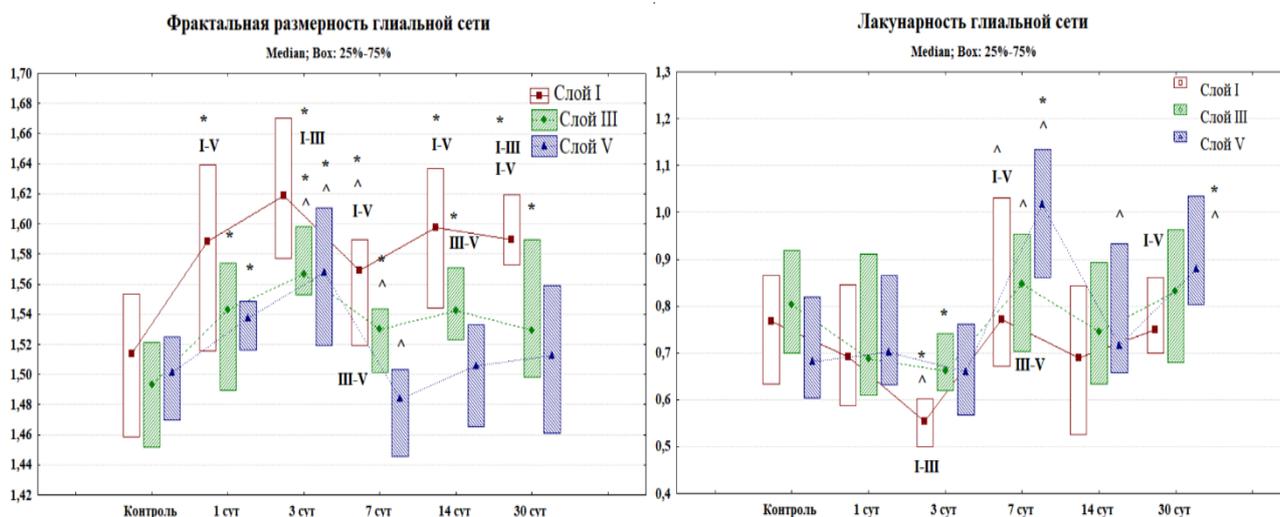
Примечания: * – статистически значимые различия в сравнении с контролем при $p < 0,05$; ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test); I-III, I-V, III-V CMK – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test) при $p \leq 0,02$; # – различия между всеми сроками после ПОСА статистически значимы по результатам однофакторного множественного анализа (ANOVA Kraskel – Wallis). ОПТ – относительная площадь терминалей, ОПО-Н – относительная площадь зон отека-набухания. Материал представлен как медиана и интерквартильный разброс.

Рисунок 2 – Относительная площадь r38-позитивных синаптических терминалей и мелких очагов отека-набухания нейропиля различных слоев CMK мозга крыс в норме и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3)

По результатам иммуногистохимического исследования относительной площади GFAP-позитивного материала установлено увеличение локального содержания маркера GFAP уже через 1 сут после необратимой двусторонней ПОСА. Происходило увеличение содержания реактивно измененных астроцитов с большим числом толстых отростков (гипертрофия отростков) с высокой очаговой плотностью распределения и усложнением фиброархитектоники. Эти изменения затрагивали и протоплазматические, и волокнистые астроциты CMK. Через 3 сут после ПОСА установлено максимальное содержание маркера GFAP во всех исследуемых слоях CMK. В слое III CMK – 20,9, в слое V CMK – 22,2 %. В слое III CMK через 7 сут после ПОСА относительная площадь маркера GFAP уменьшается до 18,6 % и имеет статистически значимое различие с 3 сут (Mann – Whitney U-test; $p = 0,02$). Через 14 сут после ПОСА в слое III CMK показатель относительной плотности хромогена статистически значимо снизился до 15,9 % (Mann – Whitney U-test;

$p = 0,008$), затем через 30 сут после ПОСА произошло его увеличение до 16,85 %. В слое V CMK через 7 сут после ПОСА относительная площадь GFAP статистически значимо снизилась до 16,0 % (Mann – Whitney U-test; $p < 0,001$). Минимальных значений этот показатель в слое V CMK достигал через 30 сут после ПОСА и составил 14,6 %.

По результатам проведения фрактального анализа после ПОСА происходит пространственная реорганизация астроглиальной сети CMK мозга крыс. Вероятными причинами изменений могут быть деструктивные процессы отростков астроцитов вследствие возникшей гипоперфузии головного мозга. Через 1 сут после ПОСА выявлены статистически значимые изменения фрактальной размерности и лакунарности астроглиальной сети CMK. Фрактальная размерность в сравнении с контролем увеличивалась во всех исследуемых слоях CMK (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$) (Рисунок 3).



Примечание: * – различия статистически значимы в сравнении с контролем; ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$); I-III, I-V, III-V – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test; $p < 0,05$). Нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Рисунок 3 – Фрактальная размерность и лакунарность глиальной сети различных слоев CMK в контроле и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3)

Через 3 сут после ПОСА выявлены статистически значимые изменения всех переменных (фрактальной размерности и лакунарности). Происходило статистически

значимое увеличение фрактальной размерности во всех исследуемых слоях одновременно со статистически значимым уменьшением лакунарности в слоях I и III СМК (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$). Данные проявления могут свидетельствовать об увеличении площади GFAP-материала (см. Рисунок 3). Увеличение относительной площади GFAP-материала и увеличение фрактальной размерности астроглиальной сети могут свидетельствовать о гипертрофических процессах, протекающих в отростках астроцитов в ответ на ишемию, и могут быть рассмотрены как компенсаторная реакция астроцитов.

Через 7 сут после ПОСА происходит статистически значимое снижение фрактальной размерности в сравнении с контролем и предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$). Лакунарность достигает максимальных значений в этот период, происходит статистически значимое увеличение этой переменной в сравнении с предыдущим сроком (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$). Это свидетельствует о появлении GFAP-негативных зон. Также имеются статистически значимые различия между слоем III и V (Wilcoxon test; $p < 0,05$). Через 14 и 30 сут после ПОСА происходит статистически значимое увеличение фрактальной размерности и снижение лакунарности астроглиальной сети во всех исследуемых слоях СМК. Происходило постепенное заполнение фрактального пространства отростками астроцитов.

Через 14 и 30 сут после ПОСА происходит статистически значимое увеличение фрактальной размерности и снижение лакунарности астроглиальной сети во всех исследуемых слоях СМК. Происходило постепенное заполнение фрактального пространства отростками астроцитов.

В совокупности найденные изменения необходимо рассматривать как основу для длительной перманентной компенсаторно-восстановительной реорганизации нейронных сетей СМК после необратимой двусторонней ПОСА. Активация астроцитов, микроглиоцитов и олигодендроцитов, формирование крупных синаптических терминалей, увеличение площади реактивных астроцитов могут быть рассмотрены как условия, обеспечивающие реализацию механизмов естественной защиты, адаптации, возможности активации нервных клеток и перестройки нейронных сетей, и необходимы для восстановления функций СМК после необратимой двусторонней ПОСА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении нейронов, межнейронных контактов и глиальных клеток СМК после ПОСА выявлена синхронная реорганизация структурных компонентов нервной ткани СМК в ответ на ишемическое повреждение. В остром периоде (через 1 и 3 сут после ПОСА) ишемии деструктивные изменения нейронов (гиперхромия цитоплазмы и ядра, сморщивание перикариона, тигролиз) приводили к активации микроглиальных клеток и увеличению их ЧП, гиперплазии и гипертрофии отростков астроцитов (увеличение фрактальной размерности отростков астроцитов и уменьшение лакуарности), увеличение GFAP-позитивного материала в астроцитах. Уже через 1 сут появлялся перицеллюлярный отек нейронов, происходящий в результате отека-набухания астроцитов – активация дренажно-детоксикационной системы. На фоне уменьшения общей ЧП нейронов и увеличения ЧП деструктивно-измененных нейронов происходило статистически значимое (Mann – Whitney U-test; $p < 0,05$) уменьшение общей плотности терминалей. Вероятно, в остром периоде ишемии терминали подвергались деструктивным процессам, что влекло за собой уменьшение их количества. Сложным периодом для восстановления нервной ткани явились 7 сут после ПОСА. С одной стороны, происходила активация олигодендроцитов, с другой стороны, в астроцитах преобладали деструктивные процессы (фрактальная размерность уменьшалась по сравнению с предыдущим сроком, лакуарность достигала максимальных значений за весь период наблюдения), снижение относительной площади GFAP-позитивного материала, что свидетельствует о деструкции астроцитов с разрушением их цитоскелета. Количество терминалей оставалось статистически значимо ниже контрольных значений, однако в слое I и V СМК происходило адаптивное формирование крупных терминалей в сравнении с контролем. В отдаленном периоде (через 14 и 30 сут после ПОСА) отмечены компенсаторно-восстановительные процессы нервной ткани: умеренные проявления астроглиоза, увеличение фрактальной размерности в сравнении с предыдущим сроком, уменьшение лакуарности, увеличение относительной площади p38-позитивных терминалей во всех исследуемых слоях СМК, – что свидетельствует об обратимом характере части дегенеративно измененных нейронов. Установлен гетерохронный и гетероморфный

характер изменений в разных слоях СМК после ПОСА. Так, больше всего деструктивным изменениям был подвержен слой III СМК.

Таким образом, нами проведено комплексное исследование структурно-функционального состояния нейронов, глиальных клеток и синапсов СМК головного мозга белых крыс в норме и при неполной глобальной ишемии с помощью гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования. Полученные данные могут быть основой для понимания морфологических изменений в СМК и позволят детализировать процессы при ишемическом повреждении головного мозга.

ВЫВОДЫ

1. Нейроны, глиальные клетки и синаптические терминалы, а также нейроглиальные отношения в сенсомоторной коре головного мозга белых крыс в норме и через 1, 3, 7, 14 и 30 суток после перевязки общих сонных артерий статистически значительно различались.

2. Через 1 и 3 суток после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий нарастали процессы деструкции и гибели нейронов. Отмечена активация микроглиальных клеток с целью саногенетической очистки нервной ткани.

3. Изменение численной плотности глиальных клеток имеет динамический характер. Первыми в условиях гипоксии-ишемии после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий реагируют микроглиальные клетки (1 и 3 суток), затем через 7 суток активируются олигодендроциты и через 14 суток – астроциты.

4. В слое III и V СМК через 1, 3 и 7 суток деструкция синаптических терминалов была связана с их гипергидратационными изменениями. Установлено наличие отрицательных корреляционных связей ($R > 0,70$) между площадью синаптофизина (p38) и выраженностью отека-набухания.

5. Фрактальный анализ иммуногистохимических препаратов (GFAP) показал через 3 суток после перевязки общих сонных артерий очаговую деструкцию отростков астроцитов, в отдаленном периоде (через 14 и 30 суток после ПОСА) происходило восстановление пространственной организации отростков астроцитов, которое имело компенсаторно-восстановительный характер.

6. Подострый период (14–30 суток) сопровождался восстановительной реорганизацией нейронов (гипертрофия) и глиальных клеток, а также усложнением

межнейронных взаимоотношений. Усиливалась экспрессия GFAP и увеличивалось количество клеток-сателлитов.

7. Восстановление межнейронных коммуникаций после перевязки общих сонных артерий сочеталось с уменьшением отека-набухания, снижением содержания темных нейронов, восстановлением цитоскелета нейронов, усилением проявлений реактивного астроглиоза, усложнением организации и увеличением количества синаптических терминалей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сравнительная характеристика структурно-функциональных изменений поля СА3 гиппокампа после острой ишемии и травмы головного мозга белых крыс / А. В. Горбунова, И. П. Кошман, А. Ю. Шоронова [и др., в т. ч. **Л. М. Макарьева**] // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2020. – Т. 9, № 4. – С. 19–30.

2. Гидропическая дистрофия сенсомоторной коры белых крыс в контексте формирования темных нейронов и изменения нейроглиальных взаимоотношений после краткосрочной окклюзии общих сонных артерий / А. В. Горбунова, С. С. Степанов, В. А. Акулинин [и др., в т. ч. **Л. М. Макарьева**] // **Journal of Siberian Medical Sciences.** – 2021. – № 3. – С. 66–81.

3. Отек-набухание как стандартная дозозависимая реакция зубчатой извилины гиппокампальной формации на острую ишемию / Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин, А. В. Горбунова [и др., в т. ч. **Л. М. Макарьева**] // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 15–26.

4. Темные нейроны сенсомоторной коры белых крыс после острой неполной ишемии в аспекте артефактов фиксации и нейроглиальных взаимоотношений / Д. Б. Авдеев, С. С. Степанов, А. В. Горбунова [и др., в т. ч. **Л. М. Макарьева**] // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2021. – Т. 10, № 2. – С. 9–22.

5. Влияние окклюзии общих сонных артерий на двуядерные клеточные образования сенсомоторной коры большого мозга крыс / Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин, С. С. Степанов [и др., в т. ч. **Л. М. Макарьева**] // **Общая реаниматология.** – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 55–71.

6. Проявление отека-набухания сенсомоторной коры большого мозга крыс в зависимости от длительности окклюзии общих сонных артерий (морфометрическое

исследование) / С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин [и др., в т. ч. **Л. М. Макарьева**] // **Общая реаниматология**. – 2021. – Т. 17, № 5. – С. 111–128.

7. Структурно-функциональная реорганизация сенсомоторной коры белых крыс при перевязке общих сонных артерий / **Л. М. Макарьева**, В. А. Акулинин, М. С. Коржук // **Общая реаниматология**. – 2022. – Т. 18, № 5. – С. 32–43.

8. Проявления гипер- и дегидратации нервной ткани полей СА1 и СА3 гиппокампа после непродолжительной окклюзии и пережатия общих сонных артерий / **Л. М. Макарьева**, Д. Б. Авдеев, В. А. Акулинин [и др.] // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 17–27.

9. Морфологическое и морфометрическое описание нейронов сенсомоторной коры головного мозга крыс после перевязки общих сонных артерий / **Л. М. Макарьева**, В. А. Акулинин, С. С. Степанов [и др.] // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2022. – 11 (1). – С. 49–58.

10. Нейроглиальные взаимоотношения и структуры межнейронной коммуникации слоя V сенсомоторной коры белых крыс после перевязки общих сонных артерий / **Л. М. Макарьева**, М. С. Коржук, В. А. Акулинин [и др.] // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2022. – 11 (2). – С. 43–51.

11. Нейро-глиоцитологические реакции неокортекса белых крыс на перевязку общих сонных артерий / **Л. М. Макарьева**, В. А. Акулинин, С. С. Степанов [и др.] // **Цитология**. – 2022. – 64 (3). – С. 285.

12. Сопоставление иммуногистохимического и ультраструктурного изучения реакции аксональных терминалей сенсомоторной коры белых крыс на перевязку общих сонных артерий / С. С. Степанов, **Л. М. Макарьева**, В. А. Акулинин [и др.] // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2022. – 11 (3). – С. 65–74.

13. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620811 Российская Федерация. Морфометрическая характеристика пирамидных нейронов сенсомоторной коры белых крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий: № 2022620728 : заявл. 12.04.2022 : опубл. 15.04.2022 / В. А. Акулинин, **Л. М. Макарьева**, С. С. Степанов, А. Ю. Шоронова, М. С. Коржук; правообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России // Бюллетень «Программы ЭВМ, базы данных и топологии интегративных микросхем». – 2022. – № 4. – 1 с.

14. Морфометрический анализ проявлений отека-набухания гиппокампальной формации после перевязки общих сонных артерий / **Л. М. Макарьева**, В. А. Акулинин, С. С. Степанов [и др.] // Новый день в медицине. – 2021. – Т. 37, № 5. – С. 84–86.

15. Закономерности реорганизации нейроглиальных взаимоотношений в гиппокампальной формации белых крыс после кратковременной окклюзии общих сонных артерий / А. В. Горбунова, Д. Б. Авдеев, С. С. Степанов [и др. в т. ч. **Л. М. Макарьева**] // Forcipe. – 2021. – Т. 4, № 2. – С. 26–34.

16. Структурно-функциональные изменения астроцитов сенсомоторной коры белых крыс после перевязки общих сонных артерий / **Л. М. Макарьева**, С. С. Степанов, В. А. Акулинин // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2022. – № 9. – С. 12–18.

17. Характеристика проявлений отёка-набухания коры головного мозга половозрелых белых крыс после ишемии / Д. Б. Авдеев, С. С. Степанов, В. А. Акулинин [и др., в т. ч. **Л. М. Макарьева**] // Жизнеобеспечение при критических состояниях : сборник 23-й Всероссийской конференции с международным участием. – Москва, 2021. – С. 18–19.

18. Нейроглиальная реакция сенсомоторной коры головного мозга крыс при субтотальной ишемии / **Л. М. Макарьева**, М. С. Коржук, В. А. Акулинин [и др.] // Современные аспекты морфологии, патоморфологии и онкопатологии организма человека : сборник Международной научной и методической конференции. – Курск, 2022. – С. 167–180.

19. Dark neurons of the rat sensorimotor cortex and changes in neuroglial relationships after short time occlusion of the common carotid arteries / A. Gorbunova, S. Stepanov, D. Avdeev [и др., в т. ч. **L. Makaryeva**] // 50 Annual meeting, NEUROSCIENCE, 13–17 November 2021-J-3249-SfN. – Chicago, USA, 2021. – 156.15

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПОСА	– перевязка общих сонных артерий
СМК	– сенсомоторная кора
ЧП	– численная плотность
GFAP	– кислый фибриллярный белок астроцитов
IBA1	– кальций связывающий белок, специфичный для микроглии
p38	– синаптофизин