

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Сергеев Андрей Владимирович

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ТОРМОЗНЫХ И ВОЗБУЖДАЮЩИХ НЕЙРОНОВ КОРЫ
ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ
ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор В.А. Акулинин

Омск – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	10
1.1 Цитоархитектоника коры головного мозга.....	10
1.2 Морфологические проявления и механизмы ишемического повреждения нейронов	22
1.3 Перспективные направления изучения морфологии коры головного мозга человека	28
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1 Дизайн исследования	32
2.2 Объект и предмет исследования	34
2.3 Методы исследования	37
2.3.1 Гистологические методы	37
2.3.2 Иммуногистохимические методы	38
2.3.3 Морфометрические методы	39
2.4 Статистические методы	42
ГЛАВА 3 ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ	45
3.1 Гистологическое исследование аутопсийного материала	45
3.2 Гистологическое исследование биопсийного материала	59
3.3 Тинкториальные свойства нервной ткани	68
3.3.1 Кора головного мозга в норме	68
3.3.2 Кора головного мозга при хронической ишемии	79
3.4 Морфометрическое исследование нейронов коры головного мозга в норме и при хронической ишемии	84
3.5. Морфометрическое исследование нейроглии коры головного мозга в	

орме и при хронической ишемии.....	96
ГЛАВА 4 ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗБУЖДАЮЩИХ И ТОРМОЗНЫХ НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ	101
ГЛАВА 5 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	136
ВЫВОДЫ	150
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	154
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	171

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Кора головного мозга (КГМ) человека обладает очень сложным строением, созревает позднее остальных отделов головного мозга, имеет богатые и многообразные системы связей [36; 119; 153; 159].

Структурно-функциональная организация КГМ в норме и при различных патологических состояниях продолжает интенсивно изучаться [4; 18; 23; 24; 25; 43; 51; 67; 142].

Актуальность сравнительного исследования возбуждающих и тормозных нейронов различных долей КГМ человека при хронической ишемии обусловлена стремлением выявления специфических особенностей структурно-функциональных изменений этих нейронов, а также поиском средств регуляции деструктивных и компенсаторно-восстановительных процессов, лежащих в основе реорганизации нейронных сетей после их повреждения [35; 40; 41; 91; 115; 144].

Анатомическое, гистологическое и цитологическое строение КГМ различных животных и человека в настоящее время хорошо изучено [8; 65; 141; 158] на аутопсийном и, в меньшей степени, на биопсийном материале [2; 3; 15; 84].

В современных исследованиях широко используются методы иммуногистохимической идентификации специфических белков нервной ткани, что в совокупности с морфометрическими методами [2; 3; 15; 88; 123] существенно углубляет наши представления о структурно-функциональной организации возбуждающих и тормозных систем коры головного мозга человека [68; 74; 114].

Основная информация о структурно-функциональной организации КГМ в норме и при различных патологических состояниях получена на аутопсийном материале. Публикаций, посвященных сравнительному гистологическому, морфометрическому и иммуногистохимическому изучению возбуждающих и тормозных систем различных долей и слоев КГМ на интраоперационном материале нет. Также не проводилось сравнительное изучение структурно-функционального

состояния пирамидных и непирамидных нейронов разных долей и слоев коры головного мозга человека при хронической ишемии.

Цель исследования

Выявить структурные особенности реорганизации возбуждающих и тормозных нейронов разных долей и слоев коры головного мозга человека в норме и при хронической ишемии.

Задачи исследования

1. Определить и сравнить общую численную плотность нейронов в различных слоях лобной, теменной, височной и затылочной коры головного мозга человека в норме и при хронической ишемии.
2. Изучить тинкториальные свойства нейронов и нейропиля сравняваемых долей и слоев коры головного мозга человека в норме и при хронической ишемии.
3. Выявить метаболическую активность нейронов коры головного мозга человека в норме и при хронической ишемии с помощью иммуногистохимического исследования нейронспецифической енолазы (NSE).
4. Изучить распределение и содержание синаптофизина в нейропиле и на телах нейронов коры головного мозга человека в норме и при хронической ишемии для оценки межнейронных взаимоотношений.
5. Исследовать распределение и содержание глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в коре головного мозга человека в норме и при хронической ишемии для оценки нейроглиальных взаимоотношений.
6. Изучить распределение и содержание в коре головного мозга человека кальбиндин-позитивных пирамидных и непирамидных нейронов в норме и при хронической ишемии.
7. Изучить распределение и содержание NPY-позитивных тормозных интернейронов в слое III лобной, теменной, височной и затылочной коры головного мозга человека в норме и при хронической ишемии.

Научная новизна

Получены новые данные об общих закономерностях и специфических особенностях изменения возбуждающих и тормозных нейронов коры головного мозга при хронической ишемии в различных слоях лобной, теменной, височной и затылочной долях на операционном материале.

Впервые установлено, что сохранившиеся при хронической ишемии нейроны обладают повышенным, в сравнении с контролем, содержанием NSE, что свидетельствует об их высокой метаболической активности. Активация нейронов сопровождается реорганизацией межнейронных отношений, усиливается тормозное влияние на возбуждающие пирамидные нейроны, преимущественно III и V слоев коры головного мозга, за счет увеличения количества p38-позитивных аксосоматических синаптических комплексов.

Впервые установлено, что при хронической ишемии в лобной, теменной, височной и затылочной долях коры головного мозга человека сохранившиеся пирамидные, и особенно, непиримидные тормозные нейроны имеют повышенную, в сравнении с контролем, экспрессию белка, регулирующего кальциевый обмен – кальбиндин, что снижает риск эксайтотоксического повреждения нейронов.

Впервые с помощью морфометрических и иммуногистохимических методов изучения биопсийного материала установлено, что при хронической ишемии в лобной, теменной, височной и затылочной долях коры головного мозга человека происходит компенсаторная активация тормозных интернейронов. Численная плотность NPY-позитивных нейронов сохраняется на уровне контроля, но относительная площадь их отростков существенно увеличивается.

Впервые выявлена сильная положительная корреляционная зависимость между активацией тормозных интернейронов и астроцитов.

Практическая значимость

Полученные данные в ходе гистологического, иммуногистохимического и морфометрического исследования биопсийного материала, позволят углубить понимание структурно-функциональных изменений возбуждающих и тормозных

нейронов в разных слоях лобной, теменной, височной и затылочной долях коры головного мозга человека при хронической ишемии. Разработанные способы автоматизированного морфометрического изучения формы, размеров и тинкториальных свойств нейронов существенно улучшат качество морфологического исследования и повысят объективность получаемых данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При хронической ишемии головного мозга во всех слоях лобной, теменной, височной и затылочной коры головного мозга человека, по сравнению с контролем, снижается общая численная плотность нейронов.

2. Уменьшение общей численной плотности нейронов в коре головного мозга человека при хронической ишемии сопровождается тинкториальными изменениями и появлением во всех слоях реактивно измененных нейронов, преобладают гиперхромные несморщенные и пикноморфные нейроны.

3. Сохранившиеся при хронической ишемии нейроны обладают повышенным, в сравнении с контролем, содержанием нейронспецифической енолазы, что свидетельствует об их высокой метаболической активности.

4. При хронической ишемии происходит реорганизация межнейронных отношений коры головного мозга человека, усиливается тормозное влияние на возбуждающие пирамидные нейроны преимущественно III и V слоев коры головного мозга, за счет увеличения количества р38-позитивных флуоресцирующих комплексов синаптических терминалей на их соме.

5. Сохранившиеся при хронической ишемии пирамидные и особенно непирамидные тормозные нейроны характеризуются повышенной, в сравнении с контролем, экспрессией кальбиндина.

6. При хронической ишемии численная плотность NPY-позитивных тормозных интернейронов в большей степени в слое III лобной, теменной, височной и затылочной коры головного мозга человека сохраняется на уровне контроля, относительная площадь их отростков в поле зрения существенно увеличивается, что свидетельствует об активации тормозной системы коры.

7. Снижение общей численной плотности нейронов, активация сохранившихся возбуждающих и тормозных нейронов, реорганизация межнейронных отношений в коре головного мозга человека при хронической ишемии сопровождается повышением объемной доли глиальных клеток.

Внедрение и апробация работы

Основные научные данные, теоретические положения, разработанные на их основе, практические рекомендации настоящего исследования внедрены в процесс преподавания на кафедрах гистологии, цитологии и эмбриологии; неврологии и нейрохирургии; анатомии человека; судебной медицины с курсом правоведения Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации при изучении вопросов морфологии и функционирования нервной ткани, органов центральной нервной системы человека в условиях нормы и при диффузно-очаговых ишемических повреждениях.

Основные положения работы доложены на 41-й ежегодной конференции Neuroscience (Вашингтон, округ Колумбия, США, 2011), на 43-й ежегодной конференции Neuroscience (Сан Диего, Калифорния, США, 2013), на Всероссийской конференции с международным участием «Материалы объединенного XII конгресса международной ассоциации морфологов и VII всероссийского научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов» (Тюмень, 2014).

Публикации

Основные положения работы отражены в 9 публикациях, в том числе 4 статьи опубликованы в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов для публикаций материалов диссертации.

Объем и структура диссертации

Диссертация представлена на 186 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 30 таблицами, 70 рисунками. Список литературы содержит 164 источника, в том числе 51 отечественных и 113 зарубежных авторов.

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

ГЛАВА 1 СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Изучение структурно-функционального состояния возбуждающих и тормозных систем коры головного мозга животных и человека является актуальной задачей современной нейроморфологии [4; 8; 91; 115].

В настоящее время для изучения КГМ широко используются методы иммуногистохимической идентификации специфических синаптических, нейрональных и глиальных белков, которые длительно сохраняются в нейронах в аутопсийном материале и после фиксации.

Существуют единичные гистологические (окраска по Ниссля) и электронномикроскопические исследования КГМ, выполненные на биопсийном материале головного мозга человека [35; 41; 61; 73; 125]. При этом очень важные знания о структурной основе (cito- и гистоархитектоники) функционирования и компенсаторно-восстановительной реорганизации КГМ человека после повреждения получены с помощью морфометрического изучения нейронов и синапсов после ишемии, травмы, при опухолях мозга на аутопсийном и биопсийном материале [40; 41; 84; 102].

1.1 Цитоархитектоника коры головного мозга

Роль и место КГМ в формировании и функционировании полноценного головного мозга продолжает широко обсуждаться и уточняться. При этом не меняется главное – постулат о том, что без этого отдела мозга появление и функционирование человека, как высшего млекопитающего, было бы невозможным [38; 39].

Гистологическое и цитологическое строение КГМ различных животных и человека интенсивно исследовалось в прошлом веке [87; 107; 139; 145; 158]. Основные принципы пространственной организации и морфотипов нейронов КГМ хорошо изучены. Даны описание и классификация нейронов КГМ,

основанные на классических (Гольджи, Ниссль, гематоксилин-эозин) гистологических методах исследования [5; 6; 17; 39; 65; 82; 89; 127; 141; 157]

Кора головного мозга (КГМ) представляет собой самое сложное и исторически самое новое многослойное (слои I–VI) экранное образование больших полушарий, имеет богатые и многообразные системы связей. Подразделяется на прецентральную, постцентральную, височную, нижнетеменную, верхнетеменную, височно-теменно-затылочную, затылочную, островковую и лимбическую области [32; 33; 34]

По К. Бродману (1909) выделяется 52 цитоархитектонических поля, по О. Фогту и Ц. Фогту (1920), с учётом волоконного строения, – 150 миелоархитектонических участков, по И. Н. Филимонову и С. А. Саркисову – 47 цитоархитектонических полей. Отнесение того или иного участка КГМ к определённому полю основывалось на гистологическом исследовании (окраска по Нисслю) трупного материала. Нейроны конкретного поля отвечают за определённые функции, в связи с этим все поля подразделяются на первичные, вторичные и третичные. Первичные и вторичные поля (ядерная зона анализатора) получают импульсы непосредственно от таламуса, третичные – только от первичных и вторичных полей. Первичные поля производят специфический анализ импульсов определенной модальности, вторичные – осуществляют взаимодействие различных анализаторных зон, третичные поля играют определяющую роль в сложных видах психической деятельности – символической, речевой, интеллектуальной [5; 7; 17; 20; 32; 33; 34; 63].

Характерной особенностью строения КГМ является ориентированное, горизонтально-вертикальное распределение составляющих её нервных клеток по слоям и колонкам. Пространство между телами и отростками нервных клеток коры заполнено нейроглией и сосудистой сетью (капиллярами).

Нервные клетки принадлежат к различным морфотипам и собраны в определяемые при окраске гематоксилин-эозином и по Нисслю слои I–VI. На фронтальных срезах неопалий у человека делится на шесть слоев (пластин):

- 1) зональная пластина, состоящая из тангенциальных волокон (слой I);

- 2) пластина наружных зерен или малых пирамидальных клеток (слой II);
- 3) пирамидальная пластина или слой средних и больших пирамидальных клеток (слой III);
- 4) пластина внутренних зерен, содержащая покрытые миелином волокна наружной линии Baillarger (слой IV);
- 5) ганглионарная пластина, содержащая в большинстве долей средние/крупные пирамидные нейроны и покрытые миелином волокна внутренней линии Baillarger (слой V);
- 6) мультиформная пластина или слой полиморфных клеток (слой IV).

В свою очередь III, V и IV слои подразделяются на подслои – IIIa, IIIb, IIIc, VIa и VIb [8; 65; 141; 158].

Молекулярный (первый или зональный, слой) состоит из звездообразных мелких клеток осуществляющих местную интеграцию деятельности эфферентных нейронов. Наружный зернистый слой (второй) образован мелкими нейронами различной формы, имеющими синаптические связи с нейронами молекулярного слоя. Слой пирамидных клеток (третий) содержит малые, средние, крупные пирамидные и звездчатые клетки. Внутренний зернистый слой (четвертый) состоит из мелких, разнообразных по форме клеток с преобладанием звездчатых, имеющих дугообразные возвратные аксоны. Звездчатые клетки представляют систему переключений с афферентных на эфферентные пирамидные нейроны III и V слоев. Внутренний зернистый слой является местом окончания основной массы проекционных афферентных волокон. Слой гигантских, пирамидных клеток Беца (пятый слой) состоит преимущественно из крупных пирамидных клеток. Этот слой четко выражен в передней центральной извилине и незначительно – в других участках коры, в основном формирует двигательные проекционные эфферентные волокна. Полиморфный слой (шестой) образован малыми пирамидными, веретенообразными клетками с короткими извитыми верхушечными дендритами, заканчивающимися в IV и V слоях коры. Аксоны многих клеток объединяются в возвратные волокна, проникая в V слой. Нейроны каждого коркового поля имеют свои особенности строения. В передней

центральной извилине (двигательная зона) – гигантские пирамидные клетки, в зрительной и слуховой зонах – зернистые клетки [5; 32; 33; 34].

Например, при изучении лобной доли было установлено, что префронтальная КГМ человека находится впереди от моторной (4-е поле, Бродман) и премоторной зоны (6-е и 8-е поля) и включают в свой состав ряд образований (9, 10, 11, 46-е поля), часть которых расположена на конвекситатной, часть – на медиобазальных поверхностях лобной доли. Префронтальные отделы формируются на поздних этапах филогенеза и только у человека в них появляется ряд новых полей, не имевшихся даже на самых последних этапах эволюции животных. Поэтому эти поля лобных долей мозга считаются «специфически человеческими» отделами коры головного мозга [20; 29; 50].

На ранних стадиях эмбриогенеза лобная кора характеризуется особой радиальной исчерченностью, резко отличающей ее от коры задних отделов мозга и генетически связывающей ее с двигательной корой 4-го и 6-го полей Бродмана. Это подтверждает тот важный факт, что кора лобной доли вместе с моторной и премоторной зоной может быть с полным основанием отнесена к корковым отделам двигательного анализатора [7; 17; 20; 45; 65].

В отличие от 4-го и 6-го полей, префронтальная кора имеет своеобразное строение – в ней отсутствуют гигантские пирамидные клетки Беца, наблюдается значительно более мощное развитие второго и третьего (ассоциативных) слоев. Кроме того, система связей лобной коры с таламусом существенно отличается от таковой двигательного анализатора. Поля префронтальной области (9, 10, 11, 45, 46) имеют связи с образованиями медиального ядра, которые сами не имеют прямой связи с двигательной периферией и относятся к более сложной части ЦНС. Все это заставляет считать, что префронтальные отделы мозговой коры относятся к корковым отделам двигательного анализатора, имеющим вместе с тем гораздо более сложное строение и значительно более сложную систему афферентно-эфферентных связей, чем 4-е и даже 6-е, 8-е поля Бродмана [20].

В этой связи необходимо отметить, что, созревая на самых поздних этапах развития организма, префронтальные отделы коры головного мозга оказываются

наиболее ранимыми и наиболее подверженными инволюции, имеют установленные критические периоды [11; 39; 45]. Корковые поля лобной коры имеют очень богатые связи с полями зрительных и речевых зон, играя существенную роль в переработке и передаче информации на систему двигательного анализатора [7; 29; 38; 39].

КГМ обладает богатыми связями с образованиями ретикулярной формации, гипоталамической области, лимбической системы и гиппокампом, работая с ними в едином функциональном комплексе [20].

Тем не менее, эти работы имеют особую ценность, они позволяют проводить своеобразный мета-анализ и сопоставлять результаты различных способов морфометрии (традиционный визуальный, автоматизированный с помощью программ ImageJ, CellProfiler) первичного изображения и выводов авторских коллективов. В результате снижается вероятность возможных систематических ошибок в последующих исследованиях.

Так в работе W. Y. Ong, L. J. Garey, [125] проведено детальное ультраструктурное исследование различных слоев лобной КГМ (поля 21, 8 и 9 у взрослых, 9 и 44 у новорожденных, по Бродману) и типов клеток (пирамидные, непирамидные, глиальные) с предварительной верификацией клеток на полутонких срезах, окрашенных с помощью классических гистологических методов. Кроме того, представленные в статье микрофотографии позволяют провести собственное измерение размеров клеток и их численной плотности с помощью более совершенных современных способов. Это имеет большое значение, так как от морфометрии в норме зависят конечные результаты и выводы любого сравнительного исследования, а, следовательно, и сопоставление данных, полученных разными авторами.

Имеется аналогичная работа этих же авторов по височной коре головного мозга человека [127], а также исследование, в котором дана сравнительная ультраструктурная и иммуногистохимическая (рецепторы ГАМК) характеристика непирамидных нейронов человека и обезьяны в норме [53]. Изучалось распределение ионо- и матаботропных глутаматовых рецепторов в различных

слоях коры головного мозга [78]. Проведено исследование микрососудов [157] и глиальных клеток (сочетанное иммуногистохимическое и электронномикроскопическое исследование) [111; 126].

На биопсийном материале осуществлено сравнительное ультраструктурное и иммуногистохимическое изучение височной коры головного мозга человека в норме и при шизофрении. Выявлены существенные различия синаптоархитектоники при относительно стабильной организации нейронов и их распределения [125].

Очень важные знания о структурной основе (cito- и гистоархитектоники) функционирования и компенсаторно-восстановительной реорганизации головного мозга человека после повреждения позволяют получать морфометрические исследования нейронных популяций после патологического воздействия (ишемия, травма, опухоль) [84].

По данным W. Y. Ong, L. J. Garey [125], при изучении биопсийного материала на полутонких срезах, на 1 мм^2 фронтального среза зрительной коры выявлялось около 440 пирамидных нейронов. При пересчете на 1 мм^3 слоя III это соответствует примерно 22000–24000 клеткам, что близко результатам исследования аутопсийного материала.

Типичными возбуждающими нейронами являются пирамидные нейроны (малые, средние и крупные), тормозные – непиримидные клетки [5].

Современные нейроморфологические методы исследования коры головного мозга свидетельствуют о том, что не только классические методы (по Ниссю) окраски нервной ткани после смерти пригодны для морфометрического исследования головного мозга человека, но и методы иммуногистохимической идентификации специфических нейрональных и глиальных белков. Суть этих работ сводится к тому, что специфические антигены длительно сохраняются в нейронах после смерти. Так, в мозге, посмертно фиксированном в формалине, практически полностью сохраняются все основные нейрон- и глиоспецифические белки не менее 1 суток, большинство – до 4 месяцев, а некоторые до 10 лет. Максимальное сохранение белков отмечается при сниженной температуре. Это

позволяет накапливать материал, а также использовать ранее забранный, часто уникальный материал.

В настоящее время для верификации нейронов, синапсов, глиальных клеток и сосудов используются различные иммуногистохимические маркеры. Для определения структурно-функционального состояния неокортекса человека и морфометрического исследования его компонентов чаще всего используются реакции на следующие хорошо проверенные специфические белки/маркеры:

- 1) NeuN (белок ядер, маркер нейронов);
- 2) NSE (нейронспецифическая енолаза, маркер нейронов);
- 3) p38 (синаптофизин, маркер синаптических терминалей);
- 4) GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок, маркер астроцитов);
- 5) маркеры тормозных нейронов (соматостатин, кальбиндин, парвальбумин, кальренин, холецистокинин, нейропептид-Y).

Среди всех нейронспецифических белков только NeuN является маркером тела и ядра нейрона. Все остальные известные белки в той или иной степени выявляются в отростках (нейропиле). Иммуногистохимическое исследование белка NeuN показало, что этот белок:

- 1) экспрессируется почти исключительно в нервной системе;
- 2) выявляется на протяжении всего онтогенетического развития мозга;
- 3) является специфическим маркером ядра и тела нейронов, а также проксимальных отростков;
- 4) способен связываться с ДНК нейронов;
- 5) может быть регулятором процесса дифференцирования и функции нейронов.

Поэтому подсчет именно NeuN-позитивных нейронов широко используется, наряду с классической окраской по Ниссию и окраской ядер с помощью DAPI, для проведения морфометрического исследования с целью выявления динамики содержания созревающих и функционирующих нейронов в неповрежденном и ишемически поврежденном головном мозге млекопитающих [2; 62; 77; 97; 103; 110; 112].

Таким образом, по данным литературы, белок NeuN может быть использован для идентификации нейронов КГМ человека, как специфический маркер, и морфометрического изучения закономерностей изменения цитоархитектоники КГМ в постишемическом периоде наряду с другими методами окраски нейронов.

Имеется большое количество экспериментальных работ, в которых показано, что после острой ишемии головного мозга происходит выраженное уменьшение количества NeuN-позитивных нейронов [100; 110; 148]. При этом исход для NeuN-негативных нейронов разными авторами оценивается неоднозначно. Так, в исследовании Isin Unal-Cevik et al. [146], специально посвященному изучению этого вопроса, установлено, что в настоящее время нет убедительных доказательств наличия связи потери иммунореактивности NeuN и необратимой гибели нейрона. Это свидетельствует о том, что при нормализации микроциркуляции ткани мозга, структурной целостности ядра и цитоплазмы часть нейронов со сниженной экспрессией функциональных и регуляторных белков может выйти из патологического состояния.

Данные В. А. Акулинина и др. [2] имеют значение для оценки структурно-функционального состояния нейронов КГМ человека после клинической смерти. Авторами установлено, что после остановки системного кровотока в моторной коре происходит значительное уменьшение иммунореактивности NeuN: в слое III остается 35–42 %, а в слое V – 48–56 % экспрессирующих NeuN нейронов. С учетом того, что среди NeuN-негативных нейронов, по данным литературы [146], не все имеют признаки необратимого изменения, процент содержания способных функционировать нейронов несколько выше.

По данным В. А. Акулинина и др. [2], в моторной коре головного мозга человека в постреанимационном периоде сохраняется значительный резерв способных функционировать нейронов (экспрессия белка NeuN) и NeuN-негативных нейронов без признаков необратимых изменений ядра и цитоплазмы. Особенно много таких нейронов выявляется в слое V. Авторы полагают, что интегрирование этих нейронов в единую пространственную

нейронную сеть на фоне вторичных нарушений микроциркуляции и отека мозга затруднено. В результате этого нарушается интегративно-пусковая функция моторной коры головного мозга и не реализуется репаративный потенциал сохранившихся нейронов.

Нейронспецифическая енолаза (NSE) - гликолитический фермент (2-фосфо-D-глицерат гидролаза), относящийся к семейству енолаз, участвует в предпоследнем этапе гликолиза – катализирует переход 2-фосфо-О-глицериновой кислоты в фосфоенолпируват. Иммуноцитохимическая реакция на NSE является хорошим индикатором активных нейронов в различных областях головного мозга, поскольку усиление метаболической активности клеток сопровождается увеличением количества этого белка в них [98]. При иммуногистохимическом выявлении NSE в головном мозге, положительную реакцию обнаруживают в перикарионах нейронов, аксонах и дендритах.

Наиболее стабильные результаты выявления функционально зрелых синапсов отмечаются при использовании специфических моно- и поликлональных антител к синаптофизину – интегральному белку р38 мембраны синаптических пузырьков [49; 113; 121; 140; 150; 161].

Синаптофизин обеспечивает контакт синаптического пузырька с цитоплазматической мембраной и участие в процессе экзо- и эндоцитоза медиатора при синаптической передаче импульса. В настоящее время р38 входит в панель маркеров, применяемых для оценки нейральной дифференцировки стволовых клеток. Иммуногистохимические методы выявления р38 используются для оценки синаптогенеза [121; 140; 150; 152], а также синаптической плотности в нервной системе в различных модельных нейробиологических экспериментах [27; 46]. С помощью этих методов установлено, что синаптическая плотность в мозге человека изменяется при старении и болезни Дауна [113].

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) член семейства белков цитоскелета, представляет собой основной промежуточный филамент зрелых астроцитов ЦНС, высокоспецифичный белок мозга, который не обнаружен за пределами ЦНС [13]. Этот маркер давно и успешно применяется в практике

иммуногистохимических исследований ЦНС животных и человека в норме и при патологических состояниях и воздействиях [86; 90; 96; 106; 134; 136]. В частности, выявлена выраженная динамика экспрессии GFAP и активация глиогенеза после ишемического воздействия [54; 59; 68; 92; 116; 129; 132].

Большое теоретическое и практическое значение имеет изучение структурно-функционального состояния и цитоархитектоники тормозных клеточных систем КГМ человека после критических состояний, вызванных тотальной ишемией. Это связано с ключевой ролью цепей тормозных интернейронов в интеграции и реабилитации межнейронных взаимоотношений такого сложного отдела головного мозга, как неокортекс [5; 75; 80; 108; 137].

В целом интернейроны составляют от 15 до 30 % от общего числа нейронов коры. В неокортексе млекопитающих тормозные интернейроны представляют собой разнородную популяцию непиримидных клеток, содержащих медиатор ГАМК, комедиаторы и нейропептиды (соматостатин, кальбиндин, парвальбумин, кальренин, холецистокинин, нейропептид-Y) [30; 80; 156].

ГАМК-эргичные тормозные интернейроны коры негомологичны в нейрохимическом отношении – в разных популяциях интернейронов используются разные комедиаторы и нейропептиды. В неокортексе 20–25 % интернейронов экспрессирует парвальбумин, 45–50 % – кальренин и 20–25 % – кальбиндин [80]. В коре головного мозга нейропептид Y содержится преимущественно в тормозных интернейронах и составляет 1–2 % всех ее нейронов. Это позволяет проводить их специфическую идентификацию и морфометрическую оценку с помощью иммуногистохимических методов [16; 80; 114; 156].

Наличие тормозных интернейронов показано во всех без исключения слоях неокортекса, где они являются постоянным компонентом локальных межнейронных цепей. Форма и размеры тела, характер разветвления и длина отростков различных интернейронов существенно отличаются и, вероятно, зависят от функции конкретного нейрона [16; 30; 80].

Интернейроны, экспрессирующие кальбиндин, распределяются во всех слоях неокортекса, но превалируют в супрагранулярных слоях II и III. Большинство этих интернейронов имеют вертикальную ориентацию, чаще (58 %) биполярны и реже (31 %) – мультиполярны. Их аксонные разветвления формируют плотную сеть вокруг тела клетки. Интернейроны, экспрессирующие кальбиндин, представляют гетерогенную популяцию (клетки с «двойным букетом», биполярные клетки, клетки Мартинотти, нейроглиоморфные клетки). Кроме кальбиндина в этих интернейронах выявляется парвальбумин, соматостатин и нейропептид Y [80].

Нейроглиоморфные клетки локализуются во всех слоях неокортекса, наибольший диаметр их тел не превышает 10–15 мкм. От округлого или немного вытянутого тела радиально отходит несколько гладких слабо выраженных редковетвистых дендритов. Основной дендритный ствол, его вторичные и третичные отростки совершенно лишены шипиков. Общая их протяженность составляет 100–150 мкм. Дендритное дерево этих интернейронов целиком располагается в пределах данного слоя [16].

Таким образом, с помощью иммуногистохимического исследования распределения кальбиндин и нейропептид Y позитивных клеток и морфометрического исследования можно судить о состоянии существенной части популяции тормозных интернейронов коры головного мозга человека.

Однако иммуногистохимическое выявление кальбиндина в аутопсийном материале головного мозга человека имеет некоторые ограничения, которые связаны с тем, что уже через 2 часа после смерти при иммерсионной фиксации в некоторых нейронах снижается четкость контуров кальбиндин-позитивного материала. Это зависит от способа фиксации ткани мозга и затрудняет идентификацию нейронов, увеличивая величину систематической ошибки. Тем не менее, полностью иммунореактивность нейронов при этом не исчезает. Кальбиндин-позитивные нейроны длительно сохраняются после смерти мозга, что позволяет проводить морфометрическую оценку цитоархитектоники.

Кроме того, возможности иммуногистохимической морфометрии популяции кальбиндин-позитивных нейронов усиливаются при сочетанном использовании других способов идентификации интернейронов (окраска по Ниссля и Гольджи, иммуногистохимическая окраска на холинацетилтрансферазу и гамма-аминомасляную кислоту, нейропептид Y и DAPI) [16; 156].

По данным литературы, с помощью иммуногистохимического изучения интернейронов существенно улучшились наши представления о структурной организации тормозных систем различных отделов головного мозга млекопитающих и человека в процессе их онтогенетического развития, нормального и патологического функционирования [79].

Так в височной КГМ изучены нейроны экспрессирующие NOS, нейропептиды, кальбиндин и рецепторы глутамата на тормозных нейронах [93]. В первичной визуальной коре определена плотность кальбиндин-позитивных нейронов [130]. Изучена сложная организация молекулярного слоя КГМ [135]. Проведено количественное сравнительное исследование глутамат- и GABA-ергических нейронов префронтальной КГМ человека и обезьяны [74]. Определены особенности организации тормозной системы в височной коре приматов, роль глиогенеза и патологии глиальных клеток при формировании тормозных патологических систем мозга (депрессии) [134]. Описаны закономерности изменения экспрессии кальбиндина и парвальбумина в КГМ человека [68] и животных [76; 99; 149]. Изучена экспрессия маркера интернейронов в дорсолатеральной префронтальной коре человека в процессе фенотипического развития и при шизофрении [85; 101] и при аутизме [57].

Имеются сравнительные морфометрические исследования состояния нейронных популяций тормозных и возбуждающих систем головного мозга человека, в которых показана существенная роль интернейронов в реорганизации межнейронных отношений КГМ после ее повреждения [68; 74; 114].

Установлено, что после различных патологических воздействий на головной мозг экспериментальных животных и человека происходит реорганизация тормозных и возбуждающих нейронных систем неокортекса. Так,

в работе Buritica E. et al. [68] показано, что после черепно-мозговой травмы в зоне ишемической полутени увеличивается количество кальбиндин-позитивных пирамидных нейронов в слое III и непирамидных нейронов в слое IV. В экспериментальных исследованиях выявлено увеличение экспрессии кальбиндина в нейронах после ишемии и деафферентации [69].

Увеличение количества и большая сохранность кальбиндин-позитивных нейронов рассматривается как результат компенсаторной экспрессии белков, регулирующих внутриклеточную концентрацию ионов кальция, играющих ключевую роль в инициации механизмов некроза и апоптоза [68; 76; 80; 85; 114].

Таким образом, в настоящее время КГМ человека хорошо изучена с помощью анатомических, гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования. При этом основная информация о структурно-функциональном состоянии ее компонентов получена при аутопсии. Существенно меньше публикаций посвящено детальному морфологическому изучению различных долей КГМ при конкретных патологических состояниях. Это касается и сравнительного изучения изменений цитоархитектоники возбуждающих и тормозных нейронов КГМ при хронической ишемии.

1.2 Морфологические проявления и механизмы ишемического повреждения нейронов

Согласно доминирующей в настоящее время концепции, центральное место в повреждении нейронов мозга при ишемии принадлежит прогрессирующим нарушениям внутриклеточного кальциевого гомеостаза, глутаматергической сигнальной трансдукции и окислительному стрессу. Вышеназванные механизмы активируются сразу после критического снижения перфузии мозга в очаге первичного повреждения и сохраняются после ишемии вследствие развития вторичных постишемических нарушений микроциркуляции мозга. Вторичные нарушения микроциркуляции, отек-набухание, дисбаланс тормозных и возбуждающих систем, включение отдаленных механизмов апоптоза и

воспалительные процессы значительно расширяют объем первичного повреждения и реорганизации нейронных сетей мозга, приводят к выраженным дополнительным патологическим структурно-функциональным изменениям головного мозга в постишемическом периоде [35; 40; 41].

Установлено, что для вторичного повреждения с пограничным уровнем перфузии характерен высокий риск необратимых изменений нейронов, которые обусловлены лактацидозом, появлением различных свободнорадикальных соединений, монооксида азота, нарушением нуклеинового обмена и синтеза белков, баланса аминокислот, нарушением распределения ионов кальция и эксайтотоксическим действием нейромедиаторов [49; 142; 144].

В основе появления этих патогенетических факторов повреждения мозга после ишемии, несомненно, лежат вторичные нарушения микроциркуляции, дисфункция и недостаточность гематоэнцефалического барьера [49; 142].

Максимально отечные и некробиотические постишемические изменения нейронов и нейропиля проявляются через 1–3 суток (после кратковременной ишемии) и обусловлены вторичными нарушениями микроциркуляции. Острая ишемия активирует механизмы некроза и апоптоза, которые реализуются путем взаимоактивирующего действия свободных радикалов, фосфолипаз и Ca^{2+} -зависимых повреждающих факторов (протеазы, липазы, эндонуклеазы) на все структурные компоненты клеток мозга [144].

Необходимо учитывать, что нейроны коры головного мозга обладают высокой избирательной чувствительностью к ишемии, которая обусловлена:

- 1) энергозатратным функционированием K^{+} –, Na^{+} –, Ca^{2+} –АТФаз;
- 2) блокадой генерации АТФ в условиях прекращения доступа кислорода;
- 3) рефосфорилированием АТФ и АДФ до АМФ с последующим образованием инозина → гипоксантина → мочевой кислоты, развитием дефицита пуриновых мононуклеотидов и усилением продукции опасных супероксидных радикалов (O_2) и перекиси водорода (H_2O_2);

4) наличием в нейрональных мембранах большого количества фосфолипидов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, которые легко окисляются;

5) недостаточной высокой активностью ферментов антиперекисной защиты.

Посредством Ca^{2+} происходит объединение всех патогенетических механизмов в единый повреждающий комплекс, в котором (на этапе полной реализации механизмов) трудно выделить значимость отдельных сопряженных друг с другом реакций, а конечным результатом деятельности которого является гибель клеток мозга в результате некроза и апоптоза с последующей неизбежной активацией компенсаторно-восстановительных процессов, которые так же требуют существенных энергетических затрат [102; 144].

В литературе имеется довольно полная структурно-функциональная характеристика микрососудов, нейронов и синапсов головного мозга экспериментальных животных и человека при ишемии и после нее. Установлена прямая зависимость характера и степени повреждения головного мозга от продолжительности ишемии [70; 102; 142; 144; 160].

Особенности прижизненной реакции возбуждающих и тормозных нейронов коры головного мозга человека на хроническую ишемию изучены недостаточно полно. Прежде всего, это касается использования для получения новых данных биопсийного интраоперационного материала, комплекса иммуногистохимических и морфометрических методов, отражающих на серийных срезах структурно-функциональное состояние основных элементов нервной ткани – нейронов, астроцитов и синапсов. Подобное исследование позволило бы максимально точно сопоставлять и анализировать полученные данные, делать заключения о характере изменения межклеточных взаимоотношений.

Морфологические изменения нейронов при различных формах ишемии в настоящее время хорошо описаны в эксперименте и при анализе аутопсийного материала.

Как правило, при исследовании аутопсийного материала для верификации очагов некротически измененных нейронов при гипоксически-ишемической энцефалопатии авторы использовали следующие гистологические критерии:

- 1) острые – коагуляционный некроз, гиперэозинофилия цитоплазмы и пикноз ядер всех клеточных элементов, гиперэозинофилия аксонов;
- 2) инфильтрация макрофагов и реактивных астроцитов в очаг некроза;
- 3) хронические – образование кист или рубцов с кальцинозом аксонов;
- 4) скопление реактивных астроцитов вокруг белого вещества (нервных волокон) на всех гистопатологических стадиях некроза [153].

В перифокальной ишемической, контузионной зоне (пенумбра) показаны структурные изменения, с помощью которых отростки астроцитов и микроглии разрушают и удаляют некротически измененные нейроны [116].

Ранним признаком гипоксии является появление в дендритах включений различной плотности. Структурные изменения в фокусе ишемии заключаются в неспецифических дистрофических и некротических изменениях нейронов и синапсов, очаговом выпадении клеток, нейронофагии, разрежении нейропиля и глиозе [40].

Гипохромные клетки, отличаются светлой окраской цитоплазмы и из-за уменьшения количества хроматофильного вещества, РНК и белка. Цитоплазма имеет неравномерную окраску, что соответствует различным видам хроматолиза: тотального, очагового, центрального, периферического. Хроматофильное вещество при этом образует глыбки с диффузным околоядерным или периферическим расположением. Ядра в гипохромных нейронах светлые, обычно увеличены в объеме и нередко располагаются эксцентрично. Гиперхромные клетки, наоборот отличаются повышенным содержанием хроматофильного вещества, РНК, белка, что обуславливает их интенсивную окраску. В части клеток наблюдаются очаги хроматолиза. Ядра обычно уменьшены в объеме и четко контурируют. Выраженные изменения по гипо- или гиперхромному типу были отнесены к пограничным изменениям. Пограничные изменения обратимы,

на их основе в дальнейшем могут возникать как альтеративные, так и адаптационные изменения [40].

Пограничные реактивные изменения являются адаптивной реакцией клеток на внешние воздействия и отражают промежуточное между вариантами биологической нормы и патологии состояние нейронов. Основная масса нейронов имеет структурно-функциональную организацию, соответствующую классическому представлению о строении нервной клетки. Такие нейроны называют еще нормохромными. Гипо-, гипер- и нормохромные клетки представляют собой варианты биологической нормы нервных клеток, отражающие их различную функциональную активность [10; 21; 40; 104; 147].

Пикноморфные нейроны и клеточные тени составляют группу деструктивных клеток. Морфологические изменения нейронов, составляющих эту группу, являются патологическими и необратимыми, отражают крайнюю степень дегидратации, имеют веретенообразную форму и небольшие размеры, интенсивно окрашенные отростки, которые извиты и прослеживаются на значительном расстоянии. Цитоплазма таких клеток гомогенизирована, интенсивно окрашена, и в ряде случаев не просматривается граница ядра [10; 44; 64; 104; 105; 154].

Клетки-тени, характеризуются глубоким разряжением цитоплазмы, отсутствием ядра и ядрышка. К клеточным теням относят и фрагменты нейронов, которые невозможно отличить от распавшихся клеток. Все виды изменений встречаются как в контрольных, так и в экспериментальных группах, отличаясь лишь процентным соотношением [10].

При острой ишемии в коре головного мозга экспериментальных животных в ответ на деструкцию нейронов обнаруживается интенсивная реакция зрелых астроцитов и микроглии, которая направлена на защиту сохранившихся реактивно измененных нейронов от перевозбуждения и гибели. К адаптивным структурным модификациям поврежденного нейрона следует отнести коллатеральный рост аксонов [22; 116].

Таким образом, гипоксия и окислительный стресс – главные патогенетические звенья цитотоксичности, которая развертывается в результате

неуправляемого нарастания возбуждающей активности глутаматергических нейронов при ишемии. Выработка свободных радикалов и пероксинитритов в очаге ишемического повреждения неизменно ведет к некрозу и апоптозу нейронов КГМ.

В этой связи большое значение имеют исследования, посвященные изучению роли тормозных систем головного мозга в его протекции при ишемии. Но подобные работы проведены только в эксперименте.

В эксперименте установлено, что при слабом ишемическом воздействии преобладают нормальные нейроны, появляются потемневшие и темные нейроны, но нет пикнотических нейронов. Появление пикноморфных нейронов (крайняя степень дегидратации) связано с воздействием выраженной ишемии [10].

По данным Д. А. Волковой [10] в контроле у крыс нормохромные нейроны в коре составляли $(98,64 \pm 2,4) \%$, потемневшие – $(1,36 \pm 0,3) \%$. При слабом ишемическом воздействии нормохромных нейронов было уже $(82,03 \pm 5,4) \%$, потемневших – $(11,97 \pm 0,7) \%$ и темных – $(5,98 \pm 0,3) \%$. При выраженном ишемическом воздействии соответственно – $(60,88 \pm 4,5) \%$, $(4,1 \pm 0,2) \%$, $(13,56 \pm 0,8) \%$ и появлялись пикноморфные нейроны $(21,45 \% \pm 1,0 \%)$

Протективные механизмы коры при ишемии включают утилизацию глутамата глиальными клетками, индукцию нейрональной формы NO-синтетазы, супероксиддисмутазы, нейротрофинов и антиапоптотических ферментов. На уровне отдельных нейронов и синапсов эти механизмы реализуются через локальную регуляцию гемодинамики, которую опосредуют нейровазальные мессенджеры и нейротрансмиттеры. Баланс нейротоксического и цитопротективного эффектов определяет избирательную устойчивость отдельных хемотипов нейронов к гипоксии и окислительному стрессу, что в перспективе может служить основой для разработки направленной фармакологической коррекции этих нарушений [22].

1.3 Перспективные направления изучения морфологии коры головного мозга человека

Получение объективных данных о структурно-функциональном состоянии нейронов при морфологическом изучении головного мозга человека, как и любого сложного пространственного образования, сопряжено с рядом проблем [47; 48; 91; 115].

Сравнительное морфометрическое изучение нейронных популяций в норме и после патологического воздействия на биопсийном материале, позволяющее получить новые оригинальные, наиболее объективные, знания о структурной основе цито-, гистоархитектоники различных отделов головного мозга, связано с этическими особенностями получения материала для изучения мозга человека [84].

Необходимо отметить, что существуют только единичные морфологические исследования КГМ, выполненные на инцизионном материале нервной ткани неповрежденного головного мозга [61; 73; 125]. Это связано с трудностью получения подобного материала. Инцизионный материал получают в ходе операции, когда удаление части нормальной ткани коры головного мозга входит в структуру операции, например, глубоком расположении опухолей, кист. Изучение прижизненной морфологии мозга человека сопряжено с рядом особенностей и часто недоступно, в результате чего фактические данные для новых гипотез этиологии и патофизиологии неврологических болезней получены в основном на посмертном гистологическом материале [131; 153; 159], несмотря на то, что уже активно используются методы визуализации живых нейронов [164]. Имеются работы, характеризующие состояние головного мозга человека при вегетативных состояниях [155].

Наряду с вышеизложенным, для принятия объективного заключения о характере изменений нейронов требуется несколько гистологических и иммуногистохимических методов, а также проведение соответствующего

морфометрического исследования. Все это существенно увеличивает объем исходной информации и затрудняет анализ необходимой для достижения цели исследования репрезентативной выборки [44].

Проведенный нами поиск литературных данных показал, что основные проблемы получения объективной информации о структурно-функциональном состоянии нейронов коры головного мозга человека связаны с компромиссом между приемлемым уровнем ошибок первого и второго рода при проверке статистических гипотез [9]. Чем больше размеры групп, тем меньше вероятность ошибки второго рода и выше мощность статистических критериев. Зависимость эта как минимум квадратичная, то есть уменьшение объема выборки в два раза приведет к падению мощности минимум в четыре раза. Отсюда стремление к увеличению размера выборок. Кроме того, необходимо учитывать наличие систематических ошибок при проведении измерений и оценке типа клеток, зависящих от уровня подготовки специалиста [9]. Для устранения такого рода субъективных ошибок требуется привлечение других специалистов и расчет индекса соответствия Каппа, что еще больше усложняет исследование и затрудняет принятие объективного решения [42].

По мнению ряда исследователей, решение проблем получения объективной информации при изучении структурно-функционального состояния нейронов коры головного мозга человека лежит в рамках комплексного использования методов автоматизированного компьютерного изучения изображений, морфометрии и иммуногистохимии [2; 44; 48; 123]; Ho S-Y. et al., 2011).

Задача автоматического анализа 2D- и 3D-изображений успешно решается с помощью различных компьютерных программ, специально разработанных для морфологии [52; 56; 58; 60; 109; 122; 124; 142].

Необходима разумная стандартизация и ускорение всех этапов морфологического исследования от взятия материала до конечного заключения с учетом задач конкретного исследования. Наиболее реальным в этом плане является ускорение и увеличение точности морфометрической оценки нейронов, их отростков и синапсов головного мозга с помощью комплексного

использования методов автоматизированного компьютерного изучения изображений, морфометрии, иммуногистохимии и соответствующего дискриминантного статистического анализа. Оптимальным инструментом для решения этих задач является программа ImageJ 1.46, которая обеспечивает быстрое и качественное морфометрическое изучение графических объектов [88].

Имеются работы, в которых данная программа успешно используется для получения объективных данных. Так, в работе S-Y. Ho et al. [123] представлены результаты применения разработанного авторами плагина NeurphologyJ для изучения сложных древовидных образований с большим количеством отростков и их ветвлений – нейронов головного мозга в культуре. Программа успешно справляется с задачей определения численной плотности нейронов, их площади, количества отростков, их длины, точек разветвления и дискриминацией по интенсивности окраски объекта на иммунофлуоресцентных препаратах. Плагин поддерживает пакетную обработку информации, легко интегрируется в имеющуюся среду программного обеспечения анализа научных данных. Эффективность программы авторы продемонстрировали в исследовании, посвященном изучению влияния фармакологических препаратов на структурно-функциональное состояние нейронов в культуре.

Изучение мозга человека с применением подобных подходов компьютерного морфометрического изучения изображений только начинается и требует адаптации имеющегося методического арсенала для конкретных задач исследования. Программа ImageJ 1.46, обладая очень гибкими инструментами и возможностью интеграции в нее множества плагинов, позволяет это сделать [2; 3; 26; 28; 44].

Таким образом, в настоящее время, имеется методологическая и методическая основа для дальнейшего изучения структурно-функционального состояния коры головного мозга человека в норме и при различных патологических состояниях. Широкое внедрение в практику морфологических исследований иммуногистохимических методов и автоматического компьютерного изучения изображений позволяет получить новые объективные

данные о структурно-функциональном состоянии возбуждающих и тормозных нейронов в рамках поставленной в настоящей работе цели.

На биопсийном материале тормозные нейроны и их отростки в зоне ишемической полутени КГМ с помощью подобного точного подхода, основанного на объективных данных, не изучались.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Дизайн исследования представлен на рисунке 1, а детальная характеристика включенных в него методов морфологического исследования в таблице 1.



Рисунок 1 – Схема дизайна исследования

Таблица 1 – Методы морфологического исследования

Название метода исследования	Характеристика метода	Цель метода
Световая микроскопия		
1 Окраска гематоксилин – эозином	Базофильно окрашенные структуры содержат нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) клеточное ядро, рибосомы и РНК-богатые участки цитоплазмы, эозинофильные структуры содержат внутри- и внеклеточные белки	Общая оценка ткани, степени некротических изменений, тинкториальных свойств белков ядра и цитоплазмы
2 Окраска тионином	Составные части клеток интенсивнее удерживают тионин, чем масса волокон, которая дифференцируется быстрее. В результате ярко окрашенный клеточный материал резко выделяется на бесцветном фоне. В окрашивании клеток участвуют как ядерные структуры, так и вещества, находящиеся в цитоплазме нервных клеток	Морфометрическая оценка структурно-функционального состояния основных типов пирамидных и непиримидных нейронов, тинкториальных свойств белков ядра и цитоплазмы
Иммуногистохимические методы		
1 Окраска антителами к нейрон специфической енолазе (NSE) человека	Известная как фосфопируват-дегидрогеназа отвечает за катализ преобразования 2-фосфоглицерат (2-PG) в фосфоенолпируват (PEP), в девятой, предпоследней стадии гликолиза	Оценка морфофункционального состояния всех типов нейронов, степени интенсивности гликолиза
2 Окраска антителами к кальбиндину	Кальбиндин содержится в 25 % всех тормозных ГАМК-ергических интернейронах, комедиатор	Оценка содержания и морфофункционального состояния тормозных нейронов
3 Окраска антителами к NPY	NPY содержится в 1–2 % всех тормозных ГАМК-ергических интернейронах, нейропептид, модулирующее действие	Оценка содержания и морфофункционального состояния тормозных нейронов
4 Окраска антителами к синаптофизину (p38)	Основной белок синаптических везикул (синапсом), p-38, обнаруживается в цитоплазматических пузырьках нейронов, на их цитоплазматической мембране, синапсах	Оценка морфофункционального состояния синапсов
5 Окраска антителами к глиальному фибриллярному кислому белку, GFAP	Белок, специфичный для астроцитов центральной нервной системы, обеспечивает целостность гематоэнцефалического барьера, сохранение формы и структуры, механическую прочность астроцитов, их подвижность, GFAP обеспечивает целостность миелина в ЦНС и межнейронные взаимодействия.	Оценка морфофункционального состояния глиальных клеток.

2.2 Объект и предмет исследования

Работа выполнена на базе Омской государственной медицинской академии. Аутопсийный материал забирался в Омском областном бюро судебно-медицинской экспертизы. Данное исследование одобрено этическим комитетом Омской государственной медицинской академии. Интраоперационный материал получали в отделении нейрохирургии Омской областной клинической больницы. Перед выполнением хирургического вмешательства, с пациентов бралось согласие на оперативное вмешательство в письменном виде.

Объектом исследования была кора головного мозга (КГМ) человека.

Контролем служил мозг погибших в результате несчастных случаев ($n = 5$). Аутопсийный материал забирали спустя 5–10 ч. после смерти из соответствующих интраоперационному материалу полей ЛКГМ, ТКГМ, ВКГМ и ЗКГМ. С каждого поля брали по пять фрагментов коры размером 5x5x5 мм, содержащих все слои КГМ (всего – 250). Далее путем рандомизации (генератор случайных чисел) формировали набор блоков для контрольной группы: из ЛКГМ ($n = 6$; поля 9, 10), ТКГМ ($n = 6$; поля 7, 40), ВКГМ ($n = 9$; поля 20, 21, 22) и ЗКГМ ($n = 9$; поля 1, 19). Таким образом получали репрезентативную выборку ($n = 40$).

Интраоперационный материал, получен в ходе операции по удалению опухолей головного мозга ($n = 53$, возраст пациентов 23–42 года). Фрагменты коры головного мозга входили в структуру удаляемой опухоли. Сразу после изъятия материал фиксировали в 4 % растворе формалина, готовили блоки ткани и заключали в парафин. На срезах, окрашенных гематоксилином/эозином, определяли содержимое материала, отбирали только блоки, содержащие фрагменты КГМ. На этом этапе исследования были отобраны блоки, содержащие все слои КГМ, только от 19 пациентов. В остальных случаях (34 биоптата) интраоперационный материал содержал фрагменты опухолей или тканевой детрит со сгустками крови. В отобранном таким образом материале были фрагменты из лобной (ЛКГМ, поля 9, 10), теменной (ТКГМ, поля 7, 40), височной (ВКГМ, поле 20, 21, 22) и затылочной (ЗКГМ, поля 18, 19) долей КГМ (по

Бродману). В силу глубокого расположения опухолей в удаляемый материал попадали как участки КГМ из перифокальной зоны (хроническая ишемия), так и частично неповрежденная кора. Основную массу составил интраоперационный материал, взятый из теменной и височной доли. После лечения все пациенты были выписаны из стационара в удовлетворительном состоянии.

Таким образом, в ходе 53 оперативных вмешательств на головном мозге удалось взять для морфологического исследования, только материал от 19 пациентов (38 блоков). На основе этого материала формировались две группы фрагментов КГМ – основная (хроническая ишемия, $n = 19$) и группа сравнения (неповрежденная кора, $n = 19$).

Интраоперационный (биопсийный) материал для морфологического изучения в рамках цели настоящего исследования ранее не использовался. Одной из основных причин этого, вероятно, является трудность получения подобного материала в нужном качестве и количестве без последующего ущерба для здоровья пациента. Кроме того, неуклонно улучшается диагностика повреждений головного мозга человека и техника оперативных вмешательств (единственный законный способ получения биопсийного материала).

Из отобранных блоков всех групп изготавливали серийные фронтальные срезы толщиной 4 мкм через все слои КГМ, помещали их на предметные стекла. Первый срез каждой серии (7 последовательных срезов) окрашивали по Нисслю тионином, второй – гаматоксилином и эозином, на третьем и четвертом срезах с помощью меченых антител выявляли распределение тормозных нейронов, содержащих кальбиндин и нейропептид Y, на пятом срезе – нейронспецифическую енолазу (NSE), на шестом – синаптофизин (p38) и на седьмом – глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). Использование серийных срезов позволило точно локализовать объекты исследования. Семь срезов – это 28 мкм, приблизительно один крупный пирамидный нейрон. С каждого блока готовили по 5–7 серий фронтальных срезов (30–42), с каждого среза изучали 10–15 полей зрения (до 300 клеток). При исследовании брали

только часть случайно выбранных полей зрения – по количеству, необходимому для проверки статистических гипотез.

Для решения поставленных задач в настоящей работе было сформировано три группы – основная, сравнения (биопсийный материал) и контрольная (аутопсийный материал). Такая структура исследования позволила проверить основные статистические гипотезы при сравнении показателей количества нейронов (общая численная плотность нейронов – ОЧПН), тинкториальных свойствах (содержание реактивно измененных нейронов с проявлениями гипо-, гиперхромии) и иммуногистохимического исследования (плотность распределения, форма и относительная площадь флюоресцирующих частиц в поле зрения).

Определение ОЧПН на аутопсийном материале в данной работе необходимо было для проверки первой статистической гипотезы – ОЧПН КГМ в контрольной группе выше, чем ОЧПН в группе сравнения (неповрежденная кора). Это необходимо для того, чтобы в последующем подтвердить высокую сохранность нейронов в группе сравнения биопсийного материала, а также провести сопоставление собственных результатов с литературными данными, полученными в основном на аутопсийном материале КГМ человека.

Найденные структурные изменения нейронов в КГМ контрольной группы свидетельствовали о состоявшихся в процессе наступления биологической смерти изменениях тинкториальных свойств белков ядра и цитоплазмы клеток, а также перераспределении воды между нейронами и отростками астроцитов. Следовательно, для сравнительной оценки структурно-функционального состояния нейронов данный материал не был пригоден. Однако этот материал мог быть использован для определения общей численной плотности нейронов (ОЧПН) и белкового иммуногистохимического профиля (есть/нет метка на конкретный белок).

2.3 Методы исследования

2.3.1 Гистологические методы

Интраоперационный и контрольный материал сразу после получения фиксировался в 4 % растворе формалина в 0,1М фосфатном буфере при pH 7,2-7,4 и хранили в холодильнике при температуре +4 °С. Через сутки раствор полностью заменялся. Раствор изготавливался в лаборатории кафедры гистологии Омской государственной медицинской академии следующим способом: 13,6 г KH_2PO_4 растворялись в 986,4 г дистиллированной воды, 35,8 г Na_2HPO_4 растворялись в 964,2 г дистиллированной воды; 0,28 л первого и 0,72 л второго раствора смешивались, к ним добавлялось 43,9 г параформа. Полученный раствор выдерживался в термостате при +75 °С до полного растворения параформа.

Весь материал заключался в парафин. Затем, после формирования групп, изготавливались серийные фронтальные срезы толщиной 4 мкм через все слои КГМ. Срезы помещали на предметные стекла, окрашивали гематоксилин-эозином на автоматическом стейнере Sakura, тионином по Нисслю.

С помощью микроскопа Leica DM 1000 делались цифровые микрофотографии размером изображения 2048x1536 пикселей всех слоёв КГМ на различных увеличениях. Собственная оптика цифровой камеры давала увеличение в 10 раз и объективы в 4, 10, 20, 40 и 100 раз. При общем увеличении в сто раз реальная площадь снимка составила 936x702 ($657072 \mu^2$), при x400 – 235x176 ($41360 \mu^2$) и при x1000 – 94x70 ($6580 \mu^2$).

На полученных микрофотографиях проводили общую и морфометрическую оценку структурно-функционального состояния основных типов пирамидных и непирамидных нейронов на уровне всех слоев КГМ. Морфометрическое исследование заключалось в выявлении общей численной плотности нейронов, их площади, а также содержания реактивно, дистрофически и некробиотически изменённых клеток [2; 3].

2.3.2 Иммуногистохимические методы

Для иммуногистохимического исследования использовались стандартные антитела к NSE, GFAP, p38. Тормозные (непирамидные) нейроны дополнительно изучали с помощью окраски на кальбиндин и NPY.

Фронтальные срезы КГМ толщиной 4 мкм помещались на маркированные предметные стёкла Thermo Scientific Polysine®, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Germany. Стекла со срезами были тщательно отмыты от парафина ксилолом, помещены в 10 mM цитратный буфер (pH 6,0) и инкубированы 10 минут при температуре +90 °C, затем оставлены для охлаждения при комнатной температуре на 20 минут. После охлаждения стекла были промыты 0,05 % фосфатным буфером дважды, затем нанесены первичные антитела. Все вещества были раскапаны микропипеткой в объеме 30 мкл.

Использовались первичные кроличьи поликлональные антитела (ImG): к нейронспецифической енолазе, neuron-specific enolase, NSE, (Rabbit Anti-Human NSE Polyclonal Antibody; Spring Bioscience, Pleasanton, USA, № E3304), разведение 1:300; к синаптофизину, synaptophysin, p-38, (Rabbit Anti-Human Synaptophysin Polyclonal Antibody; Spring Bioscience, Pleasanton, USA, № E2174), разведение 1:300 и к глиальному фибриллярному кислому белку, glial fibrillary acidic protein, GFAP, (Rabbit Anti- Human Polyclonal Antibody; Spring Bioscience, Pleasanton, USA, № E18324), разведение 1:200. Для иммуофлуоресцентного исследования тормозных интернейронов применяли первичные кроличьи поликлональные антитела: к кальбиндину (Calbindin D_{28k}; SWant, Swissantibodies, Switzerland), разведение 1:400 и нейропептиду Y (Neuropeptide Y, NPY; Sigma Chemicals, St.Louis, USA), разведение 1:800.

Антитела к синаптофизину инкубировались 10 минут, а к NSE – 30 минут на качающейся поверхности при комнатной температуре, потом стекла были промыты 0,05 % фосфатным буфером дважды.

Визуализация иммунной реакции для всех вышеуказанных антител проводилась с использованием козлиных поликлональных вторичных антител к

иммуноглобулину кролика, (Goat polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG - H&L (TR) № ab6719; Abcam, Cambridge, England), разведение 1:200. Антитела ассоциированы с флюоресцентным красителем Texas Red® Sulfonyl Chloride (молекулярный вес 625 дальтон). Данное вещество имеет длину волны поглощения 596 nm и длину волны испускания 620 nm, свечение выглядит красным. Вторичные антитела были экспонированы 20 минут на качающейся поверхности при комнатной температуре, затем слайды были промыты 0,05 % фосфатным буфером дважды.

На микроскопе Axioskop 40, Karl Zeiss, оснащенном ртутной лампой HBO 100, камерой на CCD датчике – Axio CamMRc и объективом EC Plan-Neofluar x40, апертура 0,9, делались цифровые микрофотографии размером изображения 1300x1030 пикселей, реальным размером 220x174 мкм (38280 мкм²).

Морфометрическое изучение изображений проводили с помощью программы ImageJ 1.46. На иммуногистохимических препаратах определяли площадь (мкм²) и количество флуоресцирующих гранул маркера в поле зрения (38280 мкм²) препарата.

2.3.3 Морфометрические методы

Программа ImageJ обеспечивает быстрое и качественное морфометрическое исследование и позволяет отображать, редактировать, анализировать, обрабатывать, сохранять и печатать 8-, 16-, и 32-битные изображения, в том числе и фирменных форматов Zeiss и Leica. В ImageJ можно вычислять площади, статистические показатели пиксельных значений различных областей интереса на изображениях, которые выделены вручную или при помощи пороговых функций, измерять расстояния и углы. Кроме того, в программе можно осуществлять построение гистограмм распределения пикселей в диапазонах 0–255 оттенков серого, красного, синего и зеленого цвета [2; 3]. Поэтому именно программа ImageJ (версия 1.46) была выбрана для решения поставленных в работе задач.

Общий алгоритм работы с ImageJ заключался в следующем. Открывался файл, определялась область интереса (в случае попадания на одну микрофотографию нескольких слоев неокортекса), устанавливались пороговые значения цвета, яркости, контрастности, количественного распределения пикселей по цвету и яркости. Эти действия выделяли объекты для исследования по тинкториальным свойствам и позволяли выделить только ядра или только цитоплазму, или только межклеточное вещество. После выделения объектов, имеющих заданную окраску, запускался апплет (несамостоятельный компонент программного обеспечения) «анализ частиц». Он разделял объекты, которые будут анализированы, по следующим параметрам: размер (позволял исключить, например, артефакты имеющие площадь менее $1\mu^2$), циркулярность (при высокой степени считались только овальные ядра, при низкой – только круглые ядра, характерные для нормально функционирующих нейронов). Для визуального контроля указывалась необходимость наложения оверлейной маски полученных данных на исходное изображение. После выполнения апплета формировалась таблица, которая содержала: имя графического файла, количество объектов; площадь, периметр, длину, ширину каждой частицы; общую площадь поля, на котором производился подсчет. При установке шкалы (отношения пиксел/ μ) все данные отражались в μ . При однотипных изображениях последовательность действий записывалась в макрос и они обрабатывались пакетом [2; 3]. Полученные данные помещались в электронную таблицу, которая легко импортировалась в другие приложения (Statistica, Excel).

ImageJ использовалась 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, распределения синаптофизина, енолазы, кальбиндина, нейропептида Y и глиального фибриллярного кислого белка.

Дискриминацию нейронов и нейропиля, изучение тинкториальных свойств структур КГМ проводили с использованием гистограмм распределения пикселей

на цифровых цветных изображениях. Для построения гистограмм использовали 8-битные цветные изображения аутопсийного и биопсийного материала. Применялся палитровый (индексированный) формат изображения. В этом случае из широкого цветового пространства выбираются любые 256 цветов, соответствующие конкретному изображению, их значения R (красный), G (зеленый) и B (синий) хранятся в специальной таблице — палитре. В каждом из пикселей изображения хранится номер цвета в палитре — от 0 до 255. В Photoshop 8.0 устанавливали режим — индексированные цвета, уровни — опции — расширить монохроматический контраст. Стандартно использовали изображения размером 3145728 пикселей, рабочее поле для построения гистограммы слоя коры — 1392644 пикселей.

Кроме того, по гистограммам (форма, величина моды) сравнивались различные участки КГМ для характеристики тинкрониальных свойств ее структур (ядра, цитоплазма клеток, нейропилль). Изучались изображения, полученные исходно в формате png (RGB цвет — 24-бит) размер изображения 54,2 на 49,7 см ($2048 \times 1536 = 3145728$ пикселей), разрешение 96 пикселей на дюйм. В процессе исследования, в зависимости от конкретных задач, 24-битные изображения трансформировались в 8-битные цветные (палитровый, градиент оттенков 0–255), 8-битные черно-белые (градации серого 0–255) и 2-битные (черно-белые маски) изображения.

Гистограммы могут быть использованы для морфометрического исследования (по количеству пикселей), при определении тинкториальных свойств фиксированных белков нейронов и их отростков (в составе нейропиля), а также — для оценки степени отека-набухания нервной ткани. Последнее имеет очень большое практическое значение, так как позволяет по оттенкам цвета очень точно определить пространство, занимаемое свободной водой в нервной ткани на момент ее фиксации в формалине. При этом определяются не только большие перичеселлюлярные пространства, но и очень мелкие полости в нейропиле — дендриты, гидропически измененные синапсы.

2.4 Статистические методы

Для решения поставленных задач в настоящей работе было сформировано три группы. Группа сравнения – участки коры на отдалении от патологического очага, по своей структуре и характеристикам относящаяся к норме (интраоперационный материал). Контрольная группа (аутопсийный материал) – кора мозга человека, полученная от умерших. Основная группа, включающая отделы коры головного мозга с ишемическими изменениями (интраоперационный материал). Именно такая структура позволила проверить основные нулевые и альтернативные статистические гипотезы при сравнении показателя общей численной плотности нейронов (ОЧПН).

Первая гипотеза: ОЧПН КГМ в контрольной группе выше, чем ОЧПН в группе сравнения (неповрежденная кора).

Вторая гипотеза: ОЧПН в основной группе не отличается от ОЧПН в группе сравнения.

Третья гипотеза: не существует особенностей изменения ОЧПН при хронической ишемии в различных долях и слоях КГМ.

Четвертая гипотеза: количественные показатели, отражающие тинкториальные свойства нервной ткани КГМ аутопсийного (группа контроля) и биопсийного материала (основная группа и группа сравнения) статистически значимо не отличаются.

Пятая гипотеза: количество и относительная площадь NSE-, p38-, кальбиндин-, NPY- GFAP-позитивных структур в различных долях и слоях КГМ основной группы и группы сравнения статистически значимо не отличаются.

Проверка этих нулевых статистических гипотез осуществлялась на основании данных морфометрического исследования и сравнения гистограмм распределения цветных пикселей. Использовались программы MedCalc[©] (www.medcalc.be) и StatSoft Statistica 8.0. На первом этапе определяли основные статистические показатели и характер распределения сравниваемых вариационных рядов. Так как, в ряде сравнений, не соблюдались основные

условия для использования параметрической статистики, проверку статистических гипотез проводили при помощи непараметрических критериев Колмогорова-Смирнова и U-критерия Манна-Уитни для парного сравнения, ANOVA (однофакторный дисперсионный анализ) Фридмана и Краскела-Уоллиса для множественного сравнения [14; 19; 31; 37]. Результаты парного сравнения представлены как медиана (нижний, верхний квартили).

Для статистической обработки полученных гистограмм использовали показатели минимальных, максимальных значений и моду (наиболее часто встречающееся значение пикселей от 0 до 255).

Чувствительность и специфичность использованных нами методов дискриминации нейронов и нейропиля по гистограммам, отражающим тинкториальные особенности ткани, определяли с помощью построения ROC, расчета AUC (площадь под кривой) и порогов отсечения. ROC-анализ использовался как классификатор для определения диагностических возможностей конкретного метода дискриминации. Кривая ошибок или ROC-кривая – графическая характеристика качества бинарного классификатора, зависимость доли верных положительных классификаций от доли ложных положительных классификаций при варьировании порога решающего правила. То есть, ROC-кривая отображала зависимость между чувствительностью и специфичностью метода получения объективных данных. Площадь под ROC-кривой AUC (Area Under Curve) является агрегированной характеристикой качества классификации, не зависящей от соотношения цен ошибок. Чем больше значение AUC, тем «лучше» модель классификации. Данный показатель часто используется для сравнения нескольких моделей классификации [95].

В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$, что является достаточным для медико-биологических исследований [1; 12; 14; 19; 31; 37].

Изготовление срезов, окраска всеми методами, использовавшимися в работе, микрофотографирование, изучение изображений производились автором самостоятельно.

Я выражаю благодарность сотрудникам кафедры гистологии Омской государственной медицинской академии д.м.н., проф. В. А. Акулинину, д.м.н. С. С. Степанову, к.м.н. А. В. Мыцику за огромную творческую помощь при проведении данного исследования и обсуждении результатов работы; заместителю начальника по экспертной работе, к.м.н. А. А. Сиротину (Омское областное бюро судебно-медицинской экспертизы) за помощь в заборе материала. Автор также искренне благодарит С. Б. Глатко (Областной онкологический диспансер г. Омска) за предоставленное оборудование, возможность проведения исследования.

ГЛАВА 3 ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ

3.1 Гистологическое исследование аутопсийного материала

Кора головного мозга (КГМ) человека при окраске гематоксилин-эозином представлена большим количеством клеточных элементов и нервных волокон, которые имели радиальное и тангенциальное направление (рисунки 2–5).

Таблица 2 – Ширина различных слоев коры головного мозга человека в норме (аутопсийный материал, окраска гематоксилин-эозином), $Me (Ql-Qh)$

Слои	Доли коры головного мозга				ANOVA K-У, df = 3
	ЛКГМ, мкм	ТКГМ, мкм	ВКГМ, мкм	ЗКГМ, мкм	
I	209 (154–225)	227 (176–236)	134 (128–196)	152 (124–163)	$p > 0,05$
II	188 (161–215)	152 (128–176)	132 (112–151)^	189 (158–212)	$p < 0,05^*$
III	659 (532–643)	685 (521–765)	395 (315–435)^	698 (587–712)	$p < 0,05^*$
IV	172 (142–200)	184 (152–211)	132 (112–146)^	214 (178–343)	$p < 0,05^*$
V	191 (170–218)	275 (224–312)	307 (238–366)^	225 (178–260)	$p < 0,05^*$
VI	465 (386–444)	422 (347–512)	540 (493–612)^	420 (380–486)	$p < 0,05^*$
Всего	1884 (1785–2156)	1945 (1802–2143)	1640 (1620–1980)	1898 (1790–2104)	$p > 0,05$
* Различия между отделами (множественное сравнение ANOVA) статистически значимы.					
^ Различия в сравнении с другими отделами статистически значимы (критерий Манна-Уитни).					

По данным обзорного гистологического исследования было установлено, что лобная доля (ЛКГМ, поле 10) характеризовалась широкой корой, выраженностью II и IV слоев, широкими III и V слоями, разделенными на подслои (рисунок 1). Теменная доля (ТКГМ, поле 7) характеризовалась широкой

корой, крупными клетками в III и V слоях, хорошо видимыми II и IV слоями, радиальной исчерченностью, проходящей через все слои (рисунок 2). Височная доля (ВКГМ, поле 21) характеризовалась широким VI слоем (рисунок 3). Затылочная доля (ЛКГМ, поле 19) характеризовалась густоклеточностью, широким слоем IV, просветленным V слоем, нечетким разделением II и III слоев, радиальной исчерченностью, как и ТКГМ, проходящей через все слои (рисунок 4, таблица 2).

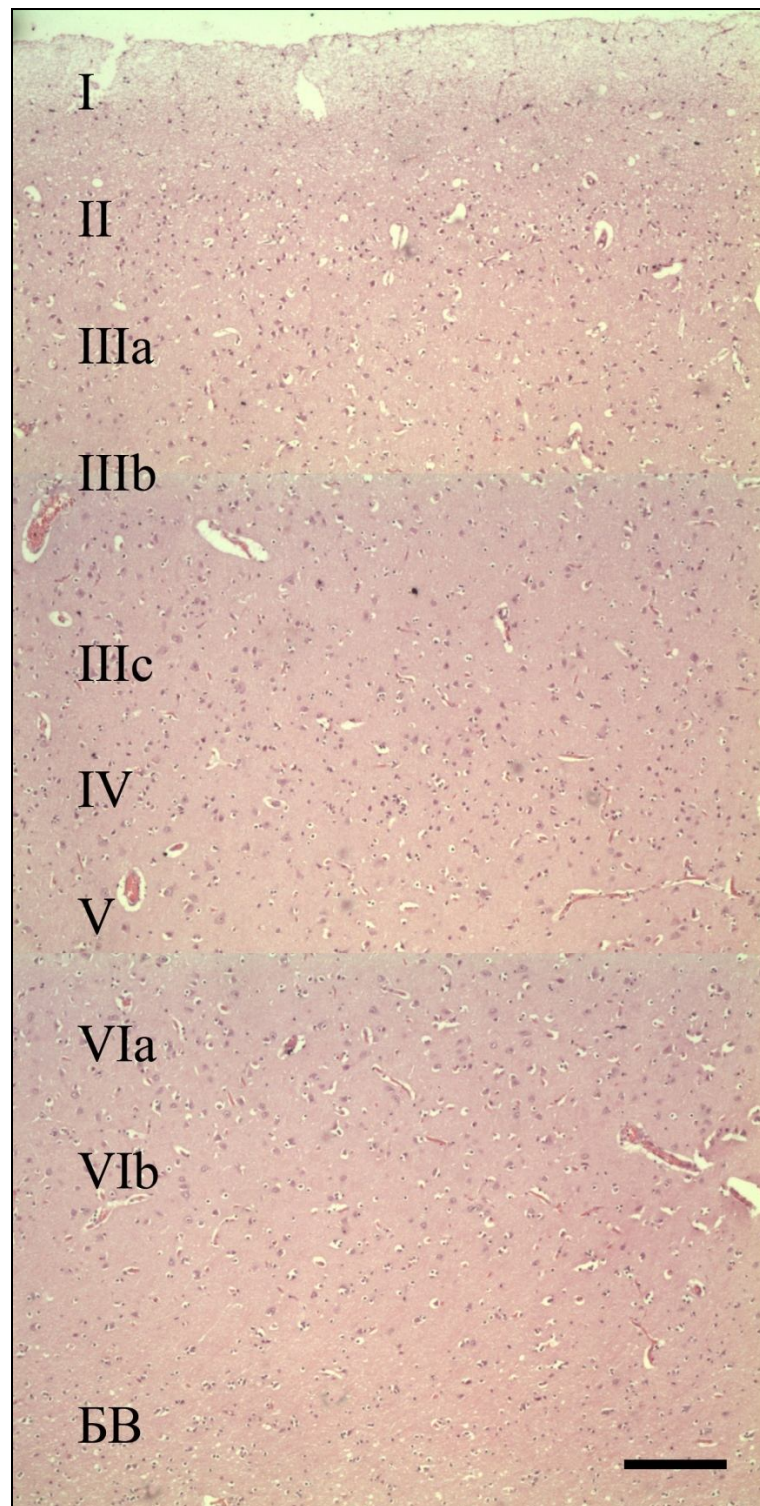


Рисунок 2 – Фронтальный срез всех слоев лобной коры (поле 10, париетальный тип) головного мозга, группа контроля. БВ – белое вещество, I – молекулярный, II – наружный зернистый, IIIa, IIIb, IIIc – наружный пирамидный, IV – внутренний зернистый, V – внутренний пирамидный, VI – полиморфный слои коры. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x40. Шкала – 100 мкм

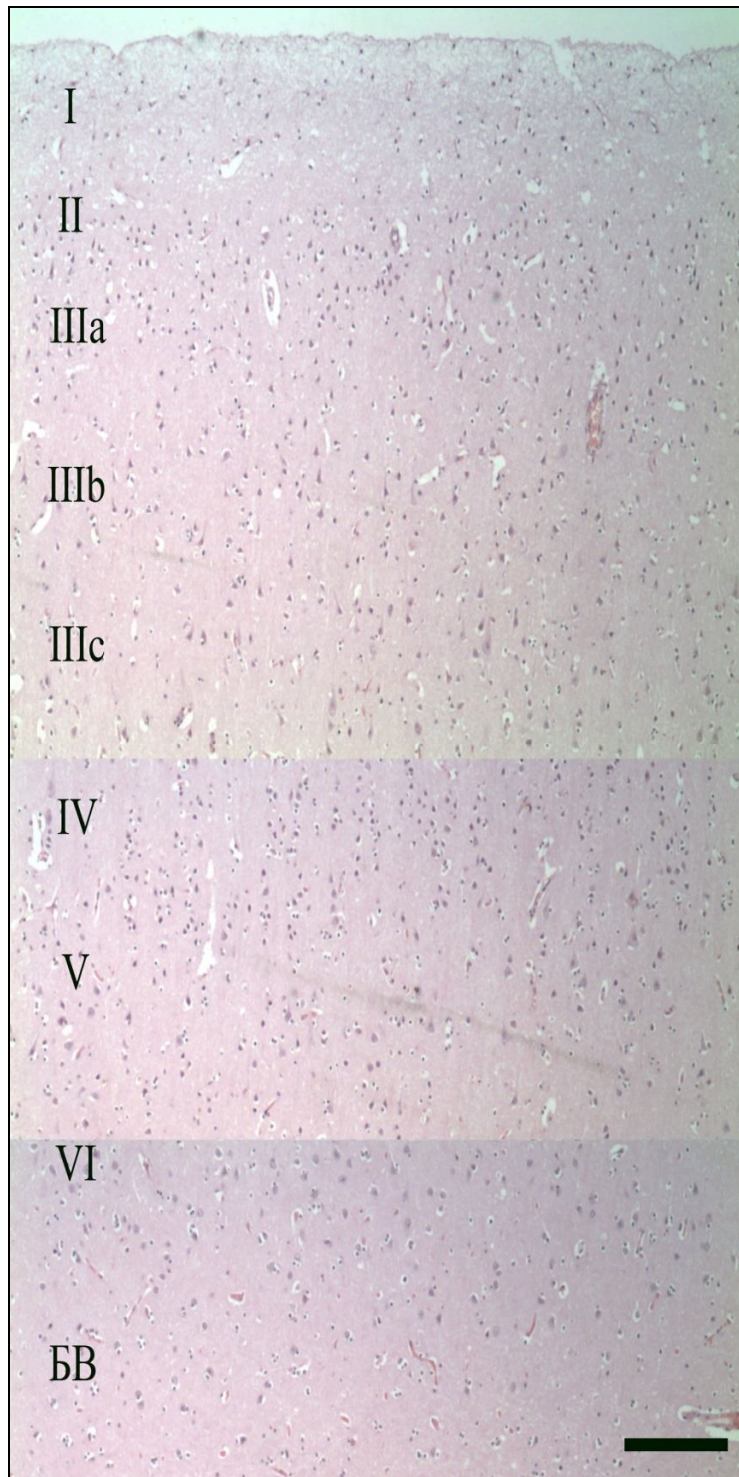


Рисунок 3 – Фронтальный срез всех слоев теменной коры (поле 7, фронтальный тип) головного мозга, группа контроля. БВ – белое вещество, I – молекулярный, II – наружный зернистый, IIIa, IIIb, IIIc – наружный пирамидный, IV – внутренний зернистый, V – внутренний пирамидный, VI – полиморфный слои коры. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x40. Шкала – 100 мкм

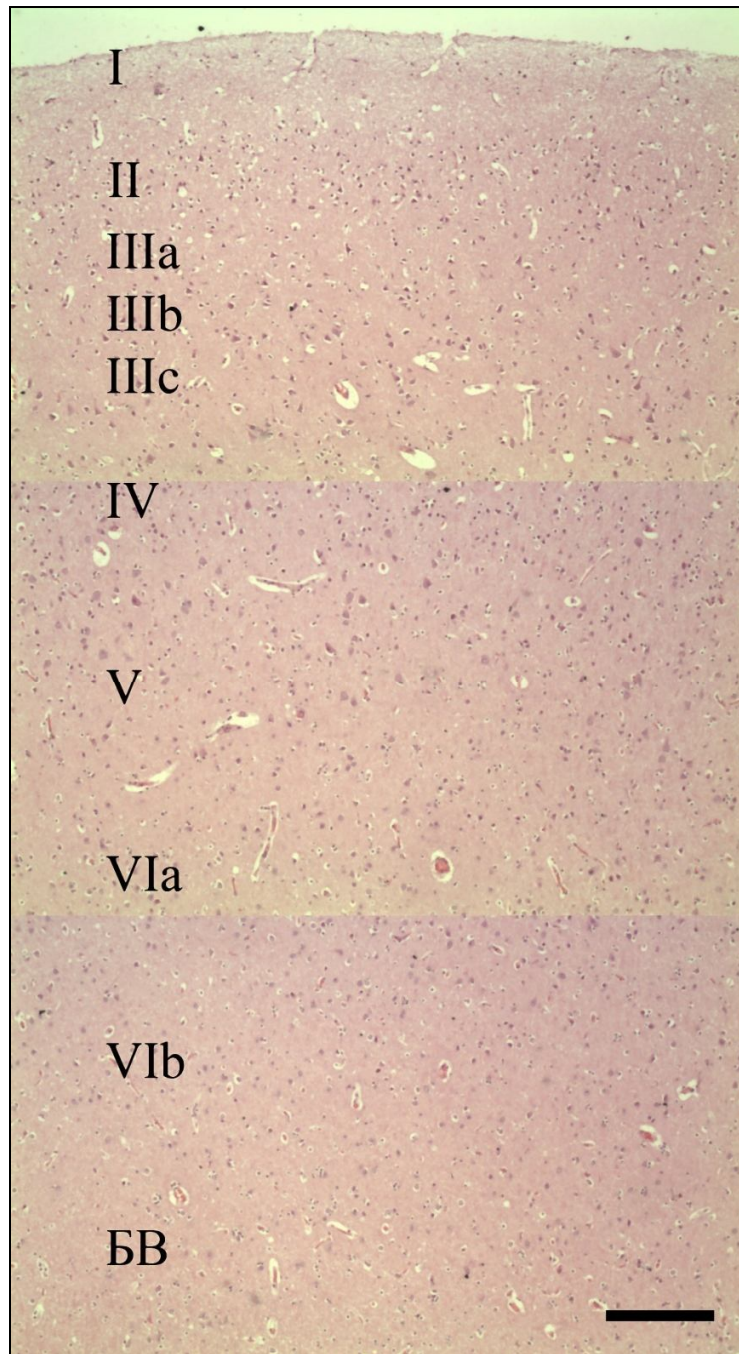


Рисунок 4 – Фронтальный срез всех слоев височной коры (поле 21, фронтальный тип) головного мозга, группа контроля. БВ – белое вещество, I – молекулярный, II – наружный зернистый, IIIa, IIIb, IIIc – наружный пирамидный, IV – внутренний зернистый, V – внутренний пирамидный, VI – полиморфный слои коры. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x40. Шкала – 100 мкм

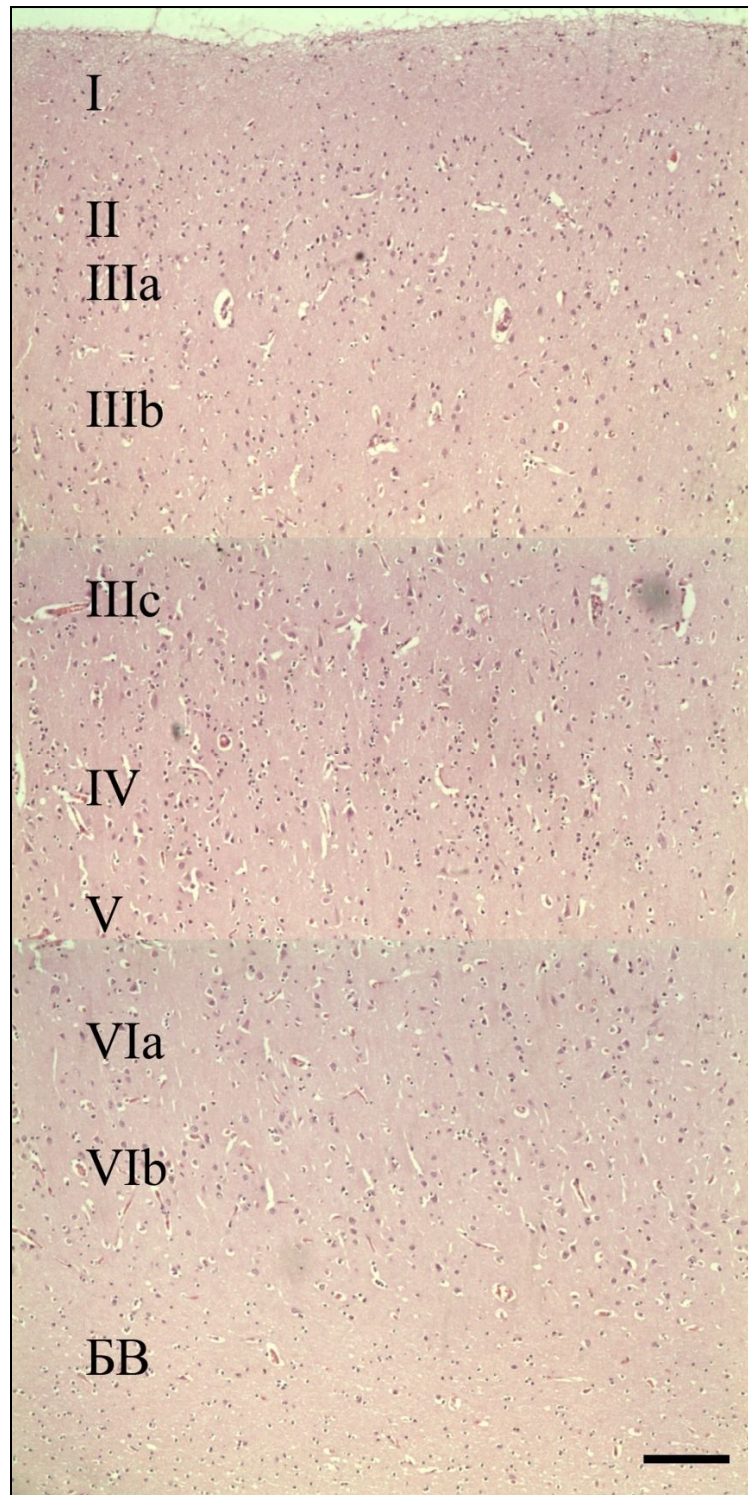


Рисунок 5 – Фронтальный срез всех слоев затылочной коры (поле 19, приетальный тип) головного мозга, группа контроля. БВ – белое вещество, I – молекулярный, II – наружный зернистый, IIIa, IIIb, IIIc – наружный пирамидный, IV – внутренний зернистый, V – внутренний пирамидный, VI – полиморфный слои коры. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x40. Шкала – 100 мкм

На аутопсийном материале (контрольная группа) основная масса нейронов во всех слоях КГМ имела признаки дегидратации – треугольная форма, перицеллюлярный отек, однотипные гиперхромные изменения (рисунки 6–10).

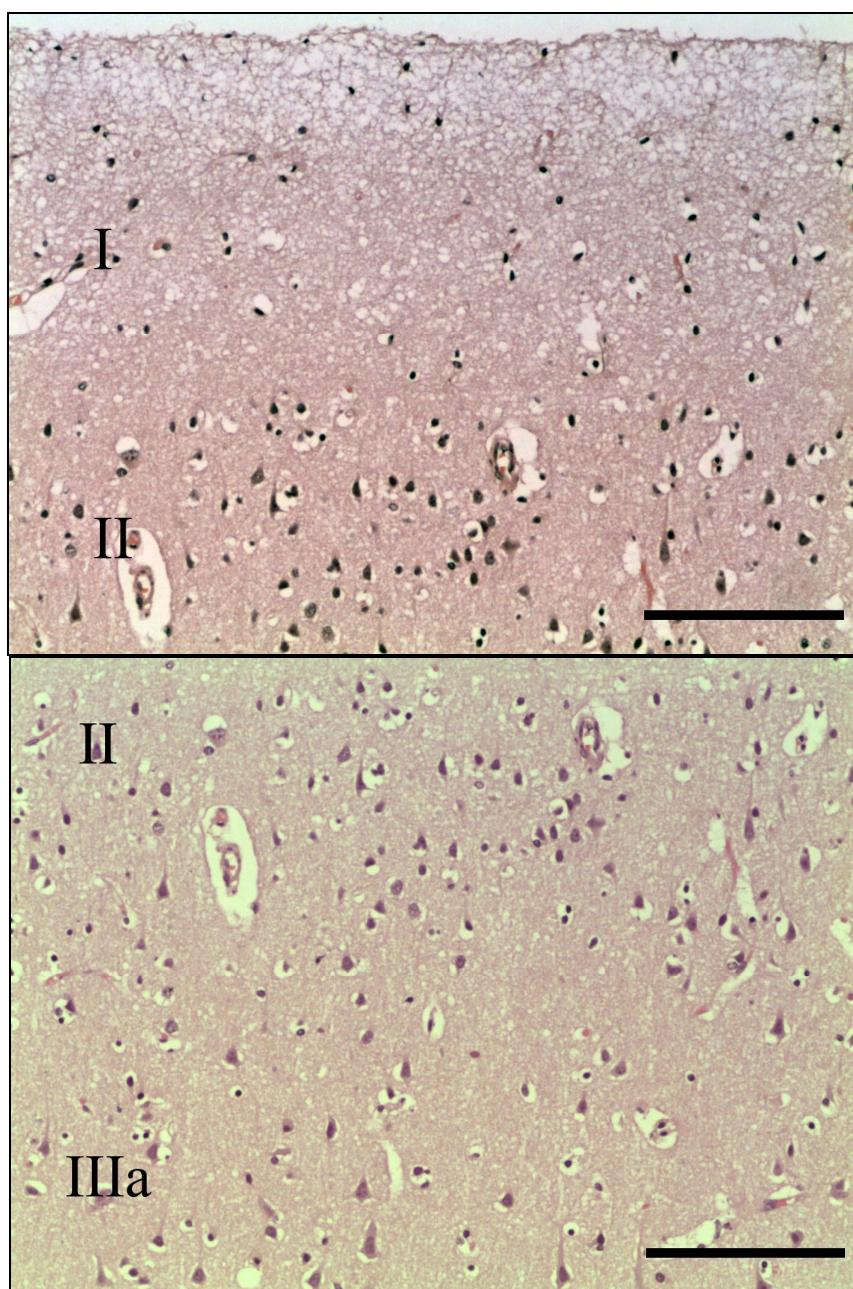


Рисунок 6 – Фронтальный срез, слои I–IIIa теменной коры головного мозга, группа контроля. I – молекулярный, II – наружный зернистый, IIIa – наружный пирамидный слои коры. Преобладают мелкие пирамидные и непирамидные гиперхромные нейроны. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм. Площадь поля зрения: $468 \times 351 = 164268 \mu^2$

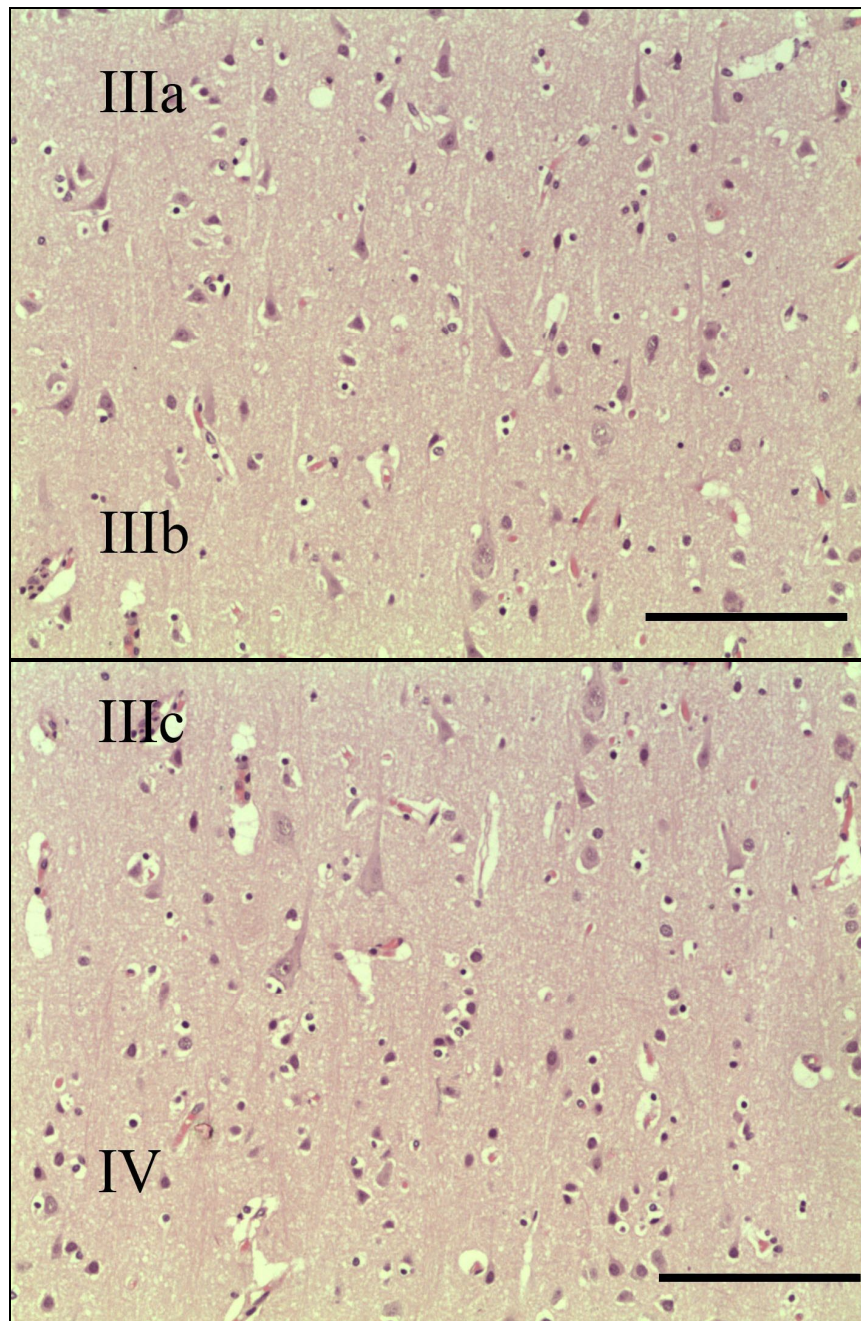


Рисунок 7 – Фронтальный срез, слои IIIa – IV теменной коры головного мозга, группа контроля. IIIa, IIIb, IIIc – наружный пирамидный, IV – внутренний зернистый слои коры. Преобладают средние и крупные пирамидные и непирамидные гиперхромные нейроны, в слое IV – округлые клетки-зерна. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм

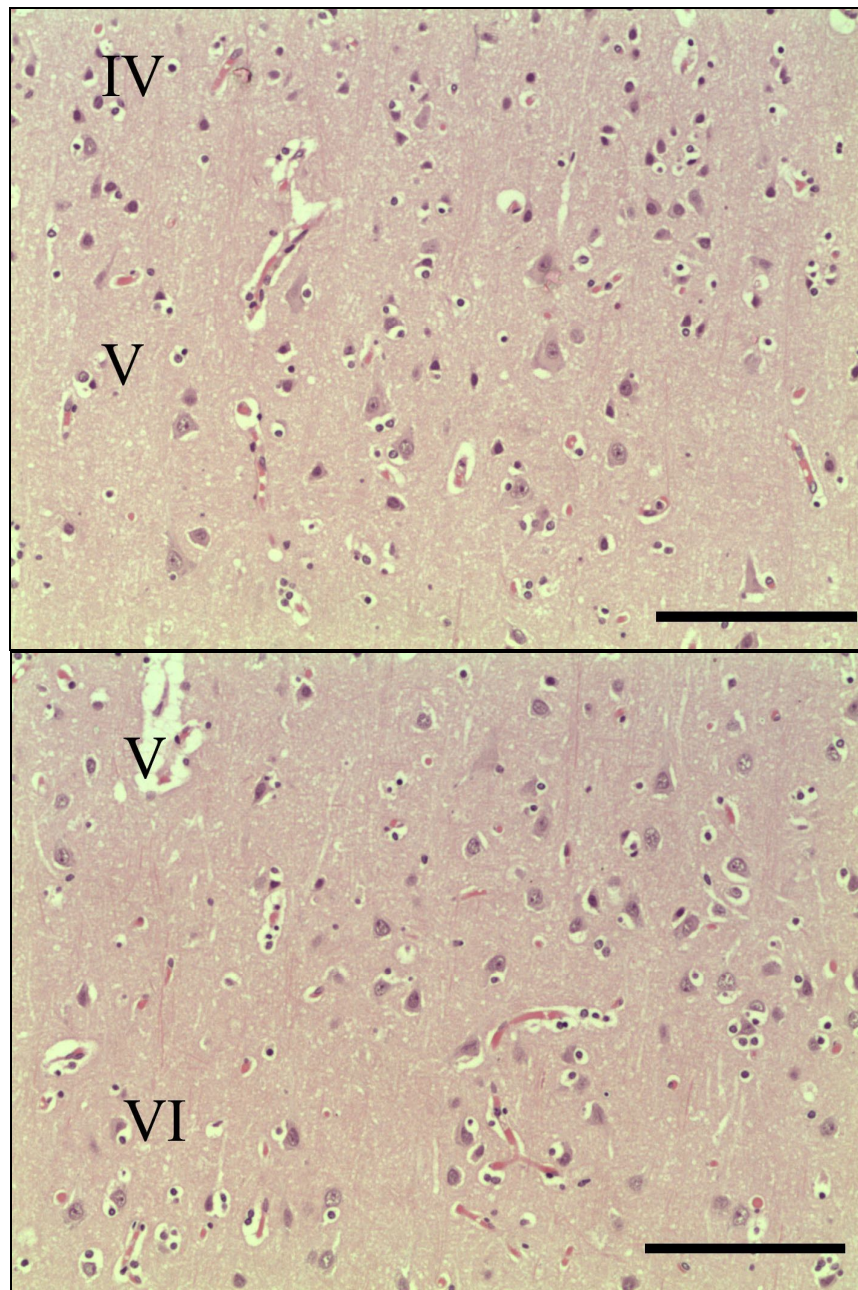


Рисунок 8 – Фронтальный срез, слои IV–VI теменной коры головного мозга, группа контроля. IV – внутренний зернистый, V – внутренний пирамидный, VI – полиморфный слои коры. Преобладают крупные пирамидные гиперхромные нейроны. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм

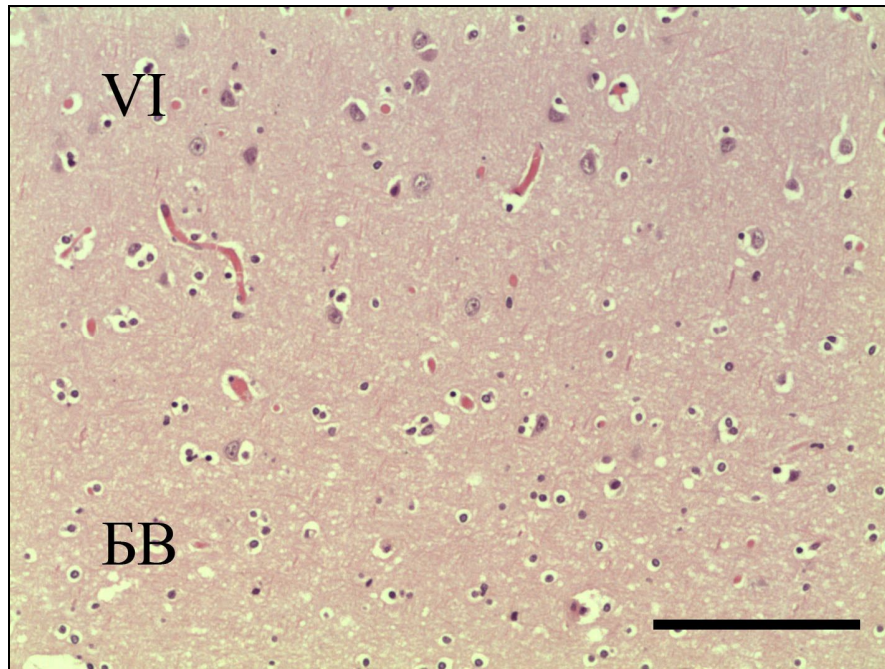


Рисунок 9 – Фронтальный срез, слой VI и белое вещество теменной коры головного мозга, группа контроля. БВ – белое вещество, VI – полиморфный слой коры. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм

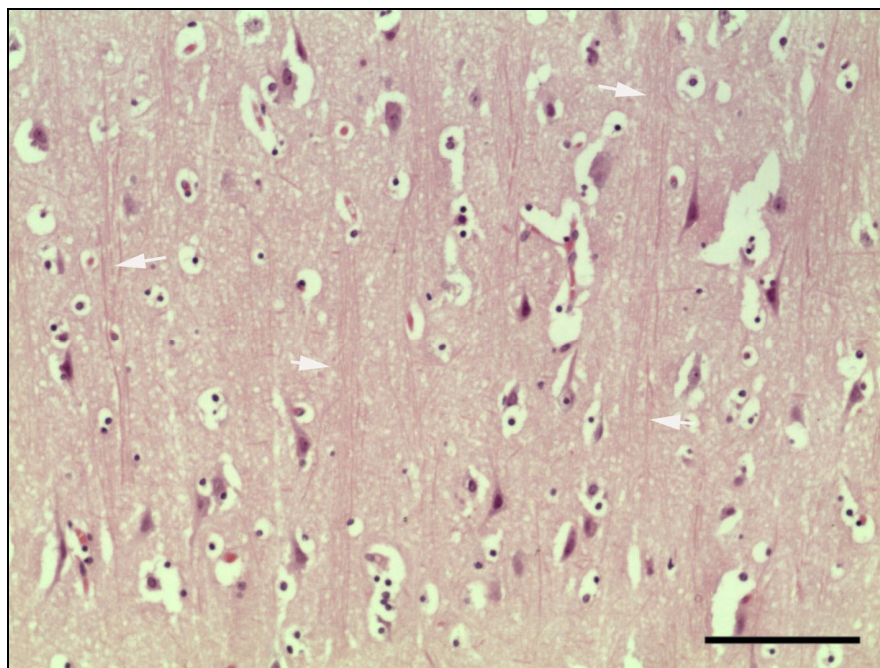


Рисунок 10 – Фронтальный срез, слой III затылочной коры головного мозга, группа контроля. Стрелки – радиальные миелинизированные волокна. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм

Для определения общей численной плотности нейронов использовали программу ImageJ 1.46 по разработанному ранее алгоритму [2; 3]. В отличие от оригинала использовались срезы, окрашенные как по Нисслю, так и гематоксилином-эозином. Это позволило удвоить количество исследованных полей зрения.

Гиперхромные изменения увеличивали контрастность нейронов, что позволяло проводить их точное автоматическое морфометрическое изучение изображений [2; 3].

Цветные изображения (24 бит) трансформировали в бинарные (2 бит), устанавливали пороги отсечения (в зависимости от размеров и формы клеток). Дальнейшее изучение цитоархитектоники КГМ проводили в автоматическом режиме на масках изображений (рисунок 11).

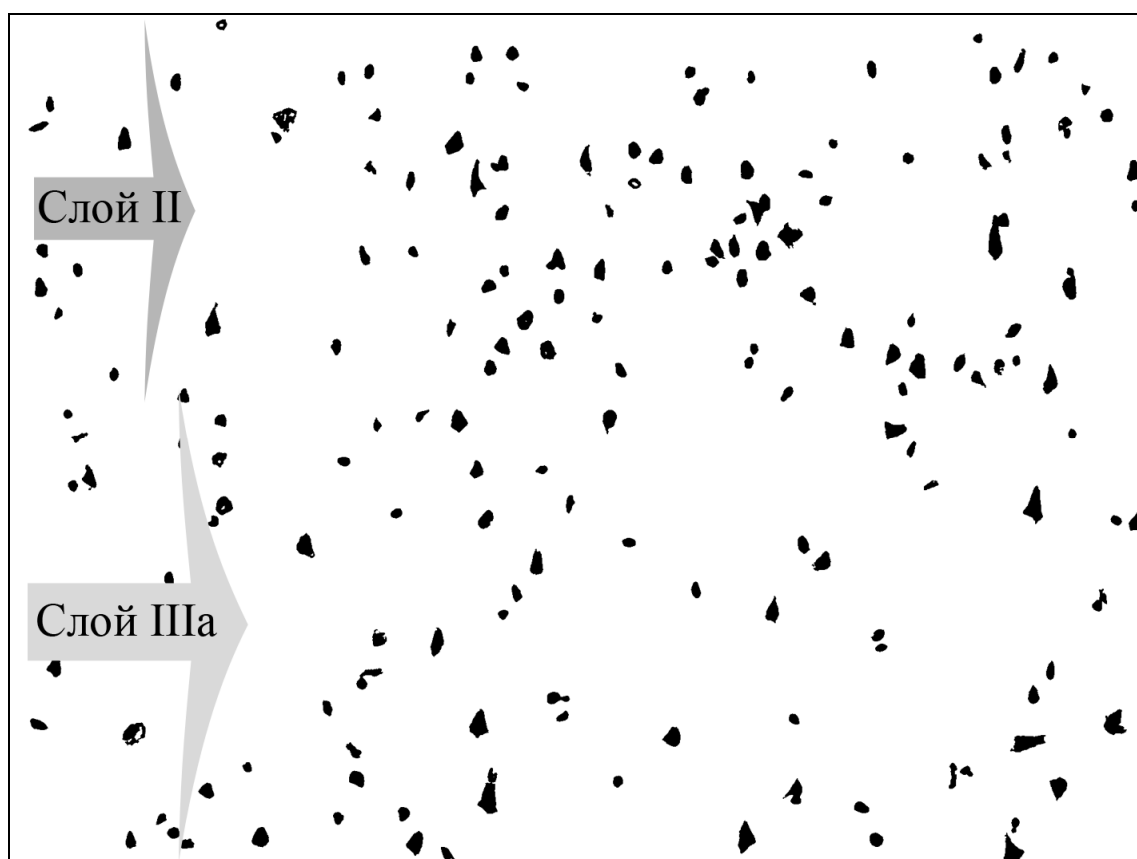


Рисунок 11 – Маска оригинального изображения (соответствует рисунку 6, слои II и IIIa)

Все нейроны представлены в виде однородных преимущественно треугольных частиц, что позволяет провести их автоматизированный подсчет в целом и по слоям с помощью «Analyze Particles».

Результаты проведенного морфометрического исследования КГМ человека (группа контроля, аутопсийный материал, окраска гематоксилин-эозином и по Ниссля) представлены в таблице 3.

Из таблицы видно, что при множественном сравнении (ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ) имелись статистически значимые различия между слоями КГМ и, в меньшей степени, – между ее долями. Максимальная численная плотность нейронов отмечалась во внешнем и внутреннем зернистых слоях (II, IV). Плотность пирамидных нейронов зависела от их размеров. В слое IIIa и IIIb клеток было больше, чем в крупноклеточных слоях IIIc и V. В полиморфном слое (VI) плотность нейронов была примерно на уровне таковой слоев IIIc и V. Меньше всего нейронов было в слое I (таблица 3).

Таблица 3 – Численная плотность нейронов (на 1 мм²) различных отделов и слоев коры головного мозга человека группа контроля (аутопсийный материал, окраска гематоксилин-эозином и тионином по Ниссля), *Me (Ql-Qh)*

Слои	Доли коры головного мозга				ANOVA Краскела-Уоллиса, df = 3
	ЛКГМ	ТКГМ	ВКГМ	ЗКГМ	
I	120 (94–132)	154 (123–162)	168 (130–173)	156 (132–167)	$p > 0,05$
II	456 (345–540)	468 (375–523)	564 (465–587)	444 (365–524)	$p > 0,05$
IIIa	278 (234–289)	276 (216–321)	288 (238–310)	396 (324–467)	$p < 0,05^*$
IIIb	286 (234–338)	242 (222–276)	192 (156–234)	324 (256–378)	$p < 0,05^*$
IIIc	204 (167–236)	156 (126–192)	216 (166–258)	252 (212–303)	$p < 0,05^*$
IV	468 (370–502)	432 (357–515)	420 (345–511)	504 (402–598)	$p > 0,05$
V	168 (125; 214)	216 (178–250)	243 (205–285)	216 (167–256)	$p < 0,05^*$
VI	216 (168–263)	240 (210–258)	264 (214–306)	348 (276–365)	$p < 0,05^*$

Слои	Доли коры головного мозга				ANOVA Краскела- Уоллиса, df = 3
	ЛКГМ	ТКГМ	ВКГМ	ЗКГМ	
ANOVA Фридмана, df = 7	$p < 0,01^{\wedge}$	$p < 0,01^{\wedge}$	$p < 0,01^{\wedge}$	$p < 0,01^{\wedge}$	—
* Различия между отделами КГМ при множественном сравнении (ANOVA Краскела-Уоллиса) статистически значимы. $\wedge$ Различия между слоями КГМ при множественном сравнении (ANOVA Фридмана) статистически значимы.					

В КГМ человека из группы контроля при окраске гематоксилин-эозином и по Ниссию выявляется несколько морфотипов нейронов – в основном пирамидные и непирамидные (рисунок 12). В силу специфики аутопсийного материала нейроны были структурно изменены – гиперхромная цитоплазма, перичеселлюлярный отек, изменение ядерно-цитоплазматического отношения, но это не отражало их прижизненного функционального состояния.

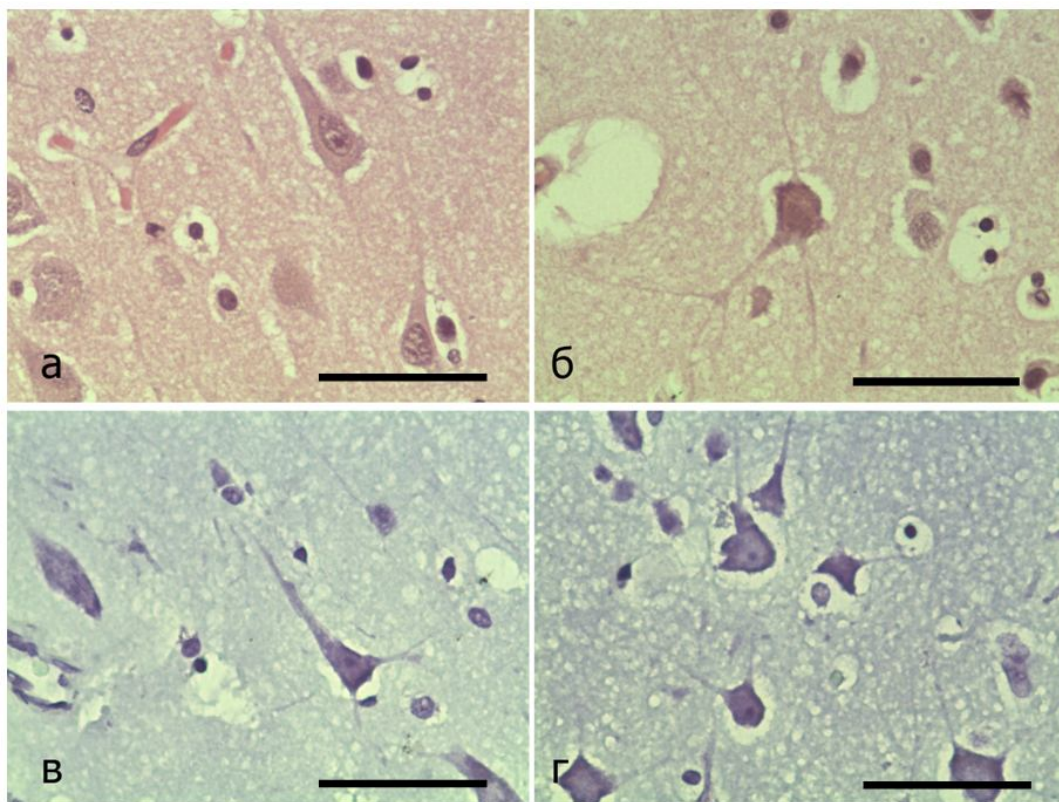


Рисунок 12 – Различные морфотипы нейронов коры головного мозга, группа контроля (аутопсийный материал): *а, в* – пирамидные нейроны (слой IIIc), *б, г* – непиримидные нейроны (слой VI). Окраска гематоксилин-эозином (*а, б*) и по Нисслю тионином (*в, г*). Ув. x400, шкала 50 мкм

В настоящей работе в основном (в силу невозможности забора нервной ткани из некоторых зон головного мозга человека) исследованы два типа КГМ – фронтальный (поля 7 и 21) и париетальный (поля 10 и 19). При фронтальном типе коры во внешнем (II) и внутреннем (IV) гранулярных слоях преобладали мелкие пирамидные нейроны, а при париетальном – звездчатые нейроны.

Таким образом, гистологическое исследование аутопсийного материала позволило описать гисто- и цитоархитектонику КГМ в норме. Однако оценивать структурно-функциональное состояние нейронов по этому материалу не корректно. Это связано с существованием тотальных однотипных (гиперхромия без сморщивания) изменений всех нейронов КГМ, обусловленных процессами наступления биологической смерти организма и посмертными изменениями.

3.2 Гистологическое исследование биопсийного материала

КГМ, взятая в ходе оперативного вмешательства (основная группа и группа сравнения), не была подвержена посмертным изменениям. Об этом свидетельствовало наличие протяженных участков неповрежденной нервной ткани с большим содержанием нормохромных нейронов и отсутствием признаков деструктивных изменений в подавляющем большинстве клеток биоптата (рисунок 13).

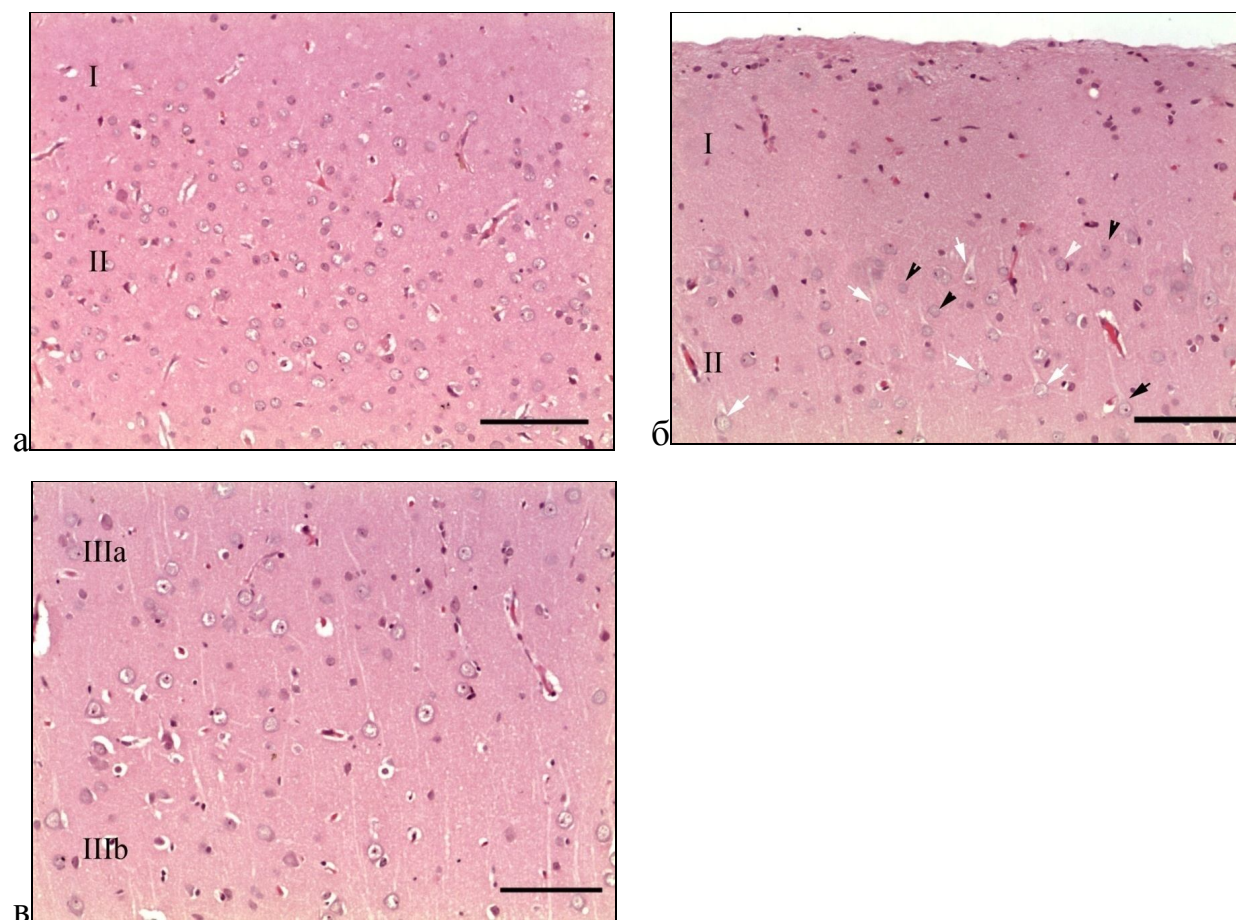


Рисунок 13 – Фронтальные срезы участков интактной коры головного мозга пациентов, оперированных по поводу опухоли головного мозга. Высокое содержание нормохромных нейронов: а – париетальный тип коры (поле 21), б – фронтальный тип коры (поле 19), в – париетальный тип коры (поле 21). Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм

В подобных интактных участках нервной ткани отсутствовали структурные признаки нарушения микроциркуляции (сдавливание клеток, периваскулярный отек, набухание эндотелиоцитов). То есть не было структурных проявлений ишемии мозга (рисунок 14). Именно эти участки КГМ составили основу группы сравнения и использовались для проверки первой статистической гипотезы.



Рисунок 14 – Участок неповрежденной ткани коры головного мозга пациента, оперированного по поводу опухоли головного мозга. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x400. Шкала – 50 мкм

ОЧПН КГМ в группе сравнения определялась также с помощью программы ImageJ 1.46 на масках (рисунок 16) реального изображения (рисунок 15) с заданными порогами отсечения. С помощью настройки порогов отсечения удалось получить маски, практически полностью отражающие реальное количество нейронов (рисунок 16), что существенно увеличило точность и облегчило процесс подсчета. При этом к минимуму были сведены систематические ошибки, связанные с субъективным фактором.

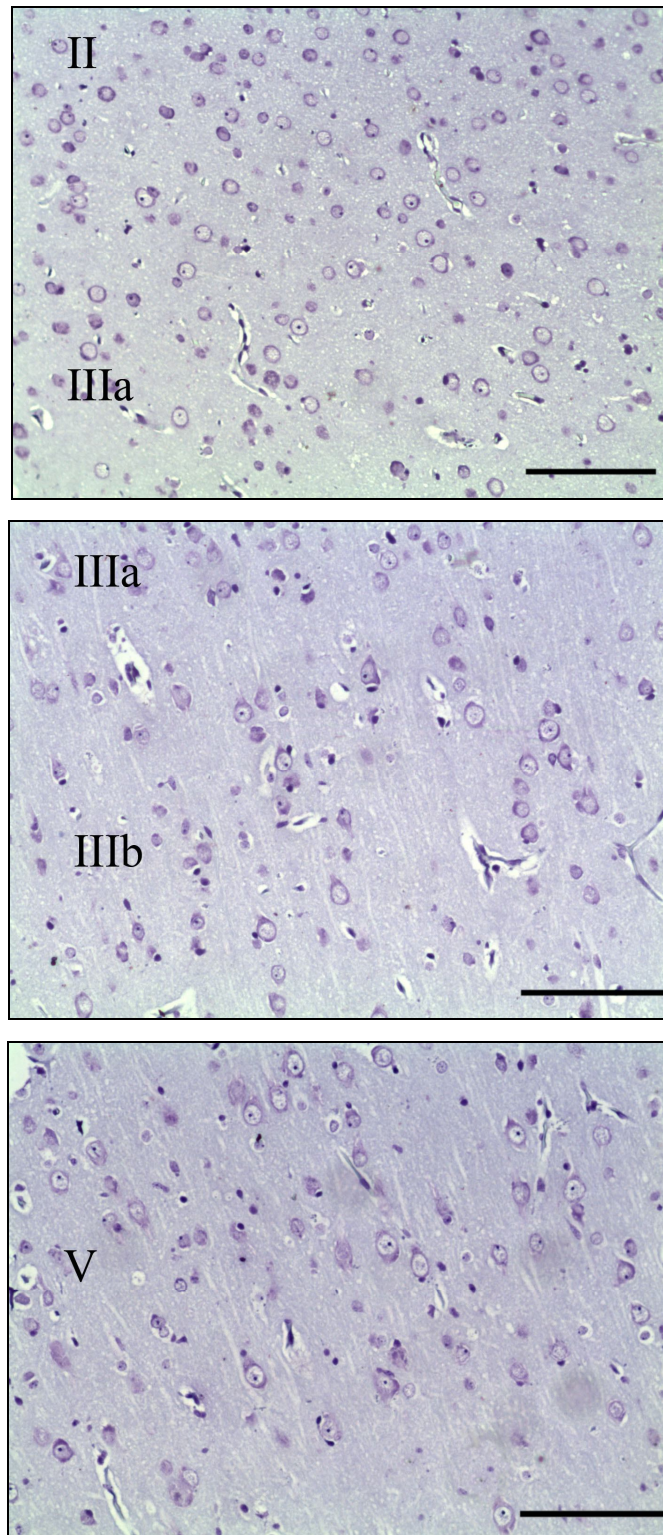


Рисунок 15 – Фронтальные срезы височной коры головного мозга пациента, оперированного по поводу опухоли головного мозга, группа сравнения.

Тотальное превалирование нормохромных нейронов с хорошо выраженным круглым ядром и базофильной цитоплазмой, дендриты не прокрашены. Окраска тионином по Нисслю. Ув. x200. Шкала – 100 мкм

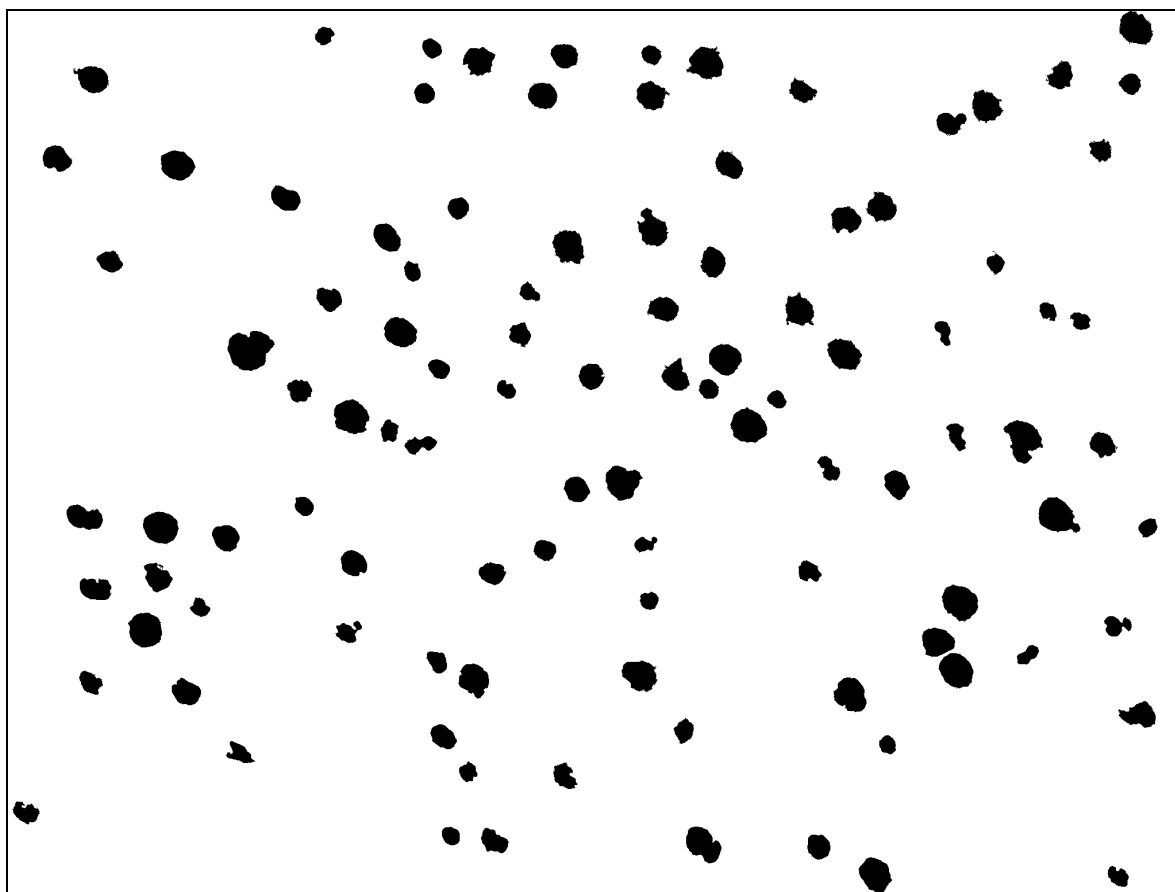


Рисунок 16 – Маска оригинального изображения (рисунок 13, височная кора, слои II и IIIa). Все нейроны представлены в виде однородных округлых частиц, что позволяет провести их автоматизированный подсчет в целом и по слоям с помощью «Analyze Particles». В поле зрения 103 частицы (628 нейронов на 1 мм^2)

По данным морфометрического исследования, в группе сравнения, как и в контрольной группе, ОЧПН статистически значимо отличалась (ANOVA) в сравниваемых долях и слоях КГМ. Различия выявлены для II, IIIa, IIIb и IIIc слоев (таблица 4). Максимальная ОЧПН отмечалась в слое II ВКГМ и слое IV ЗКГМ.

Таблица 4 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм²) в коре головного мозга человека, группа сравнения (интраоперационный материал, окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), *Me (Ql-Qh)*

Слои	Доли коры головного мозга				ANOVA Краскела-Уоллиса, df = 3
	ЛКГМ	ТКГМ	ВКГМ	ЗКГМ	
I	134 (118–143)	138 (125–154)	145 (120–160)	136 (121–152)	$p > 0,05$
II	498 (442–535)	554 (486–614)	672 (545–912)	525 (475–554)	$p < 0,05^*$
IIIa	417 (365–512)	345 (287–362)	360 (325–395)	423 (387–490)	$p < 0,05^*$
IIIb	389 (344–435)	326 (289– 352)	300 (220–355)	385 (312–415)	$p < 0,05^*$
IIIc	312 (266–321)	201 (157–211)	240 (195–262)	282 (241–314)	$p < 0,05^*$
IV	523 (489–587)	512 (478–523)	542 (480–635)	578 (533–604)	$p > 0,05$
V	205 (187–285)	256 (218–289)	268 (245–340)	236 (196–276)	$p > 0,05$
VI	255 (226–426)	308 (254–325)	312 (302–380)	397 (333–415)	$p < 0,05^*$
ANOVA Фридмана, df = 7	$p < 0,01^{\wedge}$	$p < 0,01^{\wedge}$	$p < 0,01^{\wedge}$	$p < 0,01^{\wedge}$	—
* Различия между отделами КГМ при множественном сравнении (ANOVA Краскела-Уоллиса) статистически значимы.					
$\wedge$ Различия между слоями КГМ при множественном сравнении (ANOVA Фридмана) статистически значимы					

При парном сравнении контрольной группы и группы сравнения было установлено, что в биопсийном материале ОЧПН мелкоклеточных слоев была статистически значимо выше чем в аутопсийном материале (таблицы 5, 6, 7, 8). Эти результаты опровергали нашу первую статистическую гипотезу. ОЧПН КГМ в контрольной группе была не выше, а в некоторых слоях даже ниже, чем в группе сравнения.

Таблица 5 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм²) в лобной коре головного мозга человека контрольной группы и группы сравнения (окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), *Me (Ql-Qh)*

Слои	Группы		Уровень <i>p</i> (критерий Манна-Уитни)
	Контрольная	Сравнения	
I	120 (94–132)	134 (118–143)	> 0,05
II	456 (345–540)	498 (442–535)	> 0,05
IIIa	278 (234–289)	417 (365–512)	= 0,001*
IIIb	286 (234–338)	389 (344–435)	= 0,001*
IIIc	204 (167–236)	312 (266–321)	= 0,02*
IV	468 (370–502)	523 (489–587)	= 0,04*
V	168 (125–214)	205 (187–285)	> 0,05
VI	216 (168–263)	255 (226–426)	> 0,05
* Различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни для парного сравнения независимых выборок).			
Примечание – Материал представлен как медиана (<i>Me</i>), нижний (<i>Ql</i>) и (<i>Ql-Qh</i>) верхний квартили			

Таблица 6 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм²) в теменной коре головного мозга человека контрольной группы и группы сравнения (окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), *Me (Ql-Qh)*

Слои	Группы		Уровень <i>p</i> (критерий Манна-Уитни)
	Контрольная	Сравнения	
I	154 (123–162)	138 (125–154)	> 0,05
II	468 (375–523)	554 (486–614)	= 0,02*
IIIa	276 (216–321)	345 (287–362)	= 0,04*
IIIb	242 (222–276)	326 (289–352)	= 0,001*
IIIc	156 (126–192)	201 (157–211)	> 0,05
IV	432 (357–515)	512 (478–523)	= 0,04*
V	216 (178–250)	256 (218–289)	> 0,05
VI	240 (210–258)	308 (254–325)	> 0,05
* Различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни для парного сравнения независимых выборок).			

Таблица 7 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм²) в височной коре головного мозга человека контрольной группы и группы сравнения (окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), *Me (Ql-Qh)*

Слои	Группы		Уровень <i>p</i> (критерий Манна-Уитни)
	Контрольная	Сравнения	
I	168 (130–173)	145 (120–160)	> 0,05
II	564 (465–587)	672 (545–912)	= 0,01*
IIIa	288 (238–310)	360 (325–395)	= 0,02*
IIIb	192 (156–234)	300 (220–355)	= 0,001*
IIIc	216 (166–258)	240 (195–262)	> 0,05
IV	420 (345–511)	542 (480–635)	= 0,04*
V	243 (205–285)	268 (245–340)	> 0,05
VI	264 (214–306)	312 (302–380)	= 0,04*
* Различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни для парного сравнения независимых выборок).			

Таблица 8 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм²) в затылочной коре головного мозга человека контрольной группы и группы сравнения (окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), *Me (Ql-Qh)*

Слои	Группы		Уровень <i>p</i> (критерий Манна-Уитни)
	Контрольная	Сравнения	
I	156 (132–167)	136 (121–152)	>0,05
II	444 (365–524)	525 (475–554)	= 0,04*
IIIa	396 (324–467)	423 (387–490)	> 0,05
IIIb	324 (256–378)	385 (312–415)	= 0,02*
IIIc	252 (212–303)	282 (241–314)	> 0,05
IV	504 (402–598)	578 (533–604)	> 0,05
V	216 (167–256)	236 (196–276)	> 0,05
VI	348 (276–365)	397 (333–415)	= 0,04*
* Различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни для парного сравнения независимых выборок).			

Следовательно, в неповрежденных участках КГМ, взятых нами в ходе операции (группа сравнения) на значительном удалении от опухоли, не происходило гибели нейронов. Поэтому эти участки имели более высокую ОЧПН и их можно рассматривать как интактные. Таким образом, группу сравнения можно использовать для проверки второй статистической гипотезы: «ОЧПН в основной группе (зона ишемической полутени) не отличается от ОЧПН в группе сравнения». То есть, гипотезы о влиянии хронической ишемии на ОЧПН КГМ.

Различия ОЧПН в контрольной и группе сравнения были связаны с тем, что в интактных участках КГМ нейроны не подвергались дегидратации, сохраняя свои нативные размеры, форму и тинкториальные свойства белков. Поэтому по форме ядра и тела их трудно было перепутать с другими клетками нервной ткани (глия). В аутопсийном же материале часть мелких нейронов не имела типичных идентификационных признаков и трактовались не как мелкие пирамидные нейроны, а как астроциты.

В КГМ человека из группы сравнения (операционный материал) при окраске гематоксилин-эозином и по Нисслю также выявлялось несколько морфотипов нейронов – пирамидные и непиримидные (рисунок 17). Однако, в отличие от аутопсийного материала, нейроны не имели структурных изменений, свидетельствующих о наличии прижизненной ишемической патологии. Нейроны имели круглые базофильные ядра с глыбками хроматина и интенсивно окрашенным ядрышком. Эозинофильная цитоплазма содержала структурированный базофильный материал гранулярной эндоплазматической сети без вакуолей. Отростки (дендриты) слабо контурируют, более светлые, чем тела нейронов. Дендриты прямые, без признаков деформации. Нейропил представлен эозинофильным войлокообразным материалом с контурами отростков. Перикалликулярный отек не выражен.

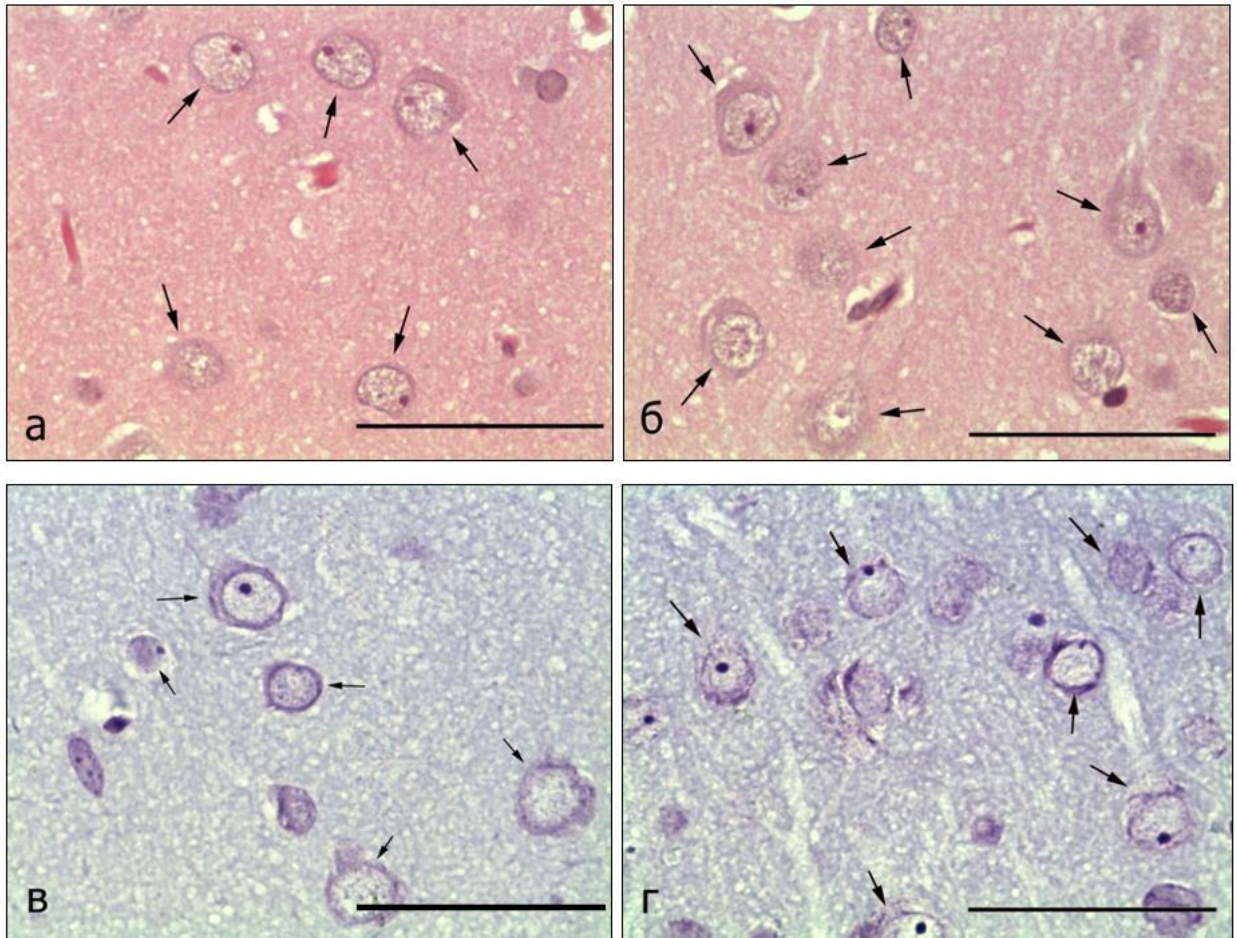


Рисунок 17. Различные морфотипы нейронов височной коры головного мозга, группа сравнения (операционный материал, интактные участки): *а, б* – нейроны слоя IIIa и IIIb (окраска гематоксилин-эозином), *в, г* – слоя IIIb и IIIc (окраска по Ниссля тионином). Об. x40, шкала 50 мкм

Таким образом, гистологическое морфометрическое исследование позволило опровергнуть нулевую статистическую гипотезу об отсутствии количественных различий цитоархитектоники различных долей и слоев КГМ как в аутопсийном, так и в биопсийном материале. Это исследование показало преимущество биопсийного материала для изучения структурно-функционального состояния нейронов.

3.3 Тинкториальные свойства нервной ткани

В нейроморфологических исследованиях изучение тинкториальных свойств нервной ткани, как правило, сводится к подсчету нервных клеток с изменением тинкториальных свойств по гипо- и гиперхромному типу. При этом в основе исследования лежит субъективная оценка степени гипо- и гиперхромии, что само по себе несет опасность систематической ошибки. В нашем исследовании для изучения тинкториальных свойств нервной ткани в норме и при ишемии использован метод построения гистограмм пиксельного распределения на 8-битовых цветных изображениях КГМ.

3.3.1 Кора головного мозга в норме

На рисунке 18 представлены гистограммы только нейропиля (а) и нейропиль+группа клеток (б).

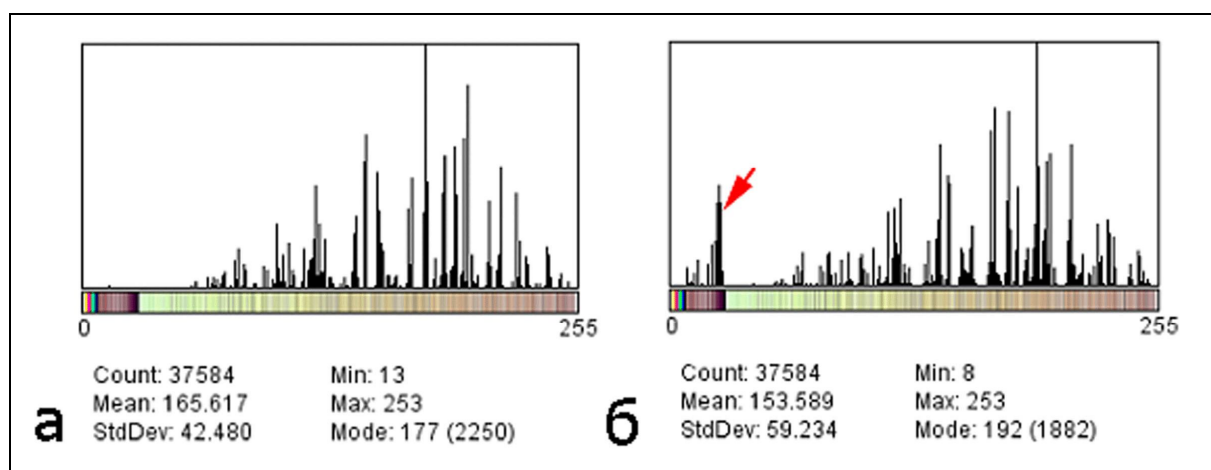


Рисунок 18 – Гистограммы, отражающие клеточный состав полей зрения участков теменной коры головного мозга человека (группа контроля), содержащих только нейропиль (а) и нейропиль+нейроны (б). Стрелка – пиксели 8–29 соответствуют клеткам. 30–79 – фону, более 80 – нейропилю

Согласно полученным данным, имелись четкие зоны гистограммы, соответствующие преимущественно нейропилю, – пиксели по шкале 256

более 80. Если анализируемое поле включало нейроны и их крупные дендриты, появлялись пиксели 8–50. Поэтому можно считать, что разброс на шкале гистограммы от 8 до 50 характеризовал цветовую палитру клеток и их крупных отростков (дендритов). При этом до 30 – отростки и умеренно гиперхромные тела, а более 30 – темные базофильные тела и ядра.

Ниже приведены гистограммы цветных (гематоксилин-эозин) изображений всех слоев теменной (рисунок 19) и височной (рисунок 20) КГМ человека.

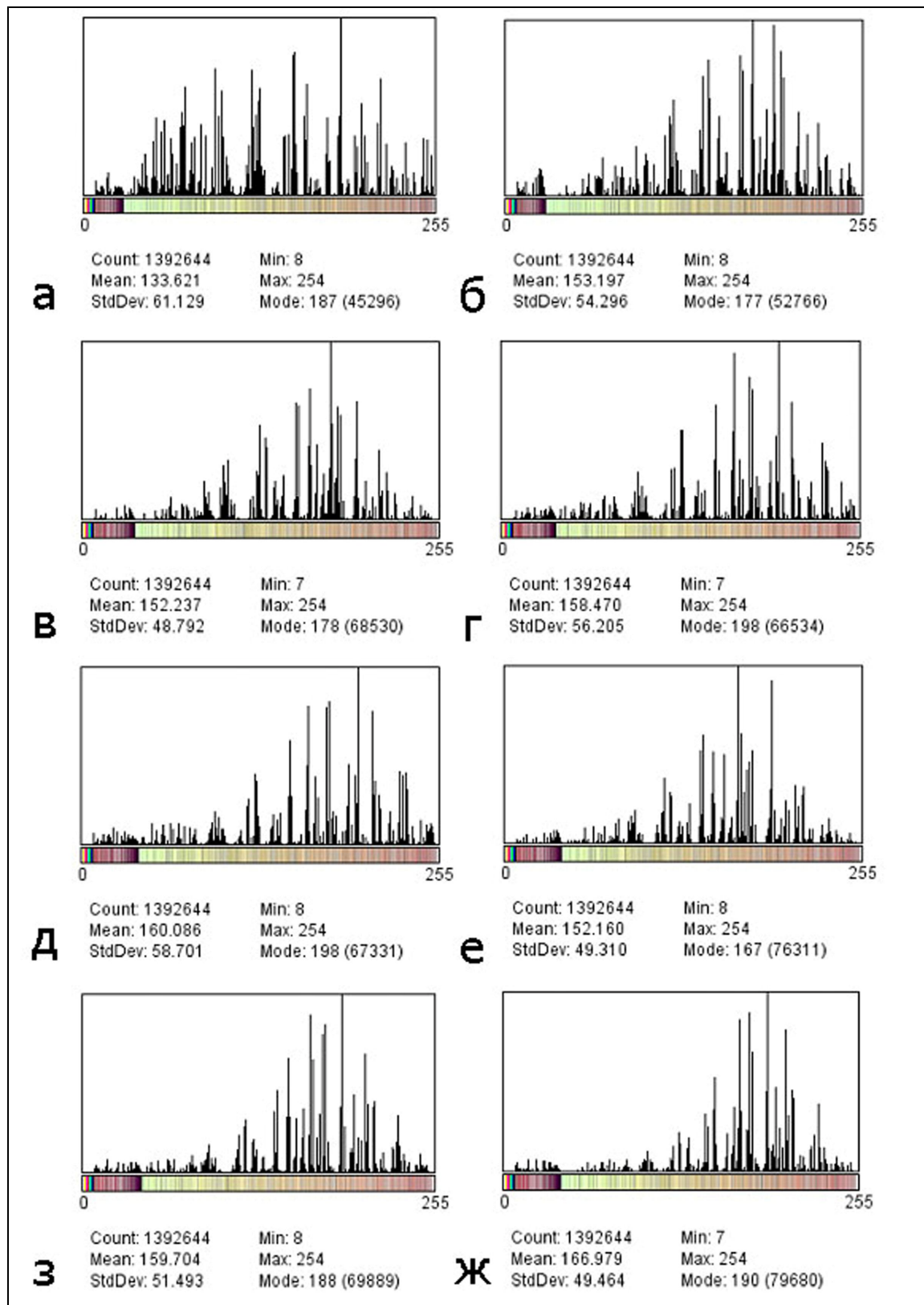


Рисунок 19 – Гистограммы изображений различных слоев теменной коры головного мозга (поле 7) человека, группа контроля (аутопсийный материал); а – слой I, б – слой II, в – слой IIIa, г – IIIb, д – слой IIIc, е – слой IV, з – слой V, ж – слой VI

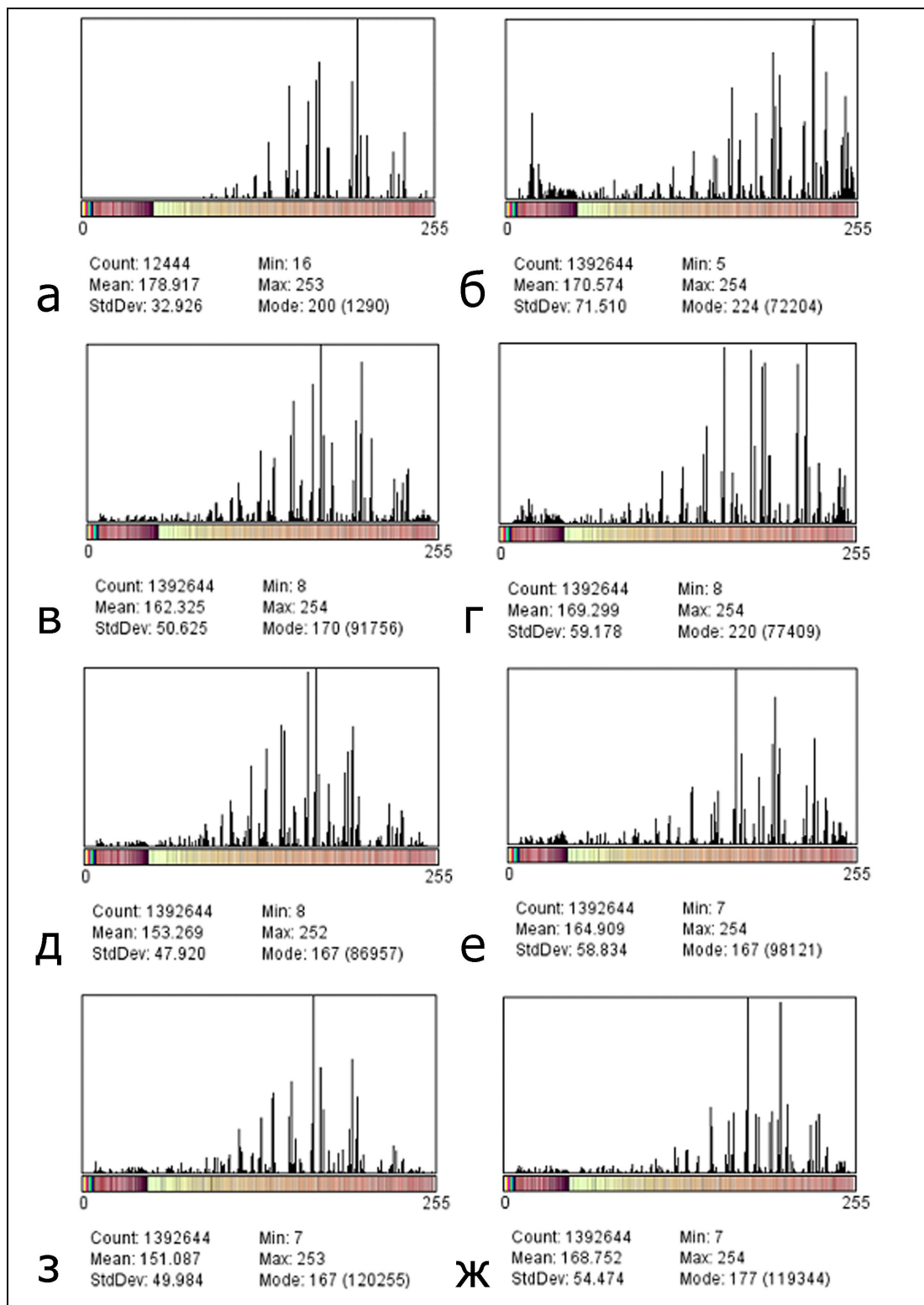


Рисунок 20 – Гистограммы изображений различных слоев височной коры головного мозга (поле 7) человека, группа контроля (аутопсийный материал); а – нейропиль (без нейронов), б – слой II, в – слой IIIa, г – IIIb, д – слой IIIc, е – слой IV, з – слой V, ж – слой VI

При сравнении слоев наибольшие различия формы кривой и моды (состав пикселей) характерны для «клеточной зоны» гистограммы. Так, при сравнении наружного зернистого слоя со слоями III, V и IV явно видно, что их пиксельный состав (8–40 – теменная, 8–50 – височная кора) существенно отличался.

Изучение гистограмм «клеточной зоны» в разных слоях ТКГМ показал, что преобладали пиксели 33–40 (по шкале 0–256) (рисунок 21). Эти пиксели отражали наиболее темные участки изображения – дегидратированные нейроны. Дендриты были более светлыми – 8–32.

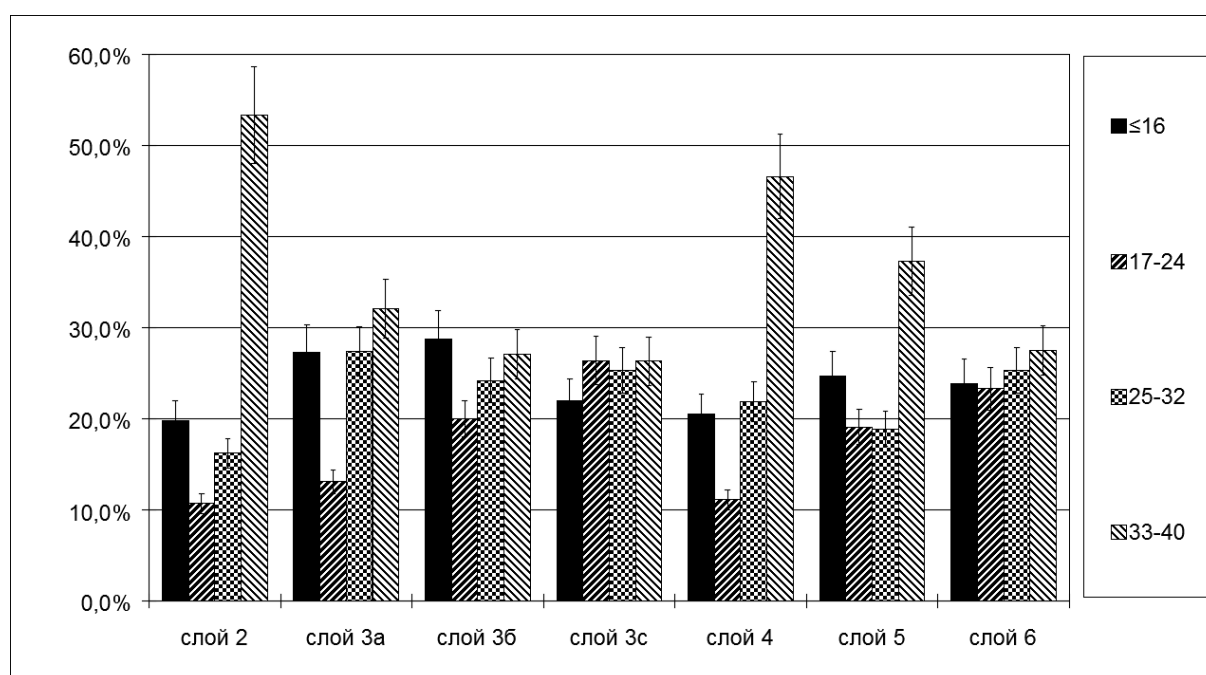


Рисунок 21 – Пиксельный состав «клеточной зоны» гистограмм ($n = 100$) изображений участков теменной коры (поле 7) головного мозга человека, группа контроля. Преобладали пиксели (33–40). Материал представлен как относительное содержание (%) и 95 % доверительный интервал (разброс, %)

Для сравнения ниже приведен пиксельный состав «клеточной зоны» гистограмм участков ВКГМ (рисунок 22). Видно, что преобладали пиксели, соответствовавшие нейронам с умеренной и незначительной гиперхромией.

В сравнении с аналогичными слоями теменной коры статистически значимые различия выявлены: слой 2 ($\chi^2 = 31,2$; $p < 0,0001$), слой IIIc ($\chi^2 = 10,0$; $p = 0,02$), слой 4 ($\chi^2 = 31,5$; $p < 0,0001$), слой 5 ($\chi^2 = 12,5$; $p = 0,006$).

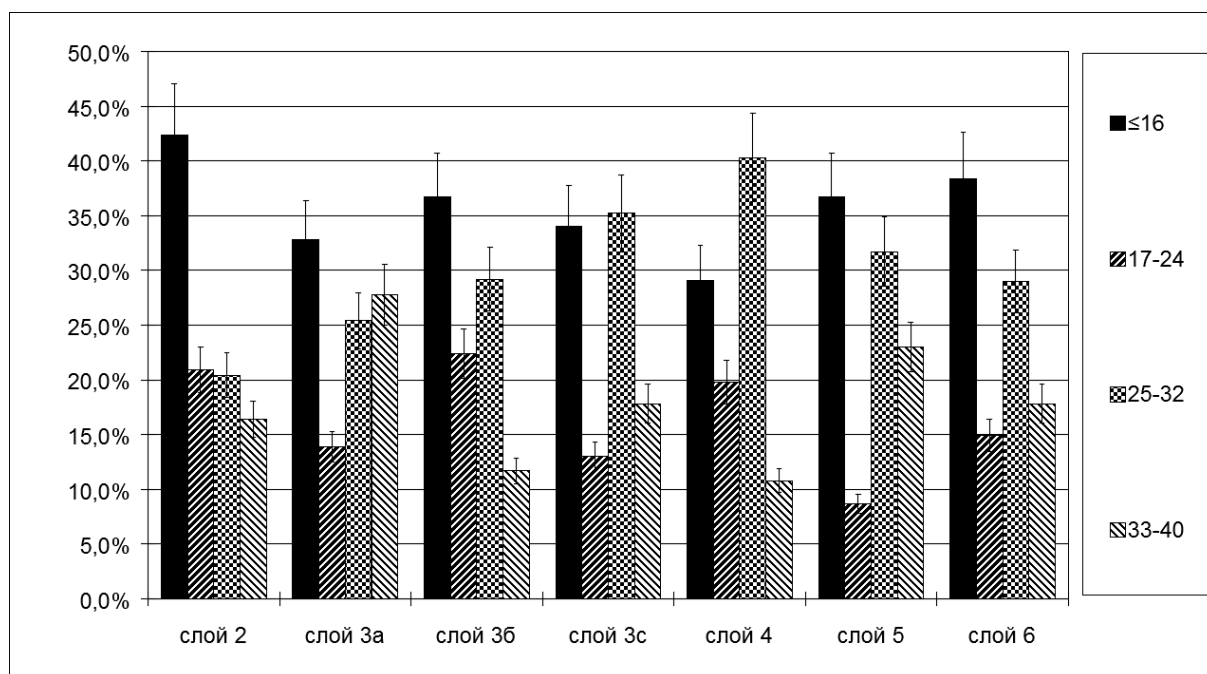


Рисунок 22 – Пиксельный состав «клеточной зоны» гистограмм ($n = 100$) изображений височной коры (поле 21), группа контроля. Преобладали пиксели (8–20). Материал представлен как относительное содержание (%) и 95 % доверительный интервал (разброс, %). 100 полей зрения

Следовательно, по гистограмме можно предположить, что степень гиперхромии (дегидратации) нейронов сравниваемых отделов отличается, несмотря на отсутствие визуальных и морфометрических отличий. В обоих случаях в КГМ преобладали несморщенные гиперхромные нейроны (рисунки 2 и 3), а структура отражающих их гистограмм статистически значимо отличалась. Это свидетельствовало о различии тинкториальных изменений сравниваемых долей и слоев. То есть, выявлены некоторые специфические особенности долей при общих закономерностях увеличения количества гиперхромных нейронов в аутопсийном материале.

Таким образом, при изучении на цветных гистограммах пиксельного состава изображений в палитровом (индексированном) формате аутопсийного материала четко выделялись зоны с преобладанием нейропиля, клеток + их крупных отростков и светлого (чаще – вариации желтого, не эозинофильного) фона, что позволяло проводить сравнительное количественное изучение тинкториальных свойств этих структур в разных долях и слоях КГМ. То есть, по палитре изображения и распределению пикселей по шкале 0–255 в гистограмме можно очень точно судить о степени базо- и эозинофилии белков соответствующих отделов нейронов – ядер, тел и отростков при окраске гематоксилином/эозином.

Ниже приведена схема, суммирующая полученные результаты исследования аутопсийного материала (рисунок 23).

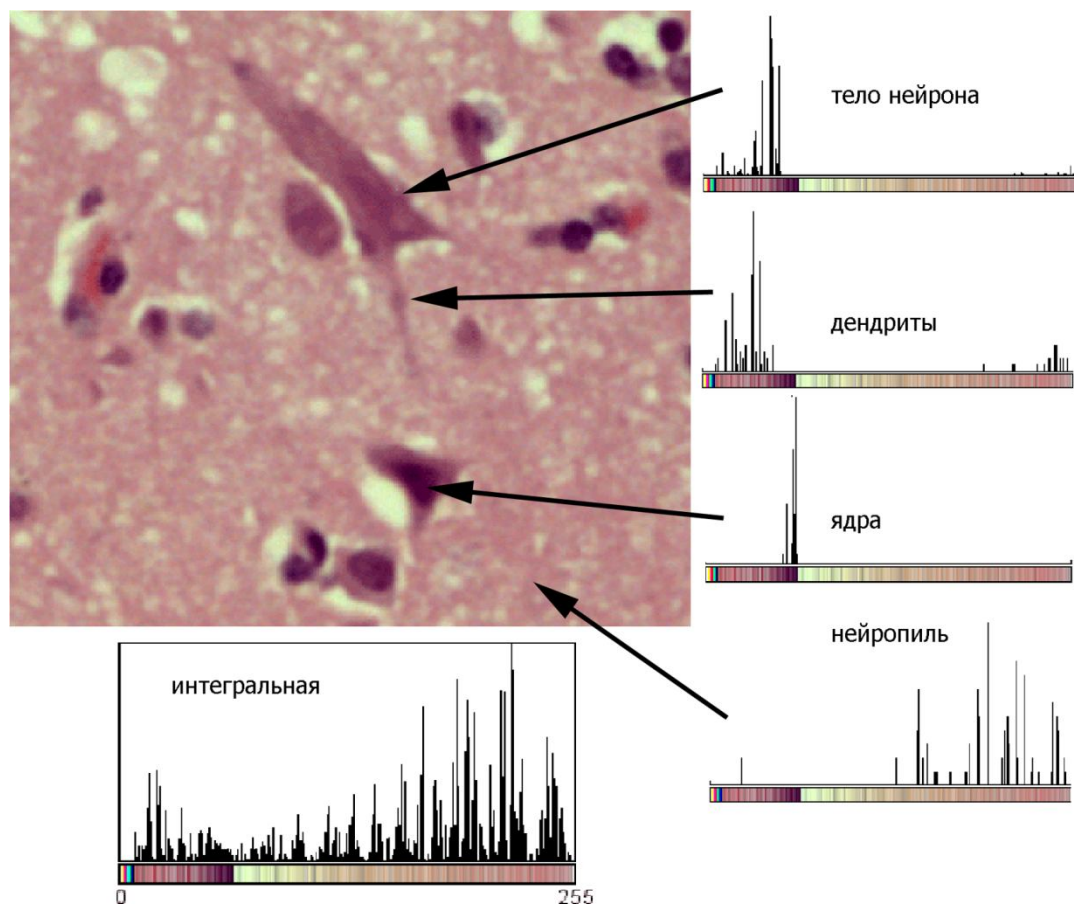


Рисунок 23 – Зоны гистограммы, отражающие пиксельный состав нейропиля, клеток, крупных отростков и светлого фона коры головного мозга. Отдельно показана интегральная гистограмма всего поля зрения

При изучении участков биопсийного материала КГМ в группе сравнения сохранялись основные положения описанного ранее подхода, однако палитра и структура гистограмм имели иные количественные характеристики, форму и состав. Гистограммы нейропиля и нейрона представлены на рисунке 24.

Согласно этим гистограммам изображения интактных участков ВКГМ с неизмененными нативными нейронами нет четкой «зоны клеток», как на гистограммах аутопсийного материала (рисунки 18, 19, 20). Зоны нейропиля и нейронов сливались (рисунок 24б). Однако пиксели нейронов нарушали симметрию гистограммы – изменяли соотношение более ярких темных (вероятно, базофильных) и светлых пикселей (рисунок 24б, стрелка). Различия подтверждались и показателями моды – 115 и 149.

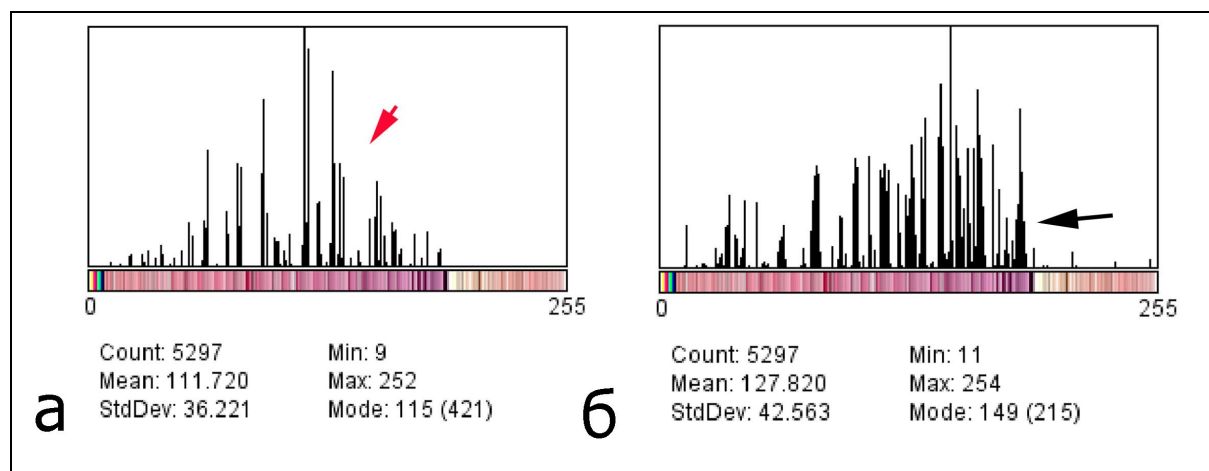


Рисунок 24 – Гистограммы изображений височной коры, содержащих только нейропиле (а) и нейропиле+нейроны (б). Красная стрелка – пиксели нейропиля, черная – пиксели нейрона

Как и при изучении аутопсийного материала удалось выявить неидентичность гистограмм различных слоев КГМ (рисунок 24).

В структуре гистограмм отчетливо выявлялись светлые пиксели, отражающие структуру дендритов и тел пирамидных нейронов (рисунок 25, стрелка). Эти дендриты были видны на фоне нейропиля, как светлые полосы (рисунок 12в).

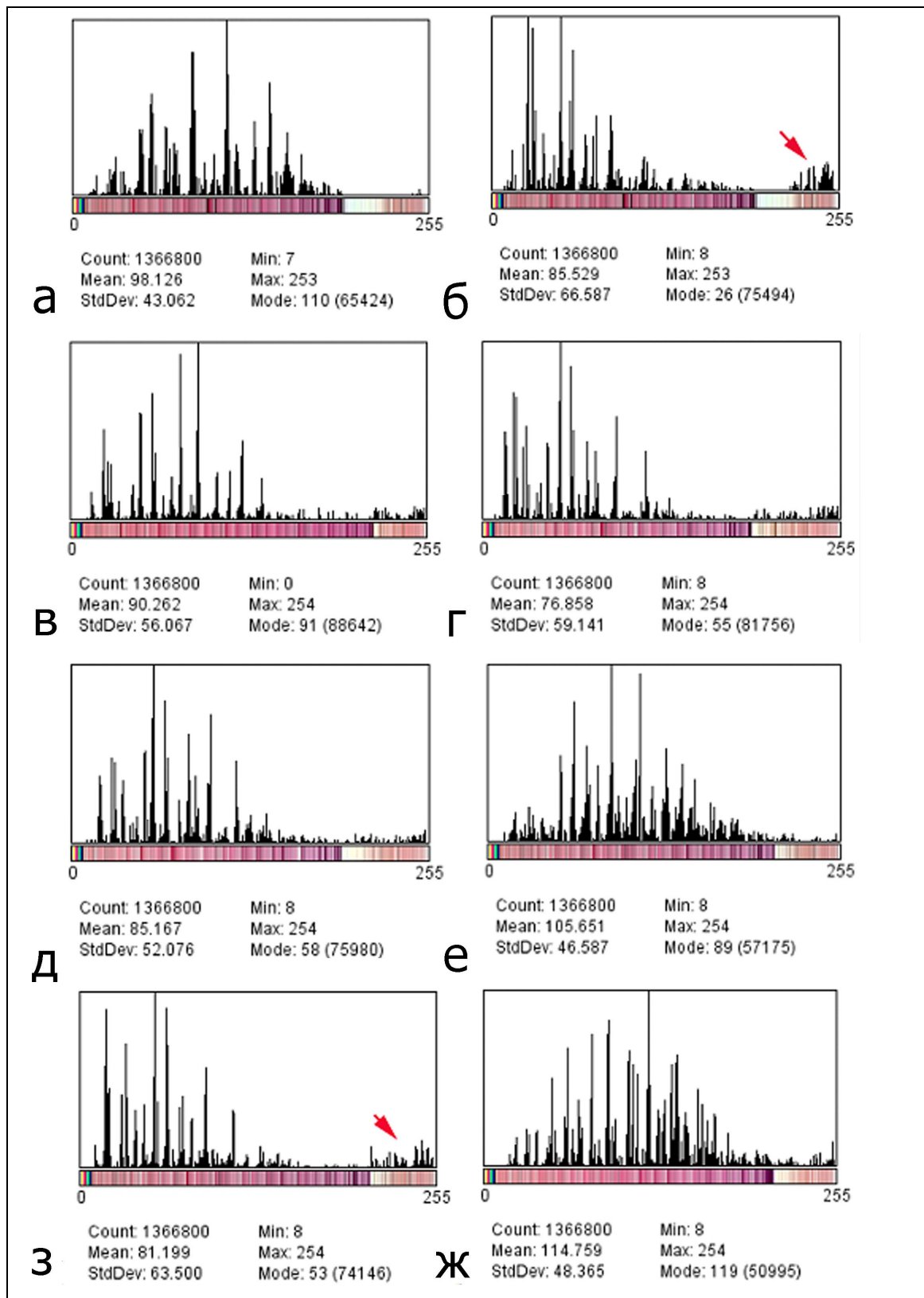


Рисунок 25 – Гистограммы изображений различных слоев интактной височной коры головного мозга (поле 21) человека, группа сравнения (биопсийный материал), а – слой I, б – слой II, в – слой IIIa, г – IIIb, д – слой IIIc, е – слой IV, з – слой V, ж – слой VI

Таким образом, при изучении на гистограммах пиксельного состава цветных изображений в палитровом (индексированном) формате биопсийного материала из группы сравнения также выявлены особенности тинкториальных свойств структур КГМ. Это позволило дискриминировать нейроны, дендриты, нейропилы. Однако, зоны, отражающие тинкториальные свойства нейропиля и неповрежденных нейронов частично накладывались друг на друга, что затрудняло верификацию эозинофильных структур нейрона (цитоплазма сомы) и нейропиля (цитоплазма отростков). Поэтому часть пикселей, отражающих эозинофильные структуры в норме, было трудно отнести к нейропилю или нейронам. Тем не менее, по палитре изображения и распределению пикселей (шкала 0–255) можно было отчетливо различать базо- и эозинофильные структуры нервной ткани.

Сравнение гистограмм пиксельного распределения на цифровых изображениях аутопсийного (группа контроля) и биопсийного (основная группа и группа сравнения) материала КГМ человека позволил получить новые объективные данные о тинкториальных свойствах нервной ткани после наступления биологической смерти, при хронической ишемии и в норме.

Выявлены существенные различия тинкториальных свойств нейронов и нейропиля аутопсийного («мертвая» ткань) и биопсийного («живая» ткань) материала КГМ человека. Подобный метод сравнения тинкториальных свойств нервной ткани обладал высокой чувствительностью и средним уровнем специфичности. Это подтвердилось для мелко- и крупноклеточных слоев КГМ.

По данным общего дискриминантного анализа, корректная статистически значимая дискриминация тинкториальных свойств нервной ткани (распределение пикселей в гистограммах) КГМ из контрольной группы и группы сравнения отмечалась на уровне 80–90 %.

С помощью ROC-анализа выявлена высокая чувствительности метода – 86,3 % (95 % ДИ: 81,4–90,3 %), а специфичность была на уровне средних значений – 44,4 % (95 % ДИ: 38,1–50,8 %) (рисунок 26).

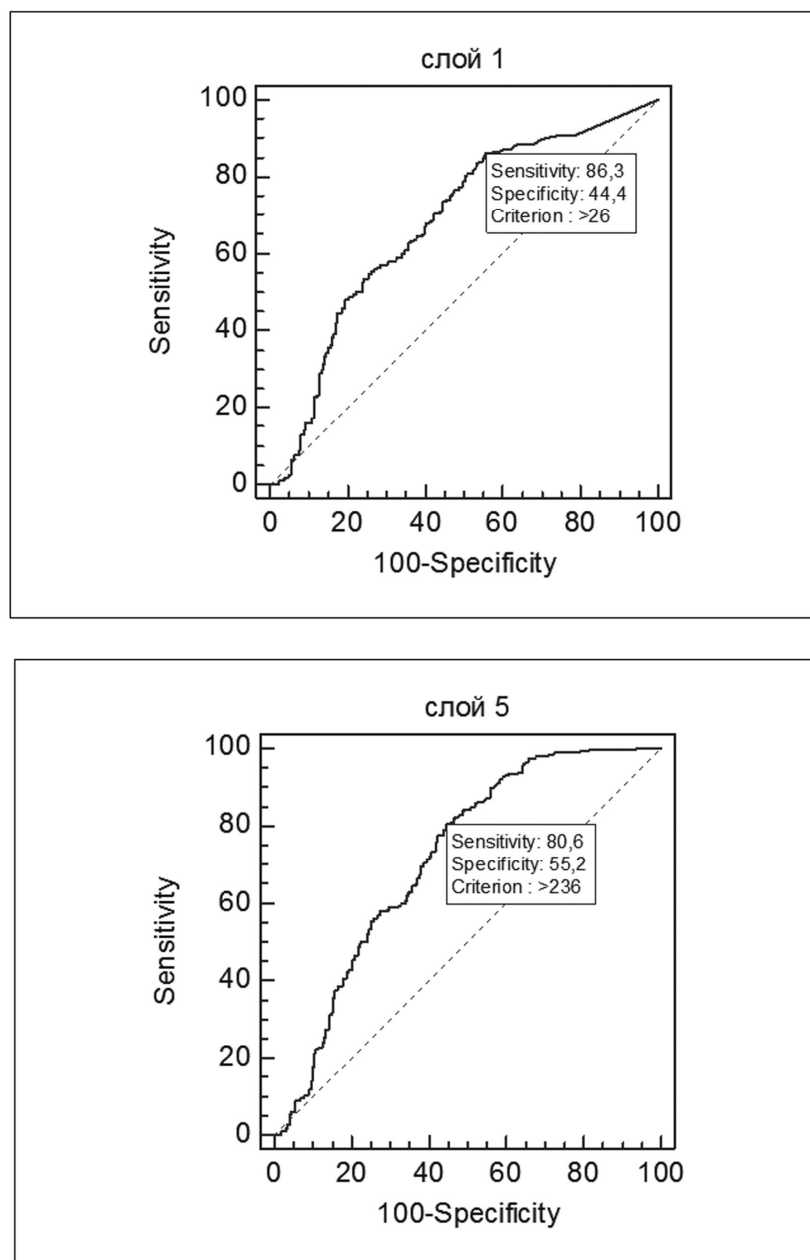


Рисунок 26 – ROC-кривые, построенные для определения чувствительности и специфичности метода оценки тинкториальных свойств нервной ткани с помощью изучения распределения пикселей в гистограммах цветных изображений теменной коры головного мозга человека. Слой I – AUC = 0,68 (95 % ДИ: 0,64–0,72), $p < 0,0001$; слой V – AUC = 0,72 (95 % ДИ: 0,68–0,76), $p < 0,0001$. AUC – площадь под кривой. Уровень p – в сравнении с диагональю

Таким образом, доказано существование статистически значимых различий тинкториальных свойств нервной ткани из группы контроля и группы сравнения.

Цветные гистограммы (при окраске гематоксилином/эозином) могут быть использованы для более точного объективного изучения тинкториальных свойств нейронов, их отростков и нейропиля. По палитре цветного изображения и распределению пикселей можно судить о степени базо- и эозинофилии структур нервной ткани, а, следовательно, проводить сравнение для дискриминации нервной ткани по ее тинкториальным свойствам. Необходимость этого обусловлена тем, что говорить о «структурно-функциональном» состоянии можно только при исследовании биопсийного (прижизненно взятого) материала КГМ. Например, разных зон ишемической полутени. Поэтому при гистологических исследованиях нейронные популяции аутопсийного и биопсийного материала по содержанию нормохромных, гиперхромных, гипохромных нейронов и клеточек-теньей сравнивать методологически неверно.

3.3.2 Кора головного мозга при хронической ишемии

При хронической ишемии (основная группа) в зоне ишемической полутени в одном блоке ткани КГМ выявлялись различные комбинации патологически измененных и неизмененных участков, что позволяло провести их сравнение по гистограммам пиксельного распределения. Патологически измененные участки КГМ содержали большое количество реактивно измененных нейронов (рисунок 27). Преобладали нейроны с тинкториальными изменениями по типу гиперхромии. Степень гиперхромии значительно варьировала. Максимально выражена была в пикноморфных клетках с крайней степенью дегидратации.

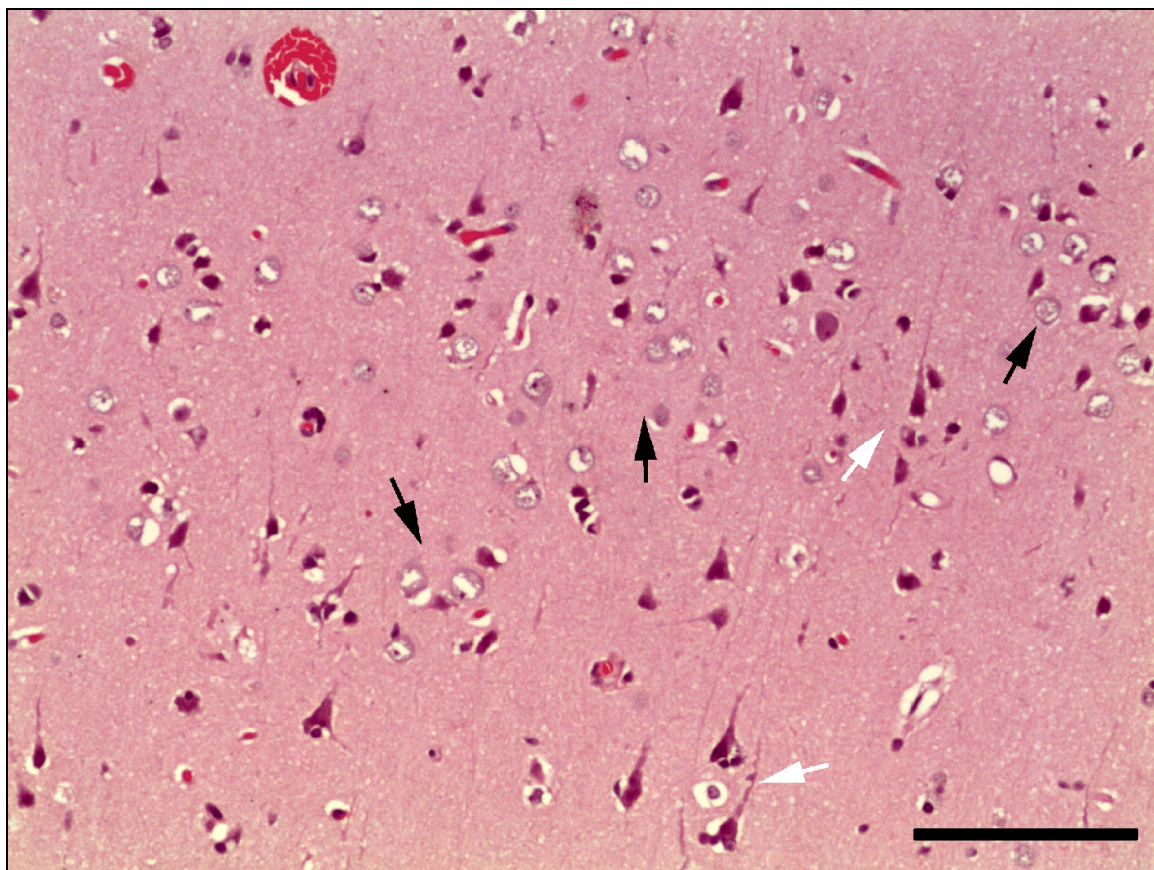


Рисунок 27 – Неповрежденные (черные стрелки) и реактивно измененные (белая стрелка) нейроны, височная кора головного мозга, слои II–IIIa, биопсия. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм

Гистограммы пиксельного состава цветных изображений неповрежденных и поврежденных участков имели идентичные и существенно отличающиеся зоны. Неповрежденные участки коры из основной группы по гистограммам изображений были сопоставимы с таковыми из группы сравнения.

Наложение друг на друга гистограмм нейропиля, неизменных и реактивно измененных нейронов показало, что максимально различалась зона от 121 до 151 значений шкалы (0–255), преимущественно отражающая пиксели соответствующие нейронам. При этом значения моды на сравниваемых участках не отличались (рисунок 28).

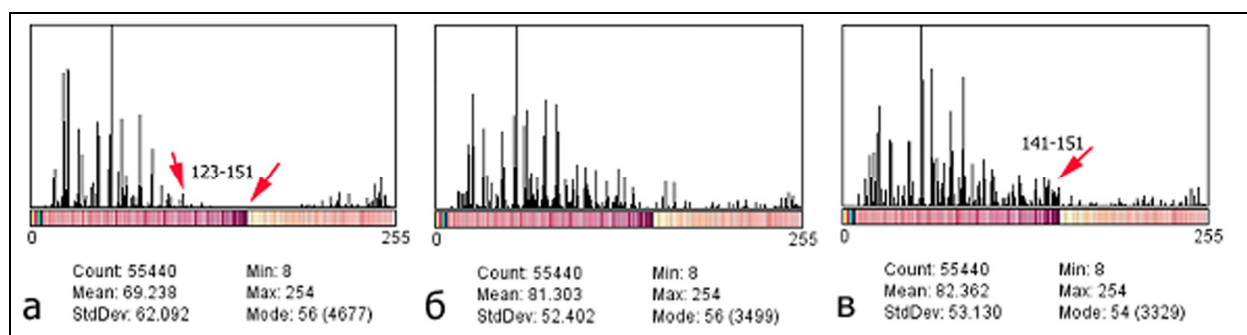


Рисунок 28 – Гистограммы пиксельного состава изображений различных участков поля зрения слоя II височной коры головного мозга (поле 21) человека при хронической ишемии (биопсийный материал): а – нейропил, б – интактные нейроны, в – гиперхромные нейроны

Ниже представлен фрагмент (121–151) гистограммы, отражающий тинкториальные свойства недегидратированного базофильного вещества нормохромных нейронов и дегидратированного базофильного вещества гиперхромных сморщенных нейронов (рисунок 29).

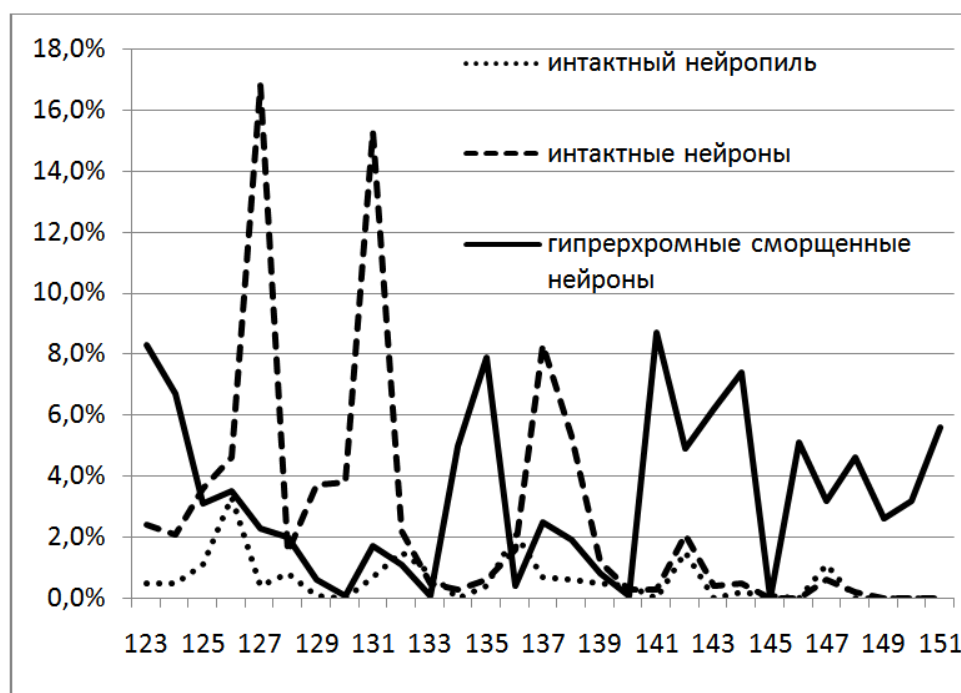


Рисунок 29 – Фрагмент гистограммы (рисунок 27в) изображения коры, отражающий тинкториальные свойства нормохромных нативных (пики 127 и 131) и гиперхромных дегидратированных сморщенных (пики 141, 143 и 146) нейронов

Таким образом, по данным распределения пикселей на цветных изображениях в палитровом формате (256 цветов) можно определить соотношение нормохромных и гиперхромных нейронов в различных участках КГМ, а также их тинкториальные свойства, при хронической ишемии. Для этого нужно провести изучение участка гистограммы от 120 до 151 по представленной выше шкале.

Нейропиль является губчато-волокнутой субстанцией, состоящей из нервных отростков и синапсов, окрашивающейся преимущественно эозином. Построение гистограмм позволило показать, что нейропиль отражался на них двумя зонами: 7–120 и 193–253 значения шкалы. Зона 7–120 отражала более интенсивно окрашенные эозином миелинизированные волокна, зона 193–253 – светлые участки нейропиля, а зона 152–192 – межклеточное пространство. В пользу этого свидетельствовало то, что в зонах отека-набухания нейропиля гистограмма имела отличную от интактной структуру (больше ярких пикселей) (рисунок 30).

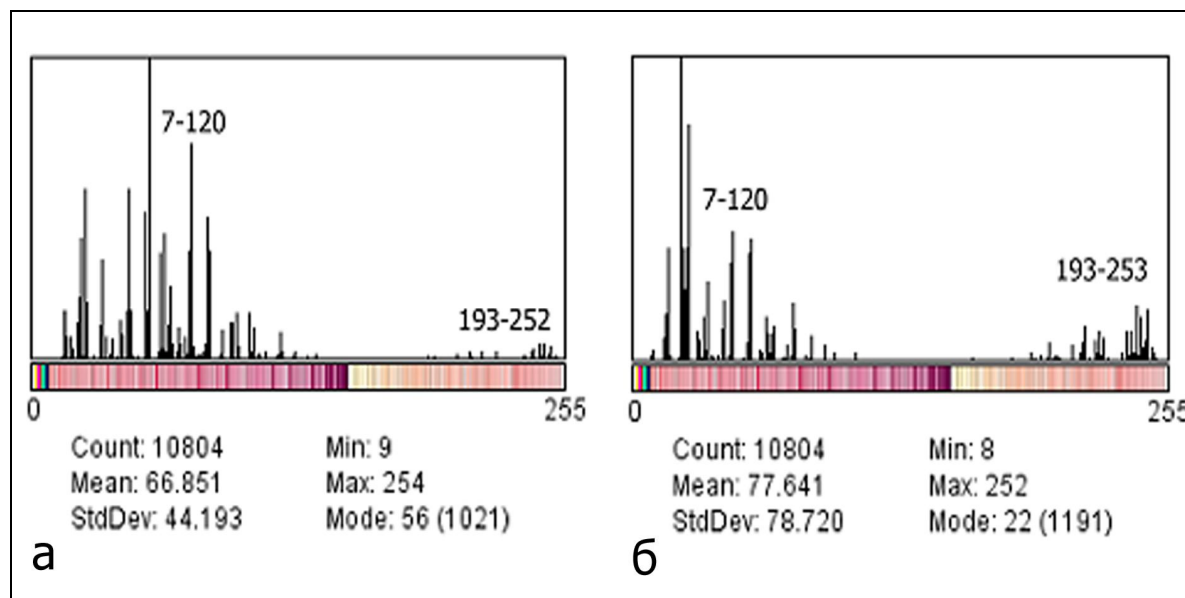


Рисунок 30 – Гистограммы пиксельного состава изображений различных участков нейропиля поля зрения слоя II височной коры головного мозга (поле 21) человека при хронической ишемии (биопсийный материал): а – интактный нейропиль, б – нейропиль с умеренными проявлениями отека-набухания (незначительное просветление)

Найденные особенности представления нейропиля на гистограммах позволили проводить оценку структурно-функционального состояния нервной ткани КГМ с определением степени проявления отека-набухания. При выраженном отеке-набухании ткани существенно увеличивалось количество ярких пикселей (193–253) исследуемой палитры нейропиля и межклеточного пространства (152–192) (рисунок 31).

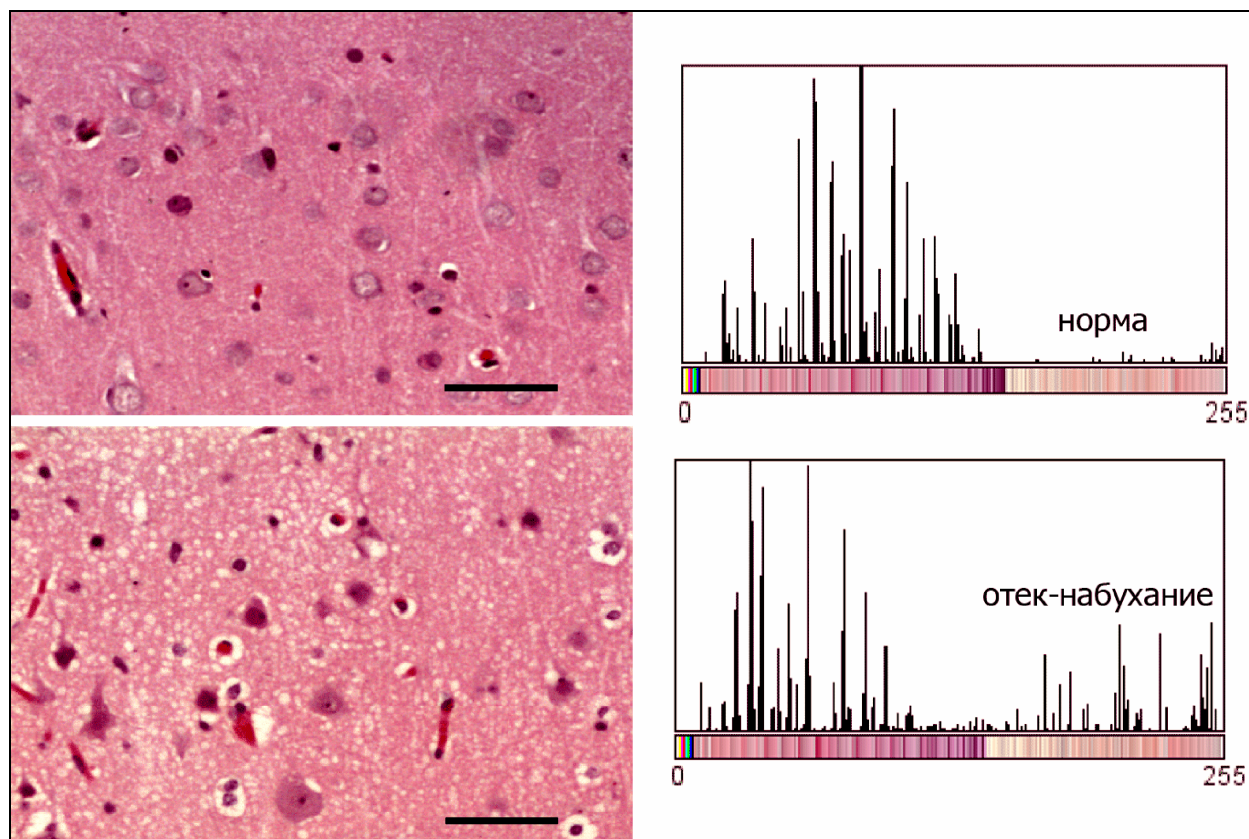


Рисунок 31 – Изображения различных участков слоя II височной коры головного мозга (поле 21) человека при хронической ишемии (биопсийный материал) и их гистограммы. Шкала – 50 мкм

Использование полученных данных для морфометрического исследования серии полей зрения КГМ позволило очень точно показать, что при хронической ишемии в зонах повреждения нервной ткани отмечались выраженные проявления отека-набухания, сопровождающиеся статистически значимым уменьшением относительной площади нейронов и увеличением площади межклеточного пространства (таблица 9).

Таблица 9 – Относительная площадь нейропиля, клеток и межклеточного пространства в поле зрения ($n = 120$) височной коры головного мозга человека основной группы и группы сравнения, окраска гематоксилин-эозином

Объект	Группа сравнения	Основная группа
Нейропиль, %	79,2 (69,9–86,7)	67,7 (57,6–76,7) $\chi^2 = 3,5; p = 0,06$
Нейроны, %	10,1 (5–17,7)	2,4 (0,4–7,6) $\chi^2 = 4,8; p = 0,03^*$
Межклеточное пространство, %	10,7 (5,4–18,5)	29,9 (21,2–39,8) $\chi^2 = 12,5; p = 0,0004^*$
* Различия статистически значимы в сравнении с нормой при $p < 0,05$ (критерий χ^2).		

Таким образом, гистограммы пиксельного распределения на цифровых изображениях интактной и патологически измененной коры головного мозга при хронической ишемии (биопсия) позволили получить новые объективные данные для оценки ее структурно-функционального состояния.

3.4 Морфометрическое исследование нейронов коры головного мозга в норме и при хронической ишемии

При гистологическом исследовании зоны хронической ишемической полутени КГМ основной группы выявлена значительная вариабельность структурно-функционального состояния пирамидных и непирамидных нейронов. Выявлялись все классические типы реактивно (ишемически) измененных клеток (рисунки 32–34).

Нормохромные пирамидные нейроны при окраске по Нисслю представляли собой округлые клетки крупного и среднего размера с хорошо прокрашенной сомой и ядром. 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 в непирамидных нейронах дендриты не контрастировались,

а в пирамидных – контрастировались только начальные сегменты проксимальной части дендрита (рисунки 32а, 33а).

Реактивно и деструктивно измененные клетки (гиперхромные несморщенные и сморщенные, гипохромные нейроны, реже клетки-тени, фагоцитируемые нейроны) зоны ишемической полутени КГМ человека имели типичную структурную организацию, описанную ранее в работах других авторов при острой и хронической ишемии.

Гиперхромные несморщенные пирамидные нейроны интенсивно окрашивались, что свидетельствовало об изменении их тинкториальных свойств. При этом 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 этих клеток (рисунки 32б и 33а).

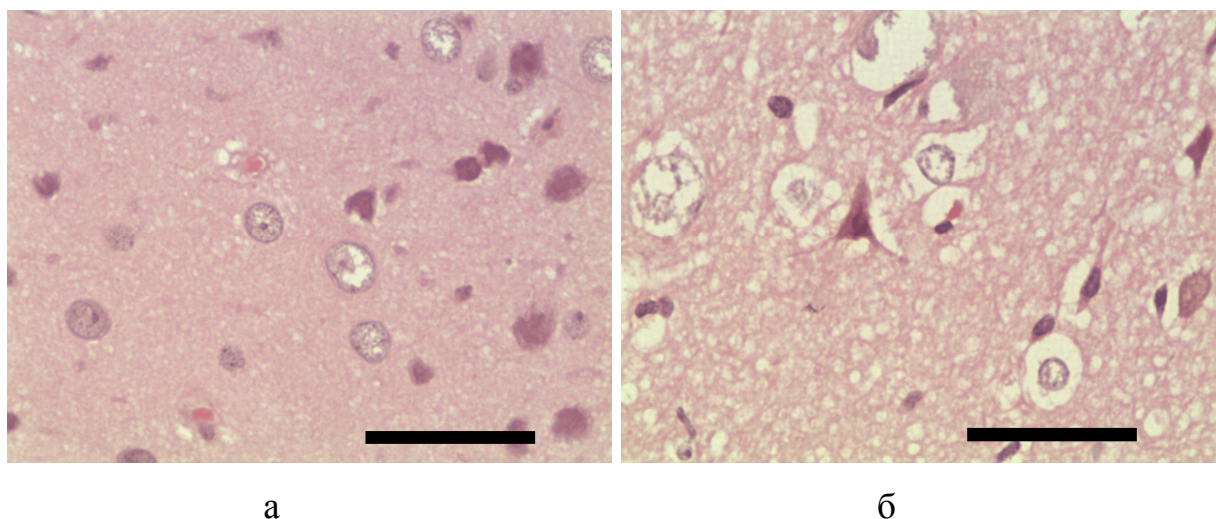


Рисунок 32 – Нейроны слоя IIIа в зоне хронической ишемической полутени ВКГМ, больной П-в: а – участок преобладания нормохромных нейронов и гиперхромных несморщенных нейронов; б – гиперхромные нейроны с выраженными проявлениями дегидратации, сморщиванием клеток и гипохромные нейроны, отек-набухание ядра и цитоплазмы. Окраска гематоксилином и эозином.

Ув. х400, шкала 50 мкм

В части гиперхромных клеток наблюдались очаги хроматолиза, вакуолизация, ядра уменьшались в объеме и смещались на периферию. Сморщенные гиперхромные нейроны имели веретенообразную форму (рисунки 33в, 34б, 34в), что свидетельствовало о крайней степени дегидратации их цитоплазмы и ядра. Интенсивно окрашенные извитые отростки прослеживались на значительном расстоянии, цитоплазма и ядро клеток гомогенизированы, интенсивно окрашены (рисунок 33в, 34б, 34в).

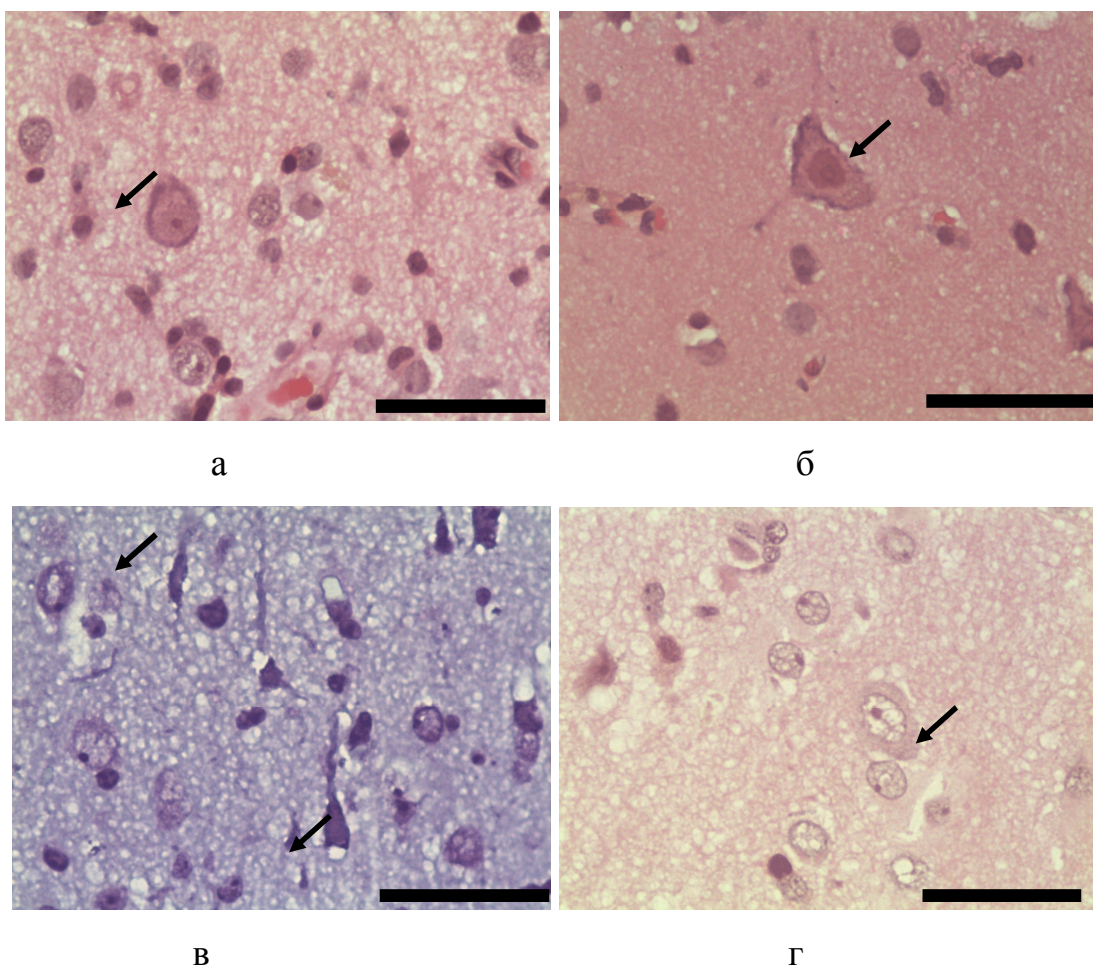
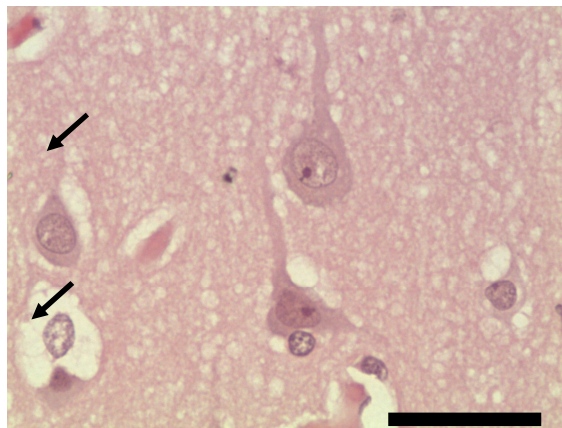
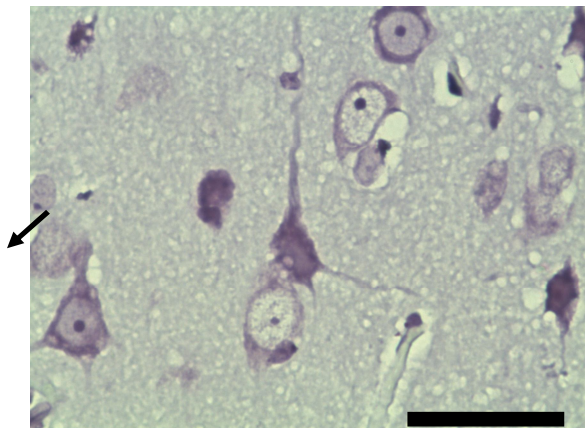


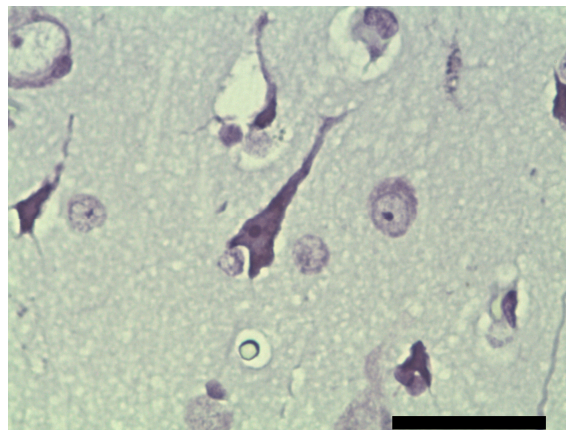
Рисунок 33. Нейроны слоя IIIв в зоне хронической ишемической полутени ТКГМ: а – участок преобладания нормохромных нейронов, умеренная реакция глии; б – гиперхромные нейроны с начальными проявлениями дегидратации по периферии цитоплазмы; в – гиперхромные нейроны с выраженными проявлениями дегидратации и сморщиванием клеток; г – гипохромные нейроны, набухание ядра. а, б, г – окраска гематоксилином и эозином, в – окраска по Нисслю тионином. Ув. х400, шкала 50 мкм



а



б



в

Рисунок 34. Пирамидные нейроны слоя V в зоне хронической ишемической полутени ВКГМ, больной Р-в: а – гиперхромные нейроны с начальными проявлениями дегидратации цитоплазмы, перичеселлюлярный отек; б – гиперхромные нейроны с выраженными проявлениями дегидратации и сморщиванием клеток; в – гиперхромный сморщенный нейрон с картиной фагоцитоза. а – окраска гематоксилином и эозином, б, в – окраска по Нисслю тионином. Ув. х400, шкала 50 мкм

Необходимо отметить, что относительное содержание реактивно измененных нейронов существенно отличалось в разных участках зоны ишемической полутени (рисунки 35, 36).

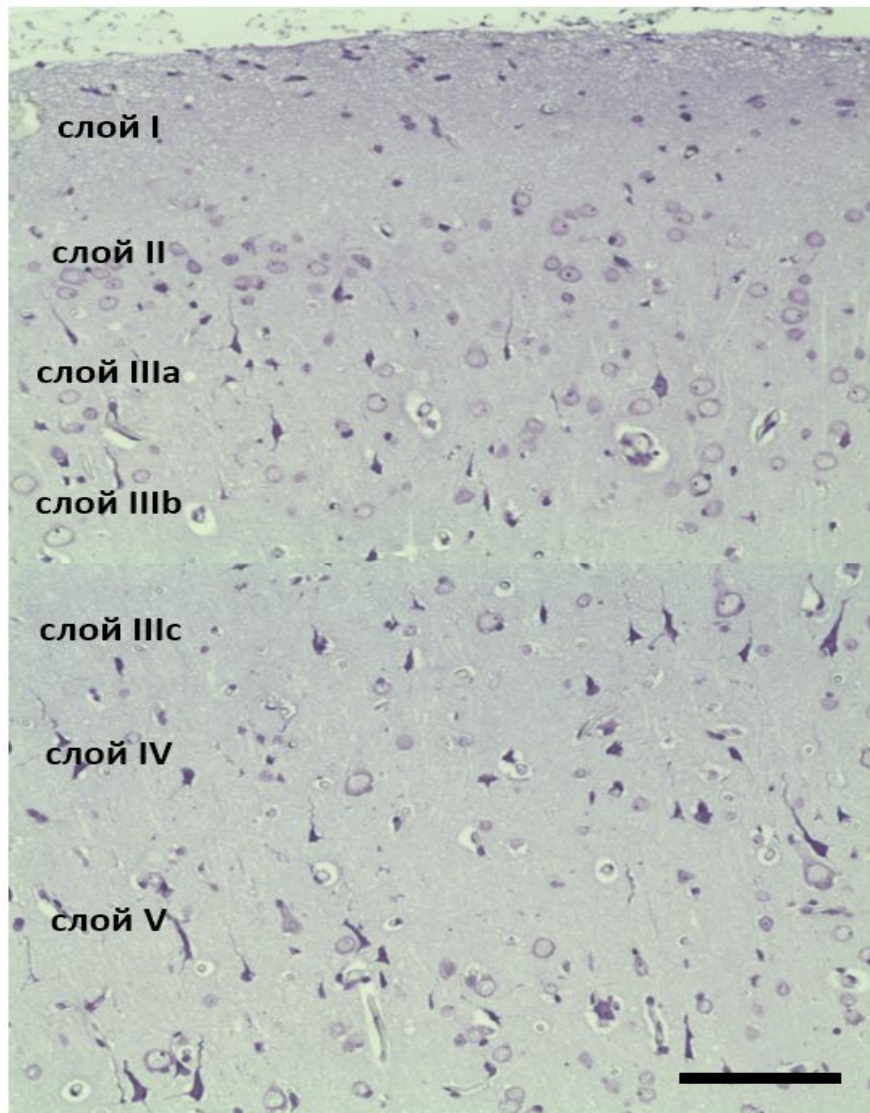


Рисунок 35 – Участок зоны хронической ишемической полутени в ВКГМ с незначительным содержанием реактивно измененных нейронов, больной Р-в. Во всех слоях преобладали нормохромные нейроны. Окраска по Нисслю тионином. Ув. x100, шкала 100 мкм

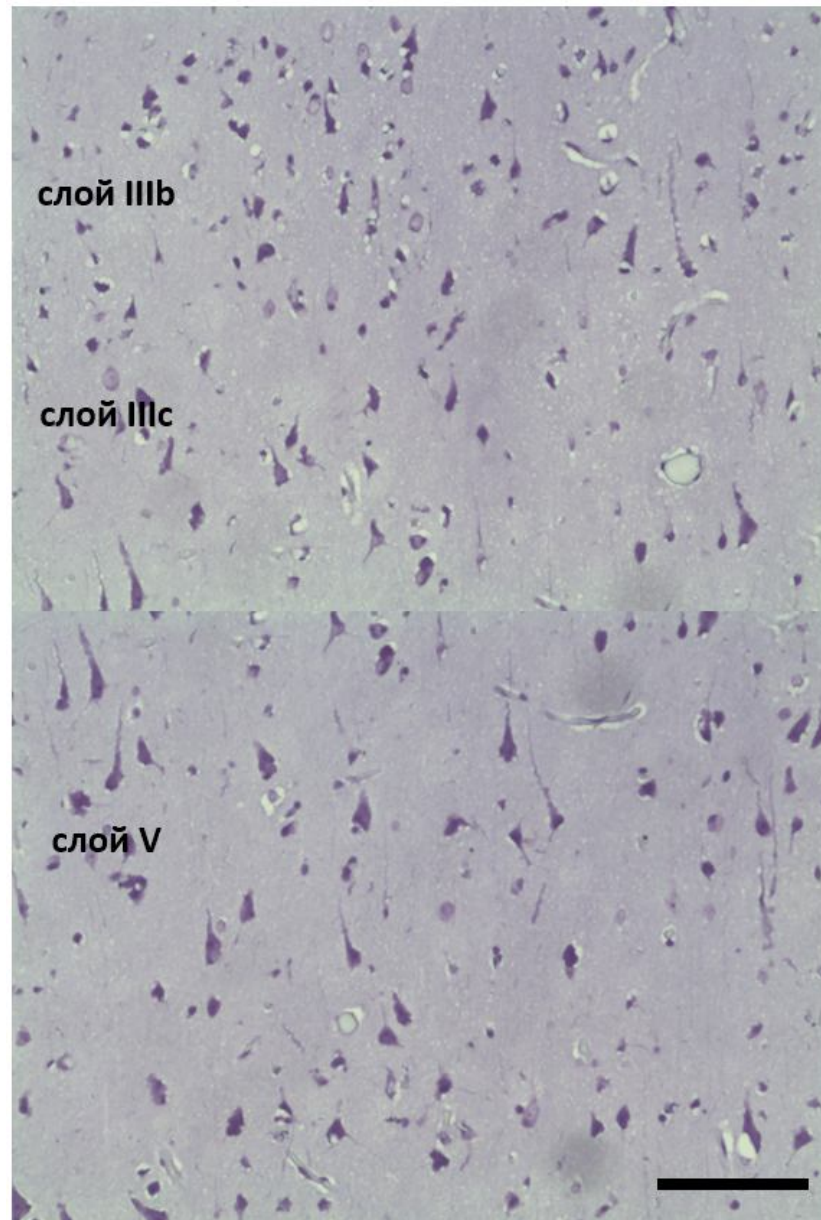


Рисунок 36 – Участок реактивно измененных нейронов в зоне хронической ишемической полутени ВКГМ, больной Р-в. Во всех слоях преобладали гиперхромные сморщенные нейроны. Окраска по Нисслю тионином.

Ув. x100, шкала 100 мкм

Крайними вариантами были:

- 1) высокое содержание в полях зрения нормохромных нейронов;
- 2) тотальные гиперхромные изменения со сморщиванием практически всех клеток, при полном отсутствии нормохромных нейронов.

Последний вариант отражал состояние нейронов при выраженной ишемии. Вероятно, выявленная «очаговость» зоны ишемической полутени обусловлена различным уровнем локальных ишемических нарушений в ней. В КГМ из группы сравнения подобные ишемические изменения нейронов практически не выявлялись, а плотность нейронов была визуально выше (рисунок 37).

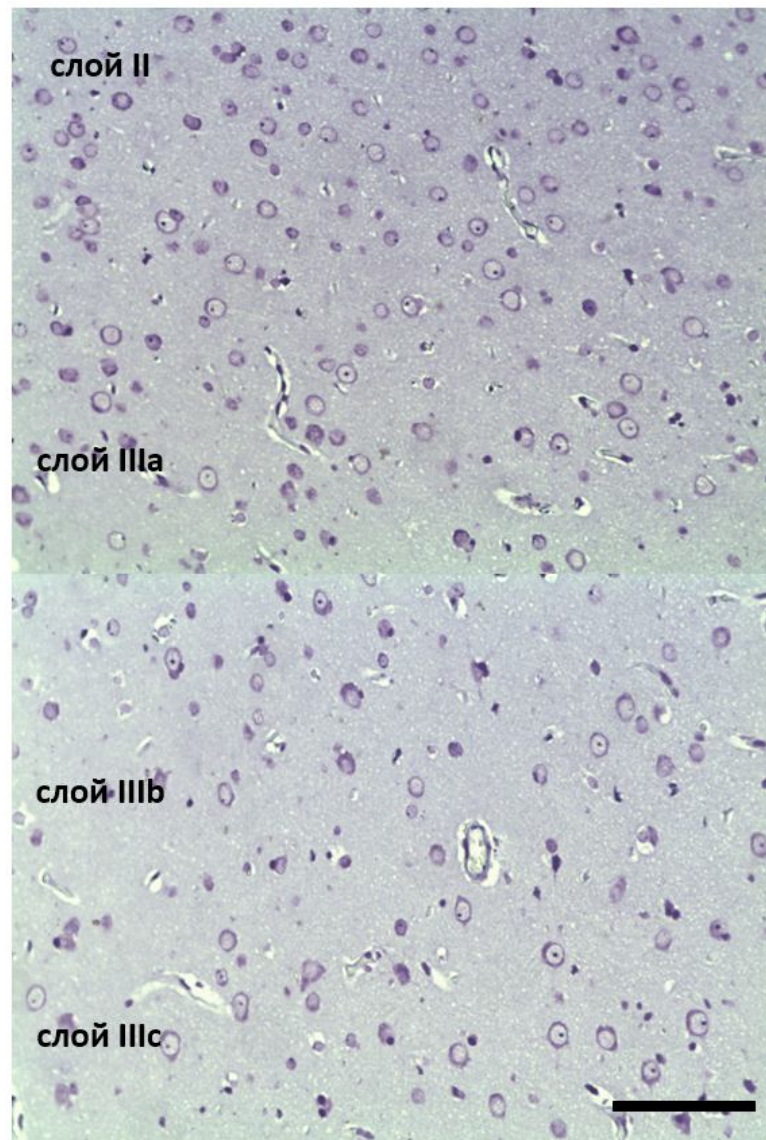


Рисунок 37 – Участок ВКГМ с незначительным содержанием реактивно измененных нейронов, больной П-в, группа сравнения. Во всех слоях преобладали нормохромные нейроны. Окраска по Нисслю тионином.

Об. x10, шкала 100 мкм

Морфометрическое исследование нейронов мы проводили в группе сравнения и в участках зоны ишемической полутени КГМ основной группы, содержащих типичные нормохромные нейроны и реактивно измененные нейроны (таблицы 10–13).

Таблица 10 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм²) различных слоев ЛКГМ человека (биопсийный материал), *Me (Ql-Qh)*

Слои	Группы		<i>p</i> -уровень
	Сравнения	Основная	
I	134 (118–143)	112 (97–135)	> 0,05
II	498 (442–535)	456 (410–522)	> 0,05
IIIa	417 (365–512)	368 (343–404)	= 0,032*
IIIb	389 (344–435)	314 (286–333)	= 0,01*
IIIc	312 (266–321)	278 (254–289)	= 0,05
IV	523 (489–587)	432 (389–498)	= 0,01*
V	205 (187–285)	168 (123–210)	= 0,045*
VI	255 (226–426)	234 (205–256)	> 0,05
* Различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).			

Таблица 11 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм²) различных слоев ТКГМ человека (биопсийный материал), *Me (Ql-Qh)*

Слои	Группы		<i>p</i> -уровень
	Сравнения	Основная	
I	138 (125–154)	127 (111–136)	> 0,05
II	554 (486–614)	487 (453–502)	= 0,03*
IIIa	345 (287–362)	302 (256–311)	= 0,042
IIIb	326 (289–352)	278 (245–296)	= 0,01*
IIIc	201 (157–211)	187 (134–208)	> 0,05
IV	512 (478–523)	418 (387–480)	= 0,01*

Слои	Группы		<i>p</i> -уровень
	Сравнения	Основная	
V	256 (218–289)	212 (158–234)	= 0,042*
VI	308 (254–325)	289 (234–312)	> 0,05
* Различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).			

Таблица 12 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм²) различных слоев ВКГМ человека (биопсийный материал), *Me (Ql-Qh)*

Слои	Группы		<i>p</i> -уровень
	Сравнения	Основная	
I	145 (120–160)	122 (109–172)	> 0,05
II	672 (545–912)	503 (445–589)	= 0,01*
IIIa	360 (325–395)	300 (244–322)	= 0,045*
IIIb	300 (220–355)	278 (212–308)	> 0,05
IIIc	240 (195–262)	232 (225–270)	> 0,05
IV	542 (480–635)	469 (422–501)	= 0,01*
V	268 (245–340)	204 (154–237)	= 0,02*
VI	312 (302–380)	286 (243–301)	= 0,045*
* Различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).			

Таблица 13 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм²) различных слоев ЗКГМ человека (биопсийный материал), *Me (Ql-Qh)*

Слои	Группы		<i>p</i> -уровень
	Сравнения	Основная	
I	136 (121–152)	112 (101–134)	> 0,05
II	525 (475–554)*	434 (402–475)*	= 0,02*
IIIa	423 (387–490)	408 (326–455)	> 0,05
IIIb	385 (312–415)	344 (301–352)	> 0,05
IIIc	282 (241–314)	260 (206–301)	> 0,05
IV	578 (533–604)*	457 (433–512)	= 0,01*

Слои	Группы		<i>p</i> -уровень
	Сравнения	Основная	
V	236 (196–276)	192 (154–195)	= 0,046*
VI	397 (333–415)	354 (342–408)	= 0,03*
* Различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).			

Именно эти участки, по данным литературы, имеют наибольшие потенциальные возможности структурно-функционального восстановления после устранения причины хронической ишемии.

Для сравнения ОЧПН в основной группе и группе сравнения использовали критерий Манна-Уитни. Проверялась нулевая гипотеза об отсутствии различий ОЧПН в норме и при хронической ишемии. Было установлено, что в изученных участках зоны ишемической полутени ОЧПН была статистически значимо ниже, чем в группе сравнения КГМ.

На первом этапе содержание реактивно измененных нейронов подсчитывали с помощью программы ImageJ 1.46 в КГМ основной группы и группы сравнения суммарно во всех отделах и слоях (таблица 14).

Из таблицы 14 видно, что основную часть реактивно измененных нейронов при хронической ишемии в основной группе составляли гиперхромные несморщенные и сморщенные нейроны – 11,9–16,3 % и 21,4–26,8 % соответственно. В сумме они составляли 38 % (ДИ: 35–41,1 %). Поэтому именно эти нейроны было целесообразно использовать для проверки нулевой статистической гипотезы об отсутствии различий реакции слоев КГМ на хроническую ишемию.

Таблица 14 – Относительное содержание (% в пересчете на 1000 верифицированных нейронов, 50 полей зрения) реактивно измененных нейронов коры головного мозга человека (биопсийный материал)

Нейроны	Группа		<i>p</i> -уровень
	Сравнения	Основная	
Нормохромные, %	85,6 (83,8–93,9)	45 (41,9–48,1)	< 0,0000*
Вакуолизированные, %	2,4 (1,6–3,6)	6 (4,6–7,7)	= 0,04*
Гипохромные, %	2 (1,3–3,1)	8 (6,4–9,9)	= 0,02*
Гиперхромные несморщенные, %	8 (6,4–9,9)	14 (11,9–16,3)	= 0,03*
Гиперхромные сморщенные, %	1 (0,5–1,8)	24 (21,4–26,8)	< 0,0000*
Клетки тени, %	1 (0,5–1,8)	3 (2,0–4,3)	= 0,045*
* Различия статистически значимы в сравнении с контролем при $p < 0,5$ (критерий χ^2); Примечание – 95 % доверительный интервал указан в скобках.			

Выявлены статистически значимые различия содержания гиперхромных сморщенных нейронов в верхнем (слои II–III) и нижнем этажах КГМ. Наименьшее содержание реактивно измененных нейронов отмечалось в слоях II, IIIa и IIIb (таблица 15). Именно в этих слоях, по данным литературы, отмечается максимальное количество тормозных интернейронов, содержащих кальбиндин. Следовательно, нулевая гипотеза об отсутствии различий реорганизации цитоархитектоники при хронической ишемии успешно была отвергнута.

Таблица 15 – Относительное содержание (% в пересчете на 500 верифицированных нейронов, 50 полей зрения) гиперхромных нейронов в различных слоях коры головного мозга человека основной группы

Слои	Морфотип нейронов	
	Несморщенные, %	Сморщенные, %
II	10,2 (7,7–13,2)	12,0 (9,3–15,2)
IIIa	13,4 (10,5–16,7)	18,2 (14,9–21,9)
IIIb	14,5 (11,5–17,9)	28,4 (24,5–32,6)

Слои	Морфотип нейронов	
	Несморщенные, %	Сморщенные, %
IIIc	17,1 (13,9–20,7)	35,3 (31,1–39,7)^
Среднее по слоям II–III	13,8 (10,9–17,1)	23,5 (19,9–27,5 %)
IV	20,2 (16,8–24); $\chi^2 = 0,3, p = 0,6$	44,4 (40–48,9); $\chi^2 = 4,0, p = 0,046^*$
V	24,6 (20,9–28,6); $\chi^2 = 1,5, p = 0,3$	52,9 (48,4–57,3); $\chi^2 = 8,0, p = 0,005^*$
VI	12,3 (9,6–15,5); $\chi^2 = 0,0, p = 0,9$	32,8 (28,7–37,1); $\chi^2 = 0,7, p = 0,4$
* Различия статистически значимы в сравнении со средним показателем верхнего этажа КГМ (слои II–III) при $p < 0,05$ (критерий χ^2). ^ Различия статистически значимы в сравнении со слоем II при $p = 0,01$ (критерий χ^2). Примечание – 95 % доверительный интервал указан в скобках.		

Таким образом, по данным гистологического морфометрического изучения нейронов КГМ основной группы, установлено, что, в части участков зоны хронической ишемической полутени происходила деструкция и выпадение только 15–30 % нейронов, а 20–50 % сохранившихся нейронов имели признаки реактивных изменений. Больше всего таких нейронов выявлялось в слоях IIIc, IV и V. Преобладали гиперхромные сморщенные (пикноморфные) нейроны, являющиеся проявлением коагуляционных дегенеративных процессов при ишемии. Эти клетки имели веретенообразную форму и небольшие размеры, их интенсивно окрашенные отростки извиты и прослеживались на значительном расстоянии. Цитоплазма таких клеток гомогенизирована, интенсивно окрашена, в ряде случаев не просматривалась граница ядра. Вероятность выхода таких нейронов из патологического состояния минимальна. Остальные нейроны – гиперхромные несморщенные и типичные нормохромные – сохраняли структуру ядра и цитоплазмы несмотря на тинкториальные изменения. Вероятно, именно за счет этих нейронов происходило функционирование и структурно-функциональное восстановление поврежденных нейронных сетей КГМ. Поэтому в последующем иммуногистохимическом исследовании нами использовались серийные срезы КГМ основной группы, содержащие нормохромные и патологически измененные (гиперхромные несморщенные и пикноморфные)

нейроны. Для проверки статистических гипотез использовали срезы КГМ группы сравнения и контроля, содержащие только нормохромные и гиперхромные несморщенные нейроны.

3.5 Морфометрическое исследование нейроглии коры головного мозга в норме и при хронической ишемии

Клетки нейроглии в КГМ изучались с помощью иммуногистохимической реакции на GFAP. Типичные глиальные клетки выявлялись во всех слоях изученных долей КГМ (рисунок 38).

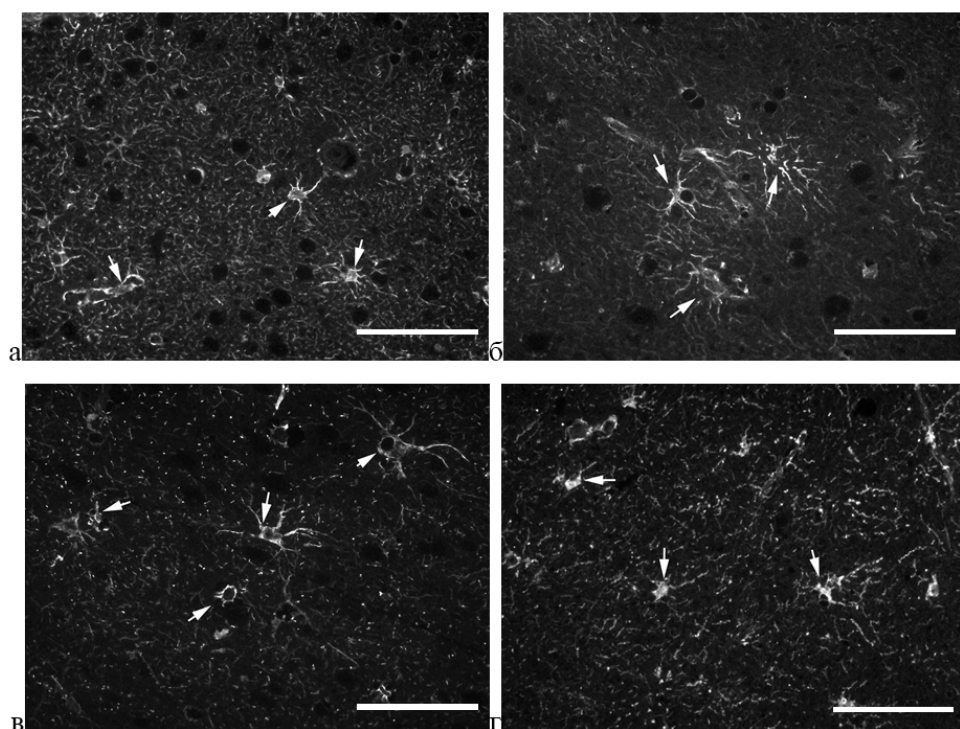


Рисунок 38 – Глиальные клетки (стрелки) из слоя III лобной (а), теменной (б), височной (в) и затылочной (г) коры головного мозга человека основной группы. Высокая плотность клеточных тел и отростков вокруг нейронов (пустые темные пятна). Иммуногистохимическое окрашивание GFAP (маркер глиоцитов).

Ув. x400, шкала 50 мкм

Вокруг реактивно измененных нейронов наблюдались отдельные глиальные клетки, которые не разрушали переживающие нейроны. В случае необратимого

деструктивного повреждения нейронов часть сателлитов приобретала функцию фагоцитов, которые разрушали поврежденные пикноморфные нейроны.

Все это свидетельствовало о существовании в зоне ишемической полутени определенного баланса между реактивно измененными нейронами и глиальными клетками. При этом активация глиальных клеток направлена на защиту и восстановление поврежденных нейронов, а также последующую компенсаторно-восстановительную реорганизацию межнейронных отношений КГМ.

При очаговых деструктивных изменениях в зоне ишемической полутени отмечались скопления глиальных клеток вплоть до выраженного глиоза с последующим разрушением гиперхромных сморщенных нейронов.

С помощью программы ImageJ 1.46 создавали маски (бинарное изображение) и в автоматическом режиме определяли площадь частиц, соответствующих расположению маркеров GFAP (рисунки 39, 40).

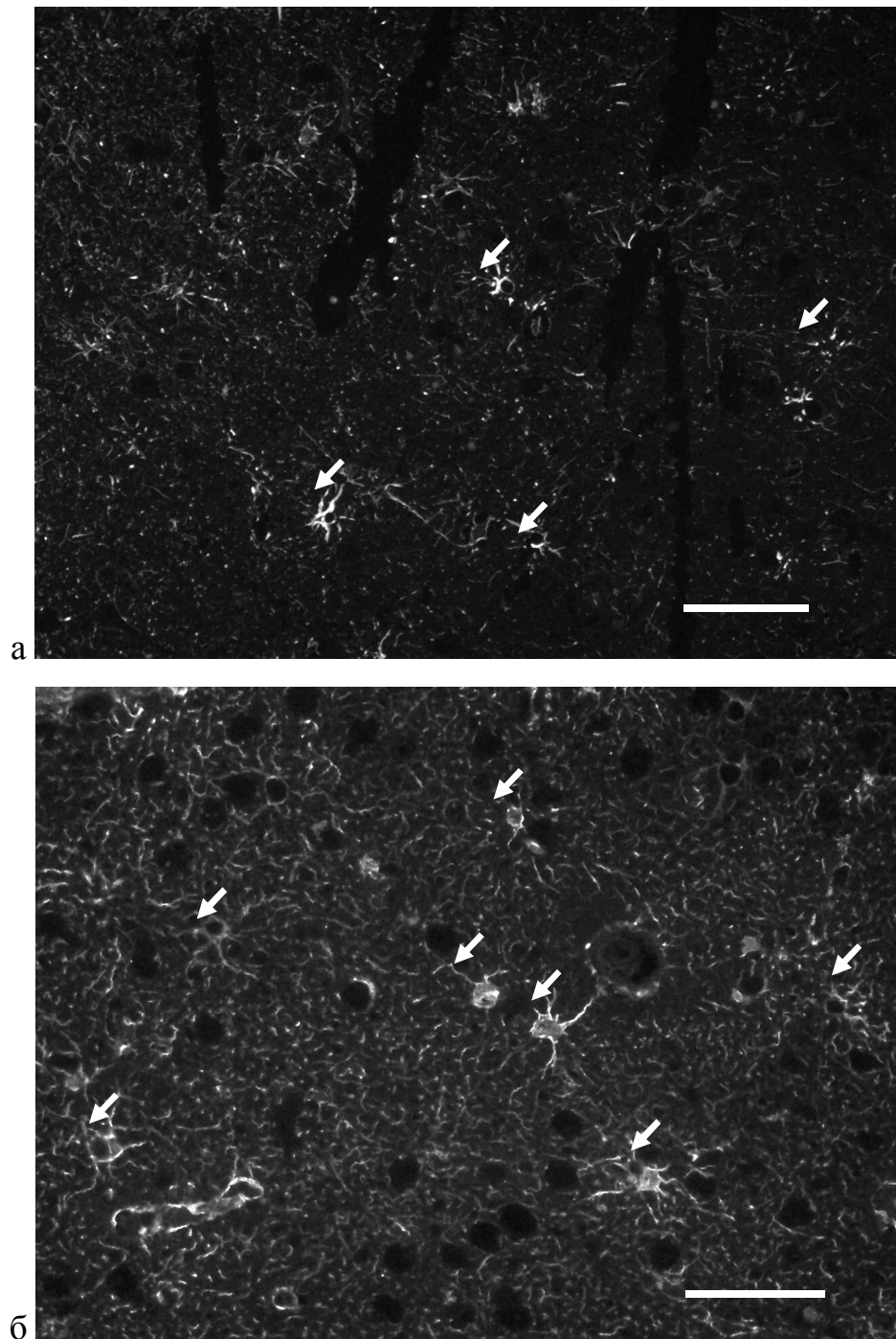


Рисунок 39 – Глиальные клетки (стрелки) коры головного мозга человека группы сравнения (а) и основной группы (б). Увеличение плотности клеточных тел и отростков при хронической ишемии вокруг нейронов (пустые темные пятна). Иммуногистохимическое окрашивание GFAP (маркер глиоцитов).

Ув. x200, шкала 50 мкм

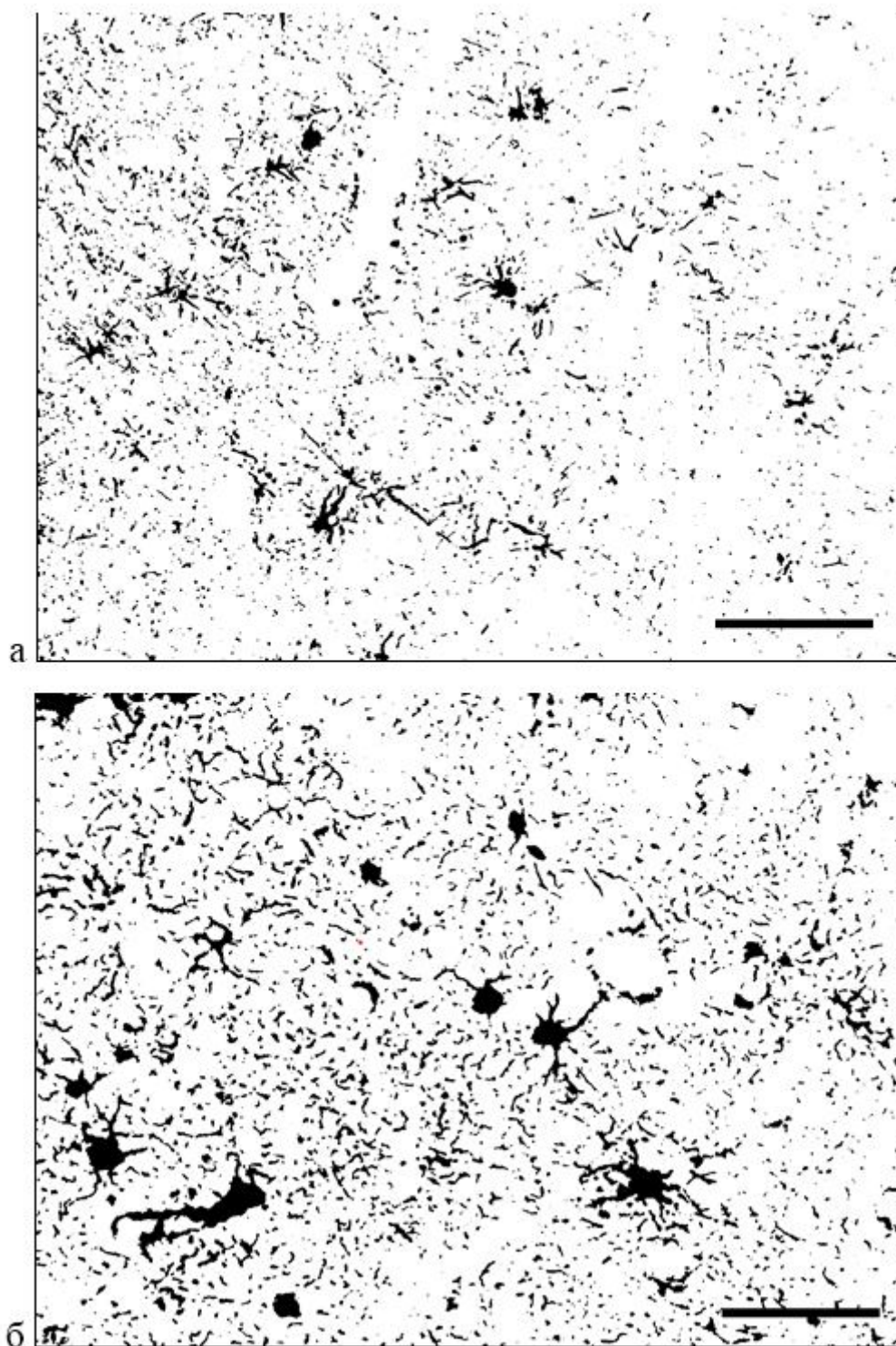


Рисунок 40 – Маски изображений (см. рисунок 39) для определения относительной площади маркера GFAP

По данным морфометрического исследования GFAP-позитивных клеток в 500 полях зрения (все доли и слои) КГМ, установлено, что в зоне ишемической

полутени (основная группа) площадь (в поле зрения) частиц маркера (11,4 %, ДИ 8,7–14,5 %) была статистически значимо выше (критерий $\chi^2 = 5,5$, $p = 0,003$), чем в группе сравнения (5,9 %, ДИ 4–8,3 %) в 1,93 раза.

Таким образом, по данным светооптического исследования, установлено, что хроническая ишемия приводила к выраженным изменениям тинкториальных свойств, формы и количества нейронов во всех изученных слоях КГМ человека. Имелись специфические особенности этих изменений в различных долях и слоях коры. Выявлялись типичные для хронической ишемии реактивно измененные нейроны, пикноморфные клетки, фигуры фагоцитоза необратимо поврежденных нейронов. В КГМ основной группы преобладали гиперхромные и пикноморфные нейроны. На этом фоне сохранялось значительное количество нормохромных нейронов без признаков реактивных изменений структуры ядра и цитоплазмы, а также их тинкториальных свойств. Именно эти нейроны в конечном итоге определяли исход компенсаторной реорганизации тормозных и возбуждающих систем КГМ при хронической ишемии. Изменения нейронов сопровождались активацией нейроглиальных клеток.

ГЛАВА 4 ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗБУЖДАЮЩИХ И ТОРМОЗНЫХ НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ

В предыдущей главе показано, что при длительной хронической ишемии, обусловленной наличием опухоли, отмечалась статистически значимая редукция ОЧПН и увеличение содержания реактивно измененных клеток (преимущественно гиперхромных несморщенных и сморщенных) во всех изученных полях и слоях КГМ основной группы. Наряду со снижением ОЧПН, происходит изменение структурно-функционального состояние переживающих нейронов. Закономерности этих изменений возможно изучить, используя иммуногистохимические маркеры белковых структур нейронов.

Наличие NSE (нейронспецифическая енолаза) позволяет оценить количество функционально активных нейронов по проявлениям активности процессов гликолиза, протекающего в исследуемых срезах КГМ при ишемии. NSE-позитивные гранулы располагались в виде доступных для подсчета крупных агломератов, которые соответствовали нейронам (рисунок 41).

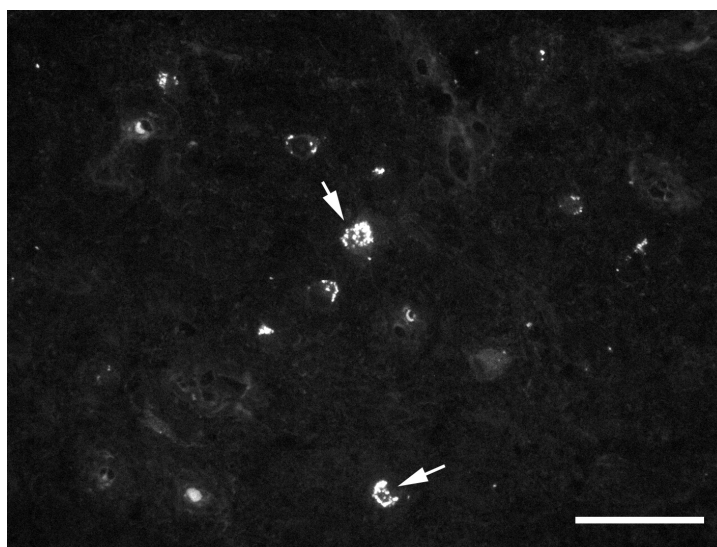


Рисунок 41 – NSE-позитивные нейроны (стрелки) слоя III лобной коры головного мозга человека, группа сравнения. Иммунофлуоресценция.

Ув. х400. Шкала 50 мкм

В группе сравнения (норма) флуоресцентная метка NSE равномерно заполняла перикарион нейронов, реже встречалась в аксонах и дендритах.

При хронической ишемии мозга NSE в цитоплазме нейронов распределялась неравномерно: в одних клетках белок содержался в незначительном количестве или вовсе отсутствовал, а в других его было существенно больше, чем в контроле (рисунки 42, 43). Немеченые нейроны были подвержены необратимым деструктивным изменениям и соответствовали пикноморфным клеткам.

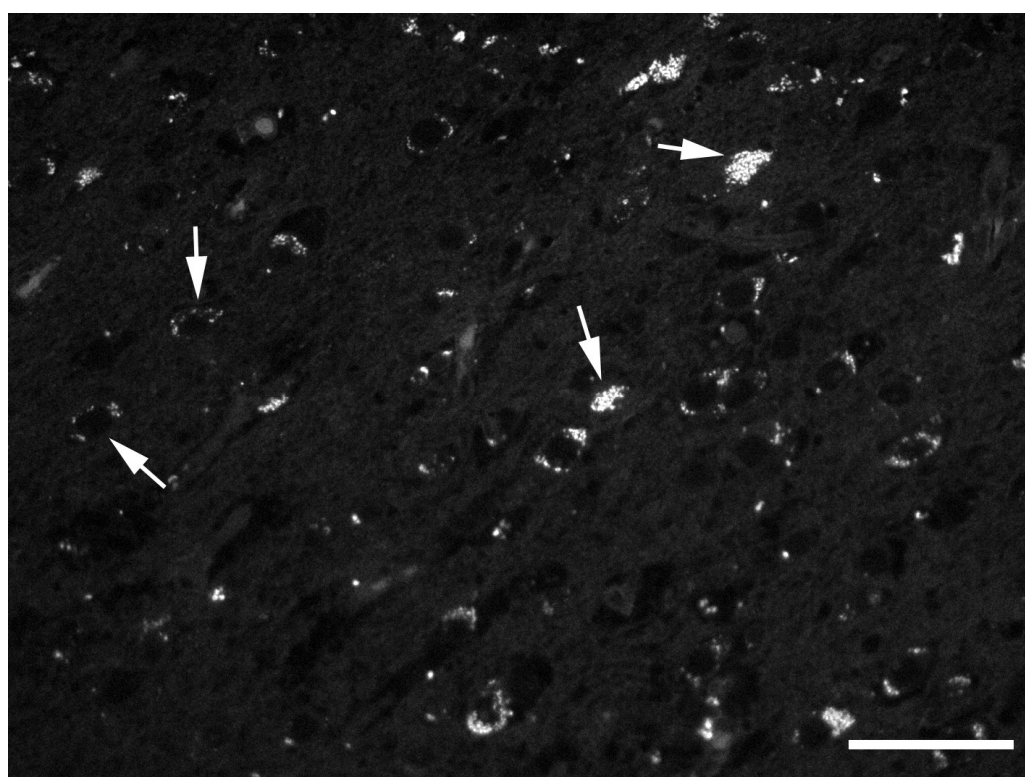


Рисунок 42 – NSE-позитивные нейроны (стрелки) слоя III височной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция.

Ув. $\times 200$. Шкала 50 мкм

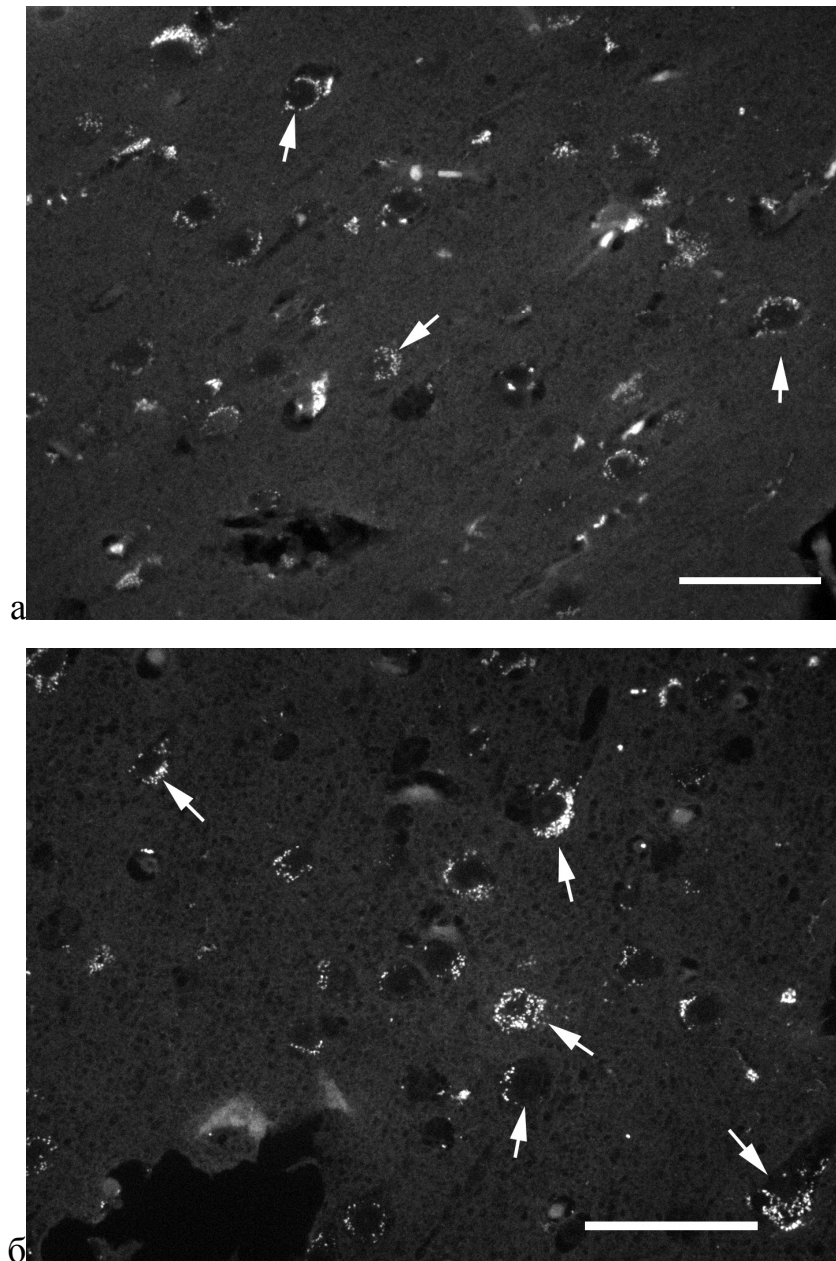


Рисунок 43 – NSE-позитивные нейроны (стрелки) слоя IV (а) и V (б) теменной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция.

Ув. x200. Шкала 50 мкм

С помощью иммуногистохимического метода и морфометрии нами установлено, что при хронической ишемии (основная группа) в КГМ происходило увеличение относительного содержания NSE-позитивных меток в сохранившихся неповрежденных нейронах.

Так в ЛКГМ основной группы общая площадь флуоресцирующих NSE-позитивных гранул (частиц, конгломератов) в слое III была больше в 1,5, а в слое

V – в 1,4 раза относительно группы сравнения (таблица 16). В ТКГМ и ВКГМ основной группы также выявлена статистически значимо большая площадь флуоресцирующих гранул (таблицы 17, 18) при меньшей ОЧПН.

Таблица 16 – Площадь NSE-позитивного материала в поле зрения лобной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, $Me (Ql; Qh)$

Слой	Группа сравнения, мкм^2	Основная группа, мкм^2
III	267 (178; 306) 0,70 %	387 (340; 405)** 1,02 %
V	363 (317; 380)^^ 0,95 %	504 (483; 529)***^^^ 1,32 %
** Различия статистически значимы в сравнении с группой сравнения при $p < 0,01$. *** При $p < 0,001$. ^^ В сравнении со слоем III при $p < 0,01$. ^^^ При $p < 0,001$ (критерий Манна-Уитни). Примечание – Me – медиана, Ql – нижний, Qh – верхний квартили.		

В таблицах 17–19 процент – относительная площадь маркера в поле зрения (38280 мкм^2).

Таблица 17 – Площадь NSE-позитивного материала в поле зрения теменной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, $Me (Ql; Qh)$

Слой	Группа сравнения, мкм^2	Основная группа, мкм^2
III	212 (182; 275) 0,56 %	287 (340; 405)* 0,75 %
V	298 (265; 343)^^ 0,78 %	412 (386; 443)***^^^ 1,10 %
** Различия статистически значимы в сравнении с группой сравнения при $p < 0,01$. *** При $p < 0,001$. ^^ В сравнении со слоем III при $p < 0,01$. ^^^ При $p < 0,001$ (критерий Колмогорова-Смирнова). Примечание – Me – медиана, Ql – нижний, Qh – верхний квартили.		

Таблица 18 – Площадь NSE-позитивного материала в поле зрения височной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, $Me (Ql; Qh)$

Слой	Группа сравнения, мкм ²	Основная группа, мкм ²
III	215 (190; 256) 0,57 %	325 (305; 376)** 0,85 %
V	475 (412; 488)^ [^] 1,25 %	609 (511; 628)***^ ^{^^} 1,60 %
** Различия статистически значимы в сравнении с группой сравнения при $p < 0,01$. *** При $p < 0,001$. ^ [^] В сравнении со слоем III при $p < 0,01$. ^ ^{^^} При $p < 0,001$ (критерий Колмогорова-Смирнова). Примечание – Me – медиана, Ql – нижний, Qh – верхний квартили.		

Увеличение площади NSE-позитивного материала в поле зрения КГМ происходило за счет возбуждающих пирамидных и тормозных интернейронов. Однако, в крупных пирамидных нейронах NSE было больше, чем в мелких пирамидных и непирамидных клетках.

В участках КГМ из зоны ишемической полутени с преобладанием деструктивно измененных пикноморфных нейронов характерные для смешанных участков КГМ компенсаторная активация экспрессии NSE не выявлена. На месте пикноморфных нейронов выявлялись только единичные гранулы меток (рисунок 44).

Так, в указанных выше зонах в слое V площадь NSE-позитивных гранул уменьшалась на 50–80 %. То есть, в зонах КГМ со значительным содержанием поврежденных нейронов не происходило компенсаторной активации образования NSE, что свидетельствовало о низкой метаболической активности клеток.

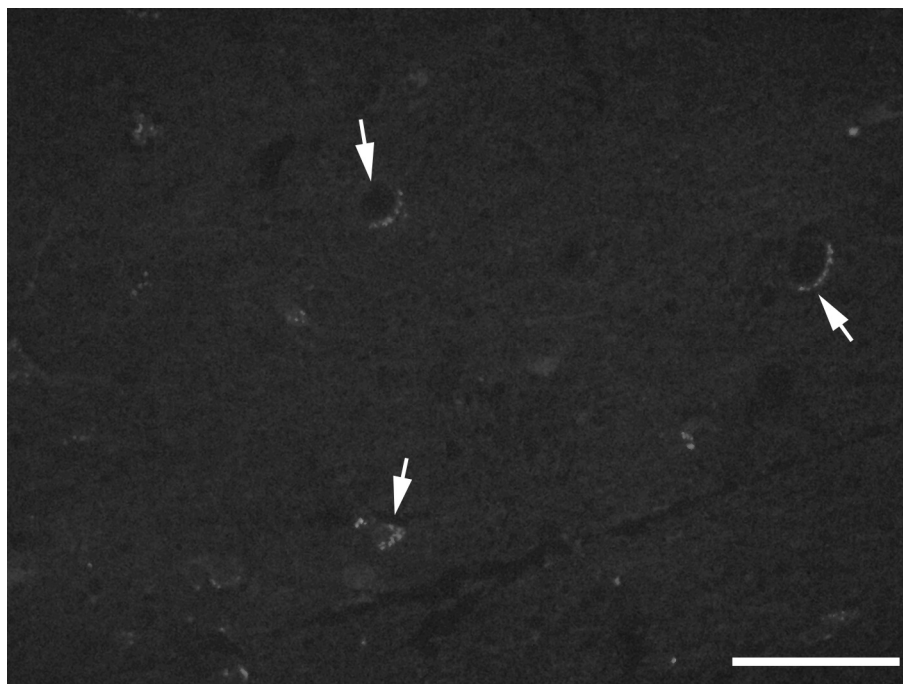


Рисунок 44 – NSE-позитивные нейроны (стрелки) слоя III теменной коры головного мозга человека, зона ишемической полутени с преобладанием деструктивно измененных пикноморфных нейронов, основная группа, Иммунофлуоресценция. Ув. X400. Шкала 50 мкм

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при хронической ишемии (основная группа) только в зонах с высоким содержанием неповрежденных нормохромных нейронов происходила компенсаторная активация экспрессии NSE и только в отдельных сохранившихся активно функционирующих нейронах КГМ.

При иммуногистохимических исследованиях синапсов наиболее стабильные результаты получены при использовании первичных антител к p38 (синаптофизин) – интегральному мембранному белку синаптических пузырьков.

В группе сравнения (биопсия) и контроля (аутопсия) флуоресцентная метка на p38 маркировала множество разнообразных мелких и крупных структур нервной ткани вокруг тел нейронов и в нейропиле всех долей и слоев КГМ (рисунок 45).

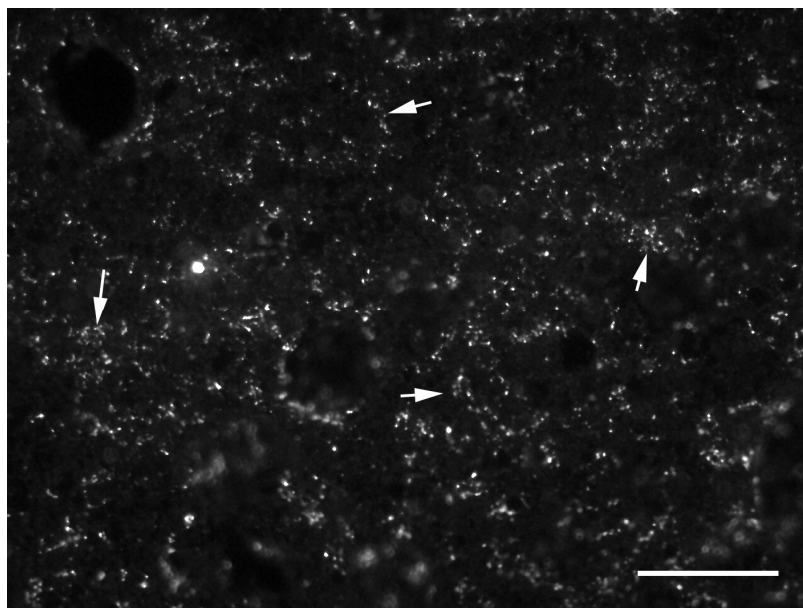


Рисунок 45 – p38-позитивные структуры нейропиля (стрелки), слой III теменной коры головного мозга человека, группа сравнения. Иммунофлуоресценция.

Ув. x400. Шкала 50 мкм

При этом, во всех слоях КГМ преобладали нейроны с интенсивным свечением p38-позитивного материала на поверхности клетки. Существенно то, что нейропиль неокортекса содержал многочисленные четкие гранулы продукта иммуногистохимической реакции, p38-негативные нейроны встречались редко. В норме метки на белок p38 располагались неравномерно, компактно в виде гранул без диффузии флуоресцирующего вещества в окружающее пространство нейропиля (рисунок 46). Площадь частиц варьировала от $0,0024 \text{ мкм}^2$ (один пиксель) до $89,6 \text{ мкм}^2$ (37328 пикселей). p38-позитивный материал в зоне аксосоматических синапсов занимал 45,3 % (95 % ДИ: 36,5-54,2 %) площади всех выявленных частиц. Все остальные синапсы аксошипиковые и аксодендритные синапсы нейропиля составили 54,7 % (95 % ДИ: 44,6–63,4 %).

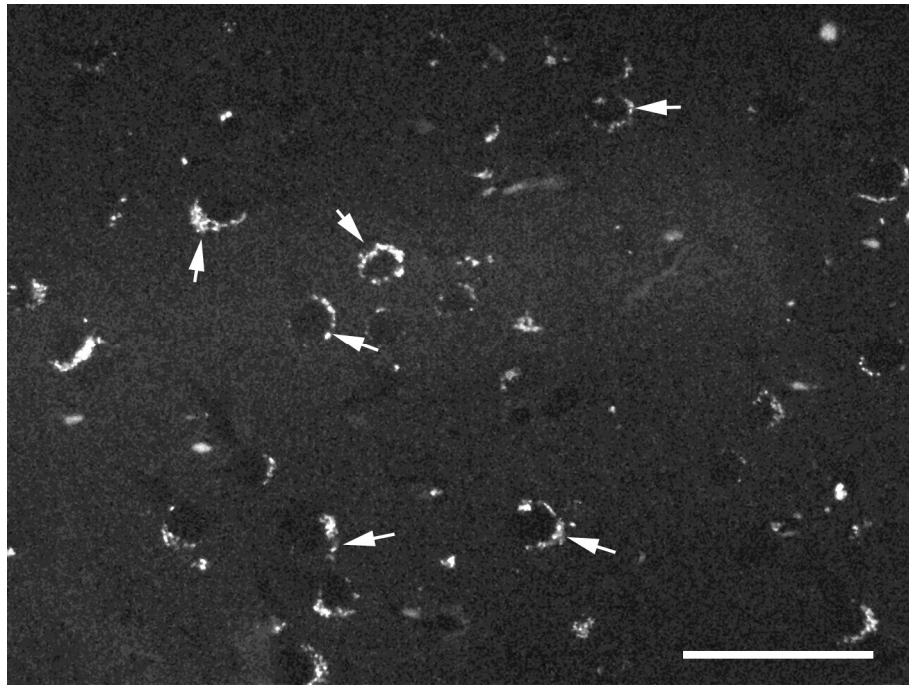


Рисунок 46 – p38-позитивные нейроны (стрелки), слой III височной коры головного мозга человека, группа сравнения. Иммунофлуоресценция.

Ув. x400. Шкала 50 мкм

На аутопсийном материале КГМ человека также отчетливо верифицировались p38-позитивные структуры (рисунок 47).

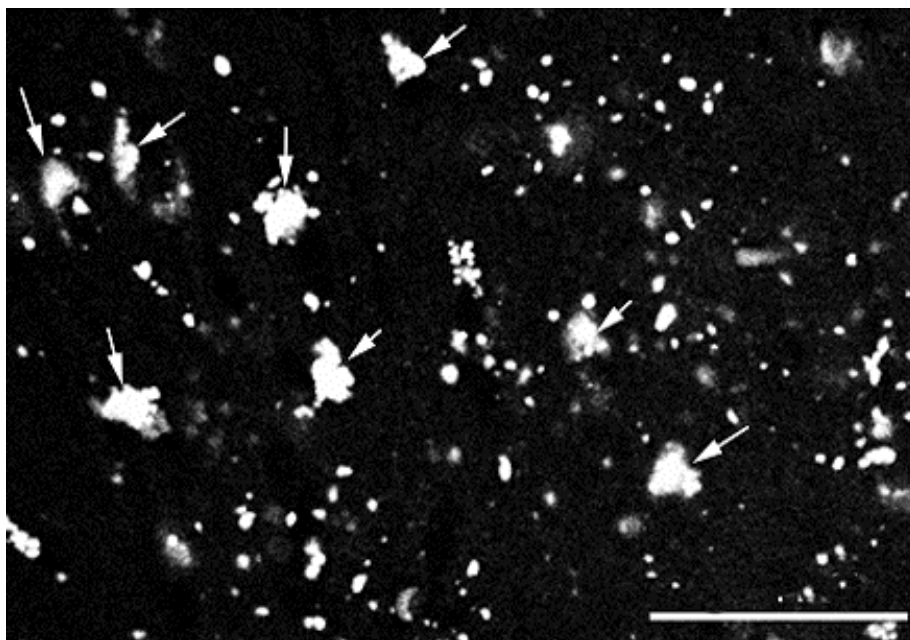


Рисунок 47 – p38-позитивные структуры (стрелки) слоя III лобной коры головного мозга человека, группа контроля. Иммунофлуоресценция. Ув. x400. Шкала 50 мкм

Большая часть синапсов при иммунофлуоресцентном исследовании выявлялась в составе конгломератов.

При хронической ишемии (основная группа) флуоресцентная метка на p38, как и в группе сравнения, маркировала множество разнообразных мелких и крупных структур нервной ткани вокруг тел нейронов и в нейропиле всех долей и слоев КГМ. Однако плотность распределения маркера в нейропиле была меньше (рисунок 48).

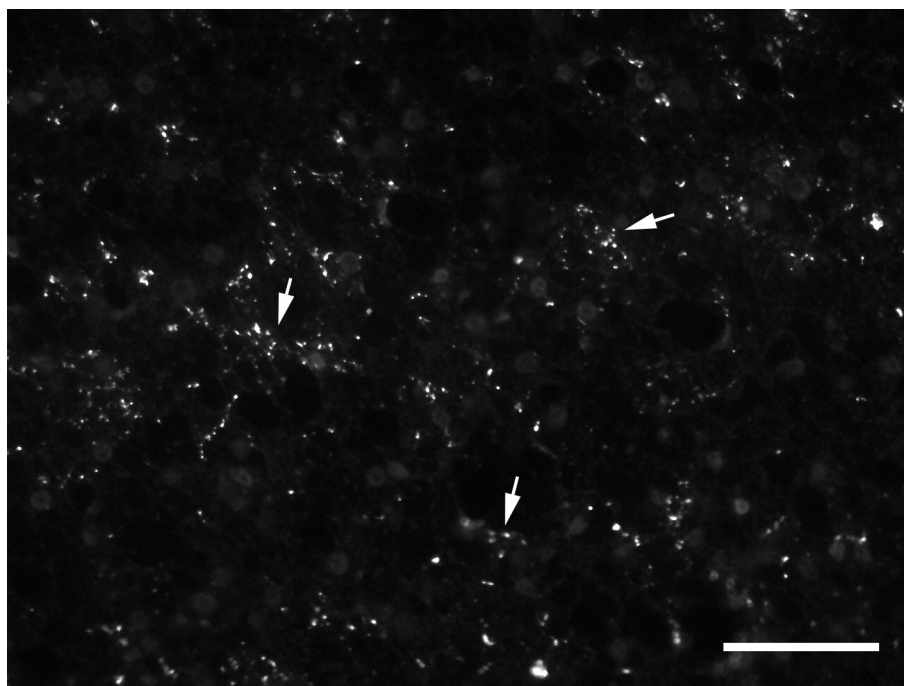


Рисунок 48 – p-38-позитивные структуры нейропиля (стрелки), слой III теменной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция.

Ув. x400. Шкала 50 мкм

Синаптофизин-позитивные метки на телах нейронов располагались гораздо реже и, как правило, не покрывали все тело клетки, иногда на ней оставались только 1–2 флуоресцирующие гранулы. Эти изменения затрагивали крупные и средние пирамидные и непирамидные нейроны (рисунки 49, 50). При ишемии происходило частичное равномерное разряжение p38-позитивного вещества среди структур нейропиля (рисунок 49).

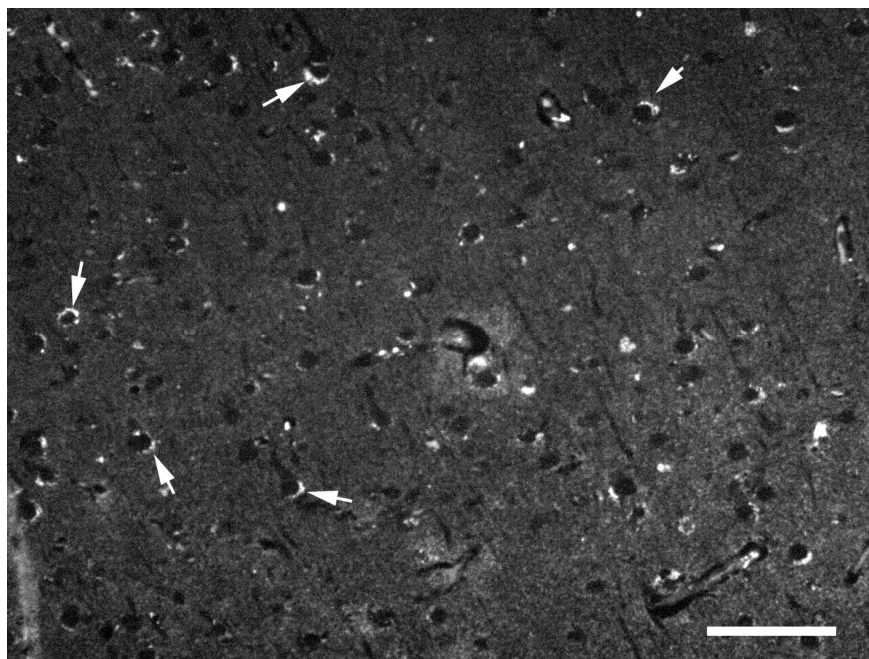


Рисунок 49 – p38-позитивные структуры (стрелки), слой III затылочной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. x200.

Шкала 50 мкм

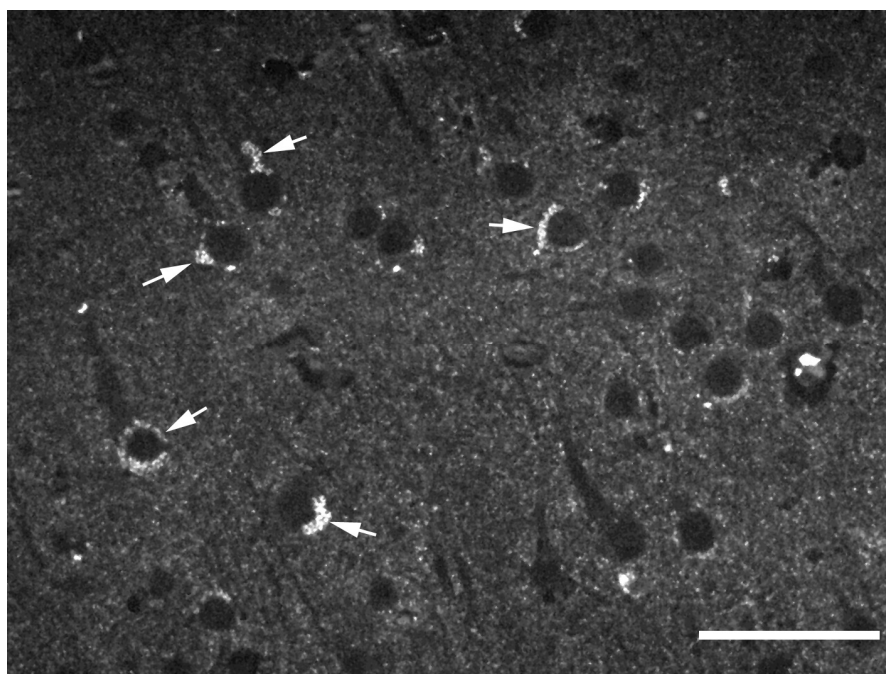


Рисунок 50 – p38-позитивные нейроны (стрелки), слой V теменной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. x400.

Шкала 50 мкм

Существенно то, что при хронической ишемии появлялось большое количество р38-негативных нейронов, которые были подвержены необратимым деструктивным изменениям. В зонах скопления подобных нейронов метки на синаптофизин располагались преимущественно в нейропиле.

Визуальное уменьшение (разряжение) р38 в нейропиле КГМ, вероятно, было связано с деструкцией части аксошипиковых и аксодендритных синапсов, а также уменьшением общей численной плотности нормально функционирующих синаптических контактов при хронической ишемии.

Для морфометрического исследования изображения (8-битовые цветные) флуоресцентных меток превращали (Threshold, программа ImageJ 1.46) в маски изображений, выделяли интересные участки полей зрения (рисунок 51).

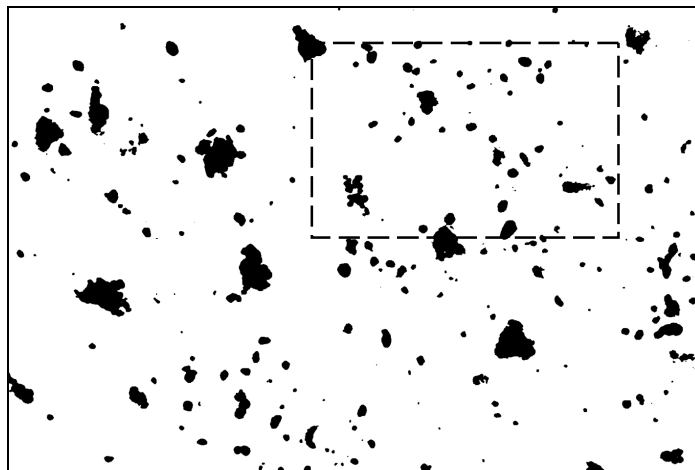


Рисунок 51 – Маска 8-битового изображения поля зрения (23500 мкм²) слоя III лобной коры головного мозга человека, созданная программой ImageJ 1.46 для автоматического морфометрического исследования распределения р38

При автоматическом исследовании частиц (Analyze Particles) на масках их размер и форма не лимитировались. Это позволило отразить на масках все, даже очень мелкие частицы реального изображения. Минимальный размер выявленной частицы на изображении был равен 1 пикселю (0,049x0,049 мкм – на реальном препарате). Мелкие частицы, как правило, по форме приближались к эллипсу или

кругу, а крупные частицы имели сложную форму конгломератов и, судя по контурам, состояли из округлых мелких частиц.

Ассоциированные с нейронами частицы более 4 мкм^2 с высокой степенью вероятности являлись конгломератом флуоресцирующих р38-позитивных аксосоматических синапсов.

Нами установлено, что изменения цитоархитектоники и ОЧПН КГМ при хронической ишемии (основная группа) сопровождались перестройкой межнейронных отношений. Так, например, в слое III ЛКГМ площадь р38-позитивных структур в поле зрения была статистически значимо меньше на 13,8 %, а в слое V – на 46,5 %, чем в группе сравнения (таблица 19).

Таблица 19 – Площадь р38-позитивного материала в поле зрения лобной коры головного мозга человека, $Me (Ql; Qh)$

Слой	Группа		Уровень p
	Группа сравнения, мкм^2	Основная группа, мкм^2	
II–III	375 (309; 756) 0,98 %	324 (226; 765) 0,85 %	$p = 0,04^*$
V	543 (208; 888)^ 1,42 %	290 (174; 460) 0,76 %	$p = 0,001^*$
* Различия статистически значимы между группой сравнения и основной группой. ^ В сравнении со слоем III при $p = 0,02$. Критерий Манна-Уитни. Примечание – Me – медиана, Ql – нижний, Qh – верхний квартили.			

В других долях КГМ в основной группе также выявлялась статистически значимая более низкая, чем в группе сравнения, площадь р38-позитивного материала (таблицы 20–22).

Таблица 20 – Площадь р38-позитивного материала в поле зрения теменной коры головного мозга человека, $Me (Ql; Qh)$

Слой	Группа		Уровень p
	Группа сравнения, мкм ²	Основная группа, мкм ²	
II–III	398 (354; 516)	305 (253; 387)	$p = 0,02^*$
V	512 (422; 634)^	367 (274; 509)	$p = 0,001^*$
* Различия статистически значимы между группой сравнения и основной группой. ^ В сравнении со слоем III при $p = 0,02$. Критерий Манна-Уитни. Примечание – Me – медиана, Ql – нижний, Qh – верхний квартили.			

Таблица 21 – Площадь р38-позитивного материала в поле зрения височной коры головного мозга человека, $Me (Ql; Qh)$

Слой	Группа		Уровень p
	Группа сравнения, мкм ²	Основная группа, мкм ²	
II–III	365 (314; 422)	288 (245; 315)	$p = 0,01^*$
V	456 (434; 575)^	321 (245; 433)	$p = 0,001^*$
* Различия статистически значимы между группой сравнения и основной группой. ^ В сравнении со слоем III при $p = 0,01$. Критерий Манна-Уитни. Примечание – Me – медиана, Ql – нижний, Qh – верхний квартили.			

Таблица 22 – Площадь р38-позитивного материала в поле зрения затылочной коры головного мозга человека, $Me (Ql; Qh)$

Слой	Группа		Уровень p
	Группа сравнения, мкм ²	Основная группа, мкм ²	
II–III	433 (401; 512)	354 (226; 428)	$p = 0,04$
V	576 (367; 653)^	325 (287; 543)	$p = 0,01$
* Различия статистически значимы между группой сравнения и основной группой. ^ В сравнении со слоем III при $p = 0,03$. Критерий Манна-Уитни. Примечание – Me – медиана, Ql – нижний, Qh – верхний квартили.			

Более низкое содержание белка р38 в КГМ основной группы, вероятно, свидетельствовало о деструкции синапсов при хронической ишемии. При этом необходимо отметить, что аксосоматические (тормозные) синапсы интернейронов на пирамидных нейронах повреждались меньше, чем аксодендритные и аксошипиновые (возбуждающие) синапсы этих нейронов (рисунок 52).

На рисунке 52 видно, что в нейропиле (зона содержания аксодендритных и аксошипиковых синапсов) выявлялось мало меток р38, а на телах пирамидных и непирамидных нейронов – существенно больше. В расчете на один р-38-позитивный пирамидный нейрон КГМ площадь его перисоматических частиц в основной группе была статистически значимо больше – на 32,5 % (95 % ДИ: 16,5-41,3 %), чем в группе сравнения.

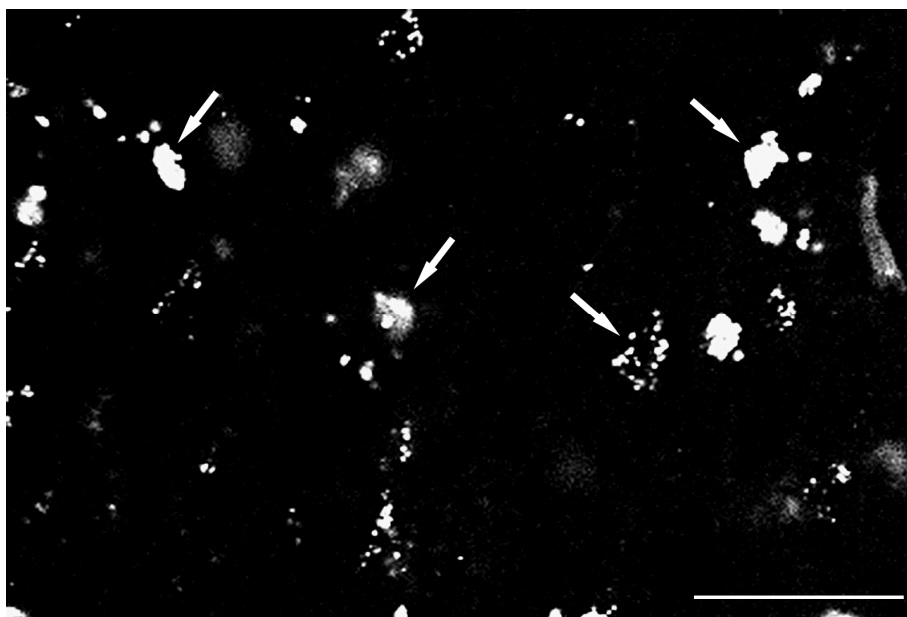


Рисунок 52 – Синаптофизин-позитивные структуры нейропиля (стрелки), слой III лобной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция.

Ув. x400. Шкала 50 мкм

Таким образом, было установлено, что при иммунофлуоресцентной верификации р38 в группе сравнения отмечалось интенсивное свечение всей поверхности тел пирамидных и непирамидных нейронов КГМ. При хронической ишемии в основной группе появлялись дискретные конгломераты флуоресцирующего маркера синапсов на телах нейронов. Хроническая ишемия приводила к уменьшению размеров р38-позитивных флуоресцирующих комплексов, но увеличению их количества на цитолемме сомы пирамидных нейронов слоя III и V. Вполне вероятно, что при ишемии сохранившиеся аксосоматические синапсы подвергались деструкции, не покрывали полностью

сому и образовывали иную, чем в группе сравнения, мозаику флуоресцирующих гранул на поверхности тел нейронов. Все это можно рассматривать как структурную основу реорганизации межнейронных отношений КГМ при хронической ишемии.

Кальбиндин-позитивные нейроны выявлялись во всех изученных долях и слоях КГМ, но преобладали в слоях II–III. В силу того, что кальбиндин не является специфическим для тормозных нейронов белком, интернейроны идентифицировали среди всех кальбиндин-позитивных клеток на основании морфологических критериев, установленных для данного типа клеток [30].

При иммуногистохимическом выявлении кальбиндина типология тормозных интернейронов определялась небольшой величиной перикариона с короткими радиальными дендритами (рисунок 53).

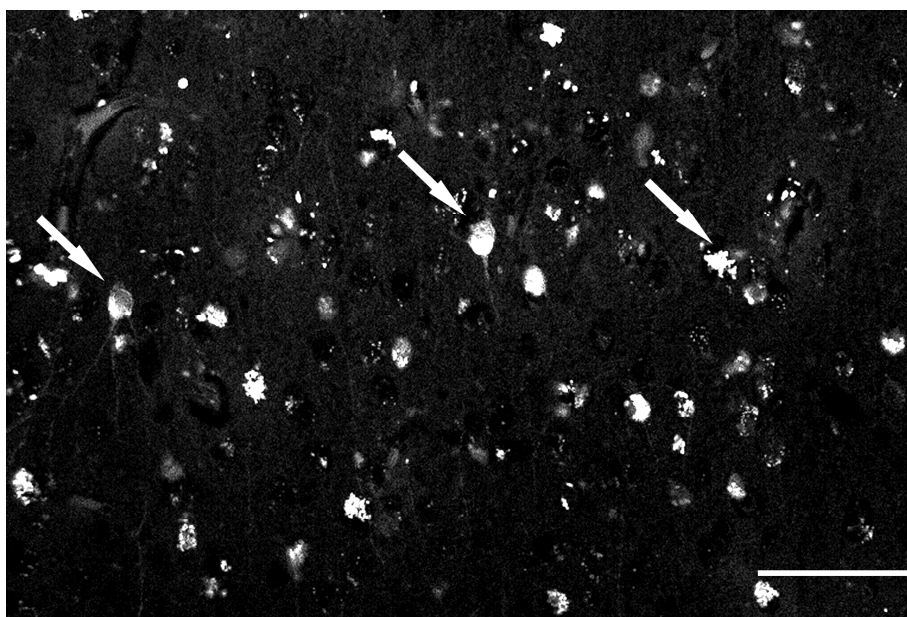


Рисунок 53 – Кальбиндин-позитивные непиримидные нейроны (стрелки), слой III лобной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция.

Ув. x400. Шкала 50 мкм

Дискриминацию пирамидных и непиримидных нейронов из всей популяции кальбиндин-позитивных клеток осуществляли с помощью программы ImageJ 1.46 на 8-битном изображении. Предварительно устанавливались пороговые значения

яркости, контрастности, количественного распределения пикселей по яркости. После выделения объектов, имеющих заданные параметры, запускался апплет «Analyze Particles» для разделения объектов по следующим параметрам: размер (позволял исключить объекты, имеющие площадь больше или меньше заданной), циркулярность (при высокой степени отмечались только овальные непиримидные клетки, при низкой – только пирамидные нейроны). Для визуального контроля проводилось наложение оверлейной маски полученных данных на исходное изображение [2; 3].

Кальбиндин выявлялся в пирамидных и непиримидных нейронах во всех изученных долях КГМ в контроле, основной группе и группе сравнения (рисунок 54). При этом максимальное количество кальбиндин-позитивных нейронов отмечалось в слое III КГМ (см. рисунок 54а).

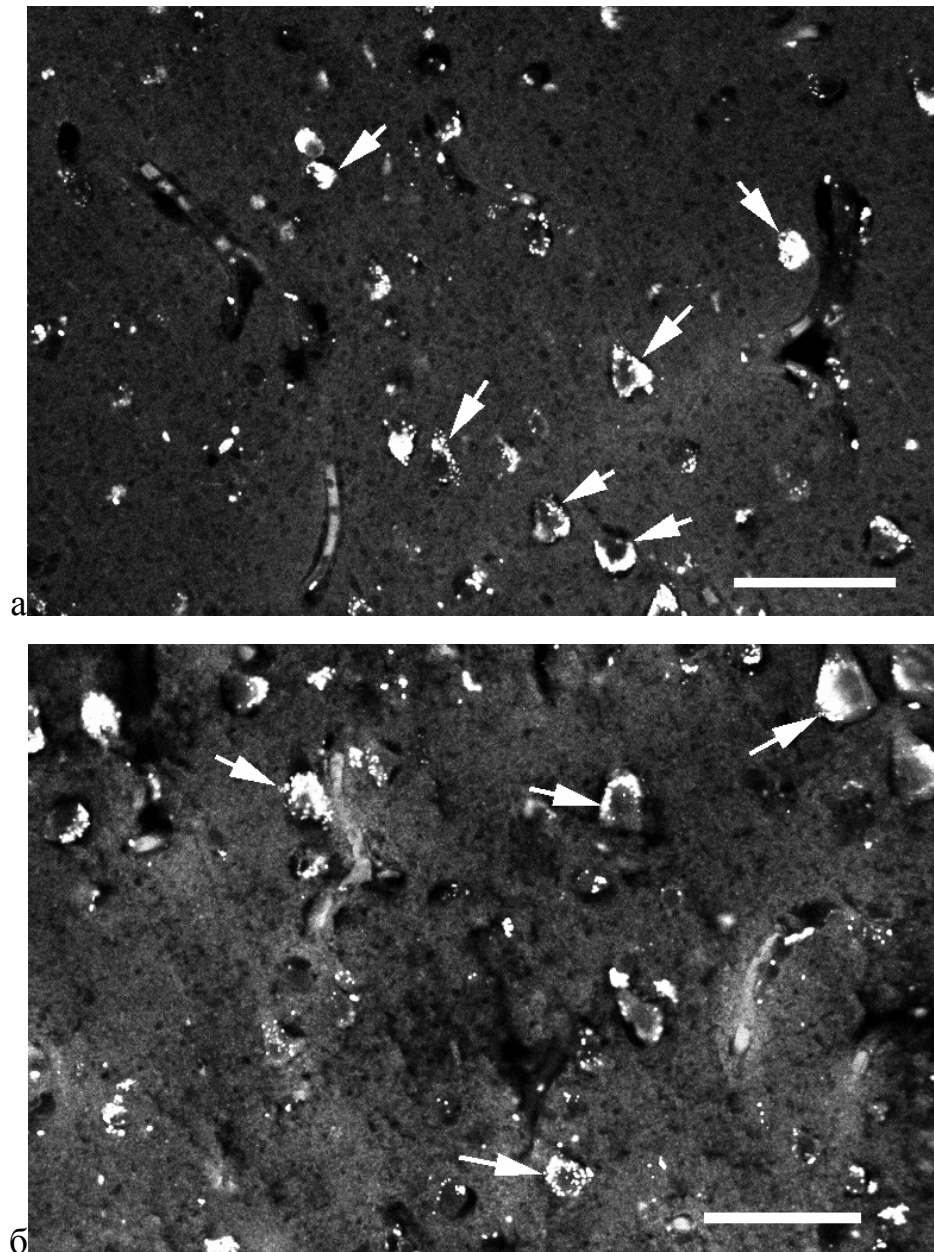


Рисунок 54 – Кальбиндин-позитивные пирамидные и непирамидные нейроны (стрелки), слои II–III (а) и слой V (б) лобной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. $\times 400$. Шкала 50 мкм

Незначительную часть кальбиндин-позитивных структур нельзя было верифицировать по форме тела, отростков и отнести к какому-то определенному типу нейронов (рисунок 55). Это было связано с тем, что флуоресцирующая метка в цитоплазме этих нейронов распределялась неравномерно, единичными гранулами или агрегатами гранул, не повторяющих в совокупности контуры нейронов. Кроме того, в значительной части кальбиндин-позитивных клеток не

выявлялись их отростки, что так же затрудняло дискриминацию клеток (см. рисунок 55).

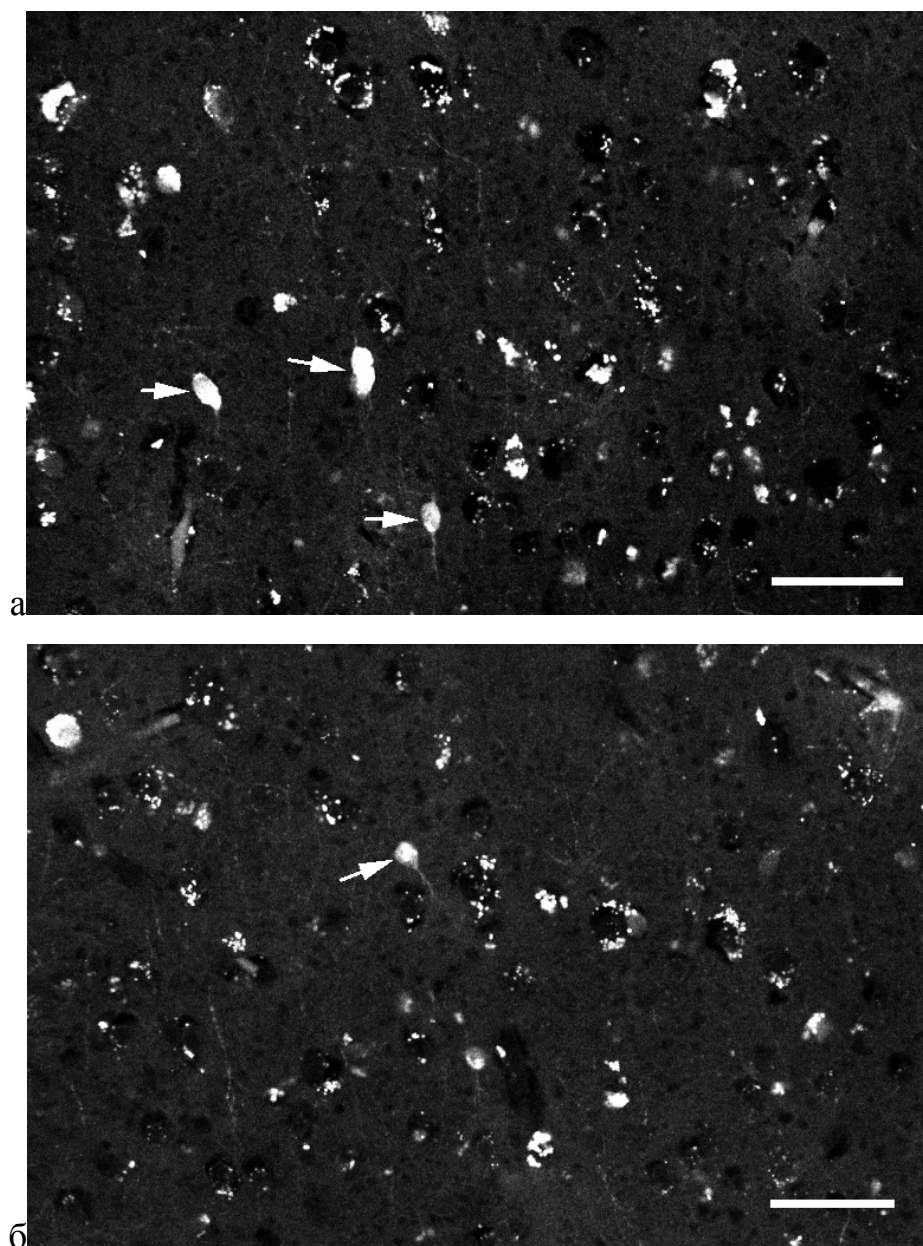


Рисунок 55 – Кальбиндин-позитивные нейроны, слои II–III (а) и слой V (б) теменной коры головного мозга человека, основная группа.

Иммунофлуоресценция. Стрелка – глиоморфные нейроны с видимыми отростками и интенсивным свечением маркера. Ув. x400. Шкала 50 мкм

Трудности дискриминации и подсчета отдельных кальбиндин-позитивных клеток преодалевались путем пересчета площади флюоресцирующих меток на дин нейрон (ОЧПН, выявленная при окраске по Ниссля на этой же серии срезов).

Количество кальбиндин-позитивного материала в КГМ (в пересчете на один нейрон) в основной группе статистически значимо превышало таковое в группе сравнения в 1,6 раза ($p < 0,01$, критерий Манна-Уитни). Вероятно, это свидетельствовало о том, что при хронической ишемии преимущественно сохранялись нейроны с высоким уровнем экспрессии этого белка – и пирамидные нейроны, и тормозные интернейроны во всех слоях.

Среди четко верифицируемых кальбиндин-позитивных тормозных интернейронов различных долей КГМ преобладали корзинчатые клетки, клетки Мартинотти и нейроглиоформные интернейроны. В слое III, как правило, в этих интернейронах выявлялась более интенсивная флуоресценция маркера.

Существенно то, что при хронической ишемии численная плотность кальбиндин-позитивных тормозных интернейронов КГМ оставалась на уровне контроля и группы сравнения, а суммарная площадь кальбиндин-позитивных нейронов в поле зрения статистически значимо увеличивалась. При этом выявлялись участки КГМ с гипертрофированными кальбиндин-позитивными нейронами (рисунок 56; таблицы 23, 24).

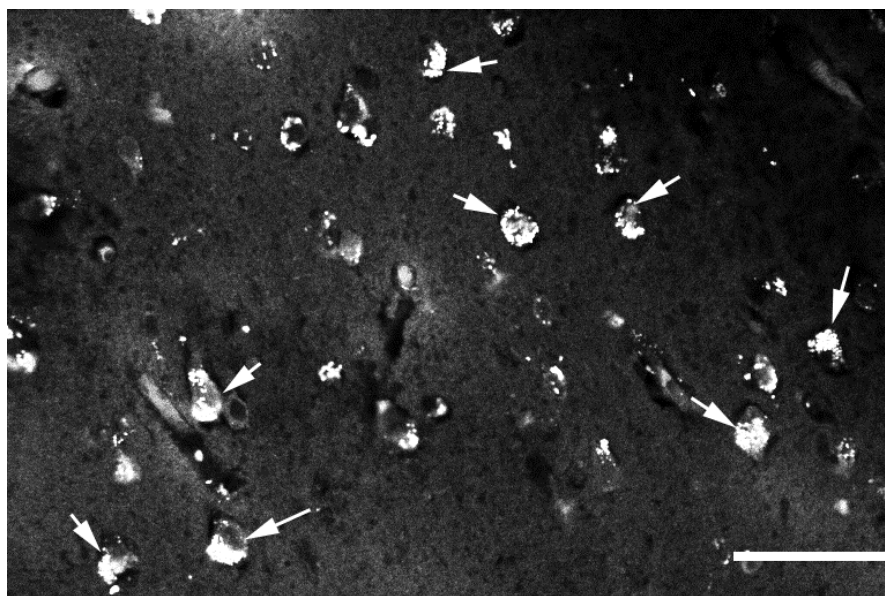


Рисунок 56 – Кальбиндин-позитивные нейроны, слой IIIс теменной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Стрелка – крупные непиримидные нейроны с высоким содержанием кальбиндина.

Ув. х400. Шкала 50 мкм

Таблица 23 – Численная плотность кальбиндин-содержащих интернейронов и относительная площадь их тел в поле зрения лобной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, $Me (Ql; Qh)$

Слой	Группа сравнения	Основная группа
Численная плотность (на 1 мм ²)		
III	26 (18; 31)	21 (17; 24)*
V	14 (10; 17)^^	12 (9; 16)^^^
Относительная площадь, %		
III	0,42 (0,34; 0,61)	0,92 (0,72; 1,33)***
V	0,34 (0,22; 0,54)	0,68 (0,41; 0,75)***^^
* Различия статистически значимы между группой сравнения и основной группой при $p = 0,04$. *** При $p = 0,001$. ^^ В сравнении со слоем III при $p = 0,01$. ^^^ При $p = 0,001$ (критерий Манна-Уитни). Примечание – Me – медиана, Ql – нижний, Qh – верхний квартили.		

Таблица 24 – Численная плотность кальбиндин-содержащих интернейронов и относительная площадь их тел в поле зрения теменной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, $Me (Ql; Qh)$

Слой	Группа сравнения	Основная группа
Численная плотность (на 1 мм ²)		
III	35 (23; 46)	33 (18; 58)
V	17 (9; 25)^^^	19 (12; 28)^^
Относительная площадь, %		
III	0,48 (0,37; 0,67)	0,89 (0,78; 1,12)***
V	0,32 (0,24; 0,51)	0,62 (0,55; 0,86)***^
*** Различия статистически значимы между группой сравнения и основной группой при $p = 0,001$. ^ В сравнении со слоем III при $p = 0,04$. ^^ При $p = 0,01$. ^^^ При $p = 0,001$ (критерий Манна-Уитни). Примечание – Me – медиана, Ql – нижний, Qh – верхний квартили.		

Таким образом, иммуногистохимическое исследование кальбиндин-содержащих нейронов свидетельствовало в пользу более высокой устойчивости этих нейронов к хронической ишемии и компенсаторной активации экспрессии кальбиндина в сохранившихся тормозных интернейронах.

Иммуногистохимическая окраска на NPY позволяет отчетливо верифицировать тела и отростки только интернейронов во всех долях и слоях КГМ (рисунок 57). Это давало возможность точно оценить количество нейропептида в нейропиле и телах нейронов КГМ по площади метки (рисунок 58). Поэтому именно NPY-иммунопозитивные тормозные нейроны были детально изучены с помощью морфометрических методов и программы ImageJ 1.46.

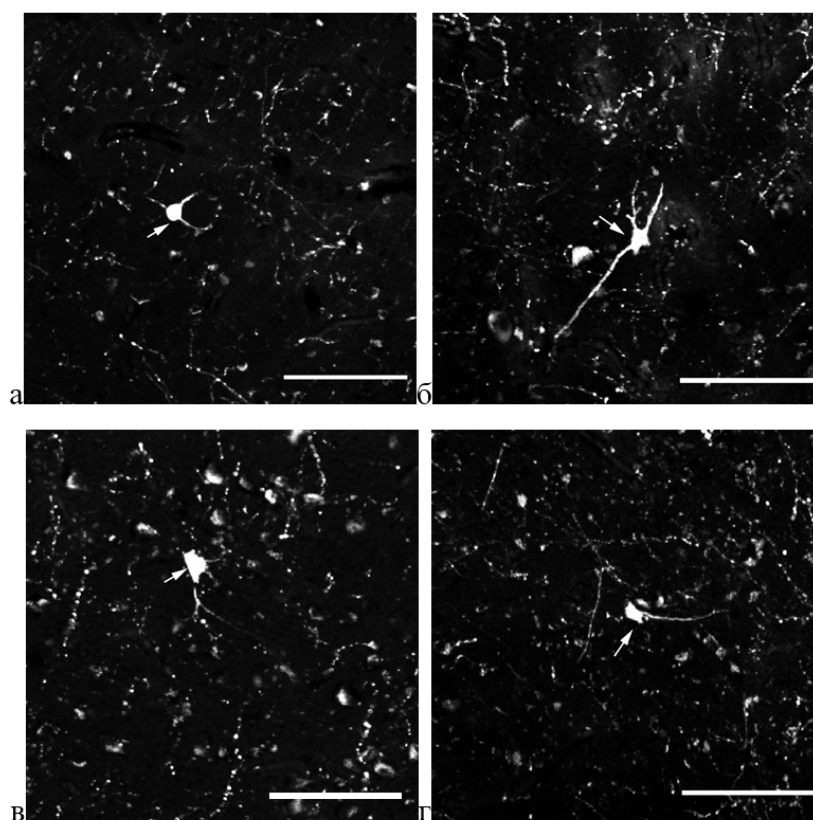


Рисунок 57 – NPY-позитивные нейроны (стрелка), слой III лобной (а), теменной (б), височной (в) и затылочной (г) коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. x400. Шкала 50 мкм

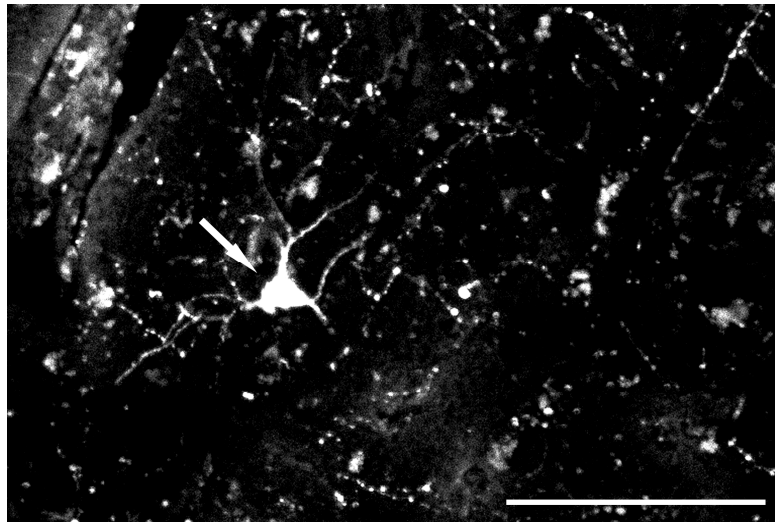


Рисунок 58 – NPY-позитивный нейрон (стрелка), слой III лобной коры головного мозга человека, основная группа. Распределение меток в теле и отростках, нейропиле. Иммунофлуоресценция. Ув. x400. Шкала 50 мкм

В норме и при хронической ишемии NPY-иммунопозитивные нейроны выявлялись во всех слоях КГМ, но преобладали в слое III (рисунок 59).

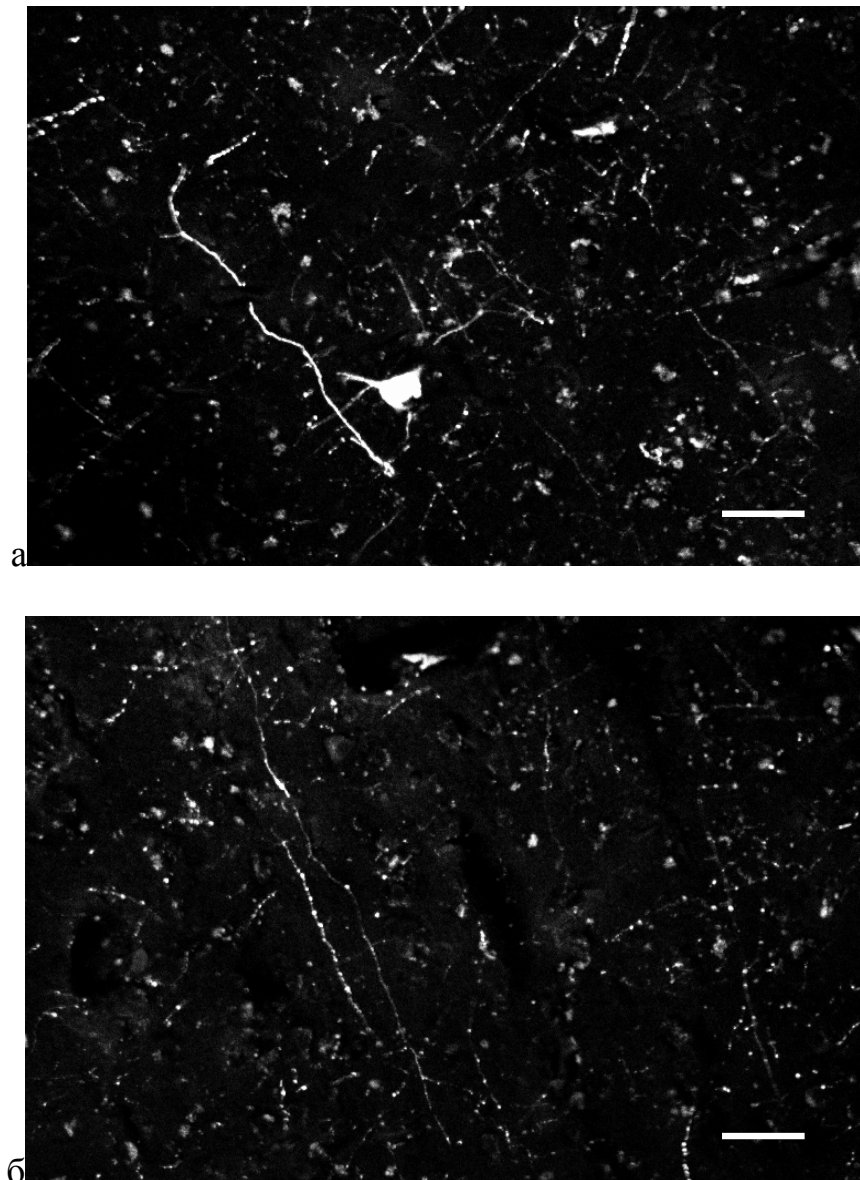


Рисунок 59 – Иммунофлюоресцентная маркировка NPY в теле и отростках нейронов, зрительная кора головного мозга человека, группа сравнения, слой III: а – NPY-иммунопозитивный тормозной интернейрон и окружающий нейропил, б – фрагмент нейропиля с NPY-иммунореактивными отростками продольной (стрелка) и поперечной ориентации, отчетливо видны очень тонкие отростки с непрерывным содержанием метки. Ув. x200. Шкала – 20 мкм

В нейропиле маркер на NPY позволяет отчетливо верифицировать тела и длинные отростки только тормозных интернейронов. Это дает возможность точно оценить количество NPY и его распределение в конкретном отделе КГМ по

площади или объему метки на единицу площади поля зрения или в срезе с помощью программы ImageJ 1.46. Кроме того, подсчет относительного содержания частиц различного размера дает возможность определить степень разветвления дендритного дерева тормозных интернейронов (то есть, плотность объемной сети) в норме и при ишемии.

При использовании программы ImageJ 1.46 мы сознательно ввели ограничения для нижнего значения площади частицы – 5 пикселей (около 2×3 пикселей или 0,4–0,5 мкм в диаметре). Частицы меньшей площади по диаметру приближаются к разрешающей способности микроскопа (около 0,2 мкм) и, кроме того, эти частицы трудно дискриминировать по принадлежности к конкретной структуре. Практически невозможно установить, где расположена частица – на территории клетки или в нейропиле и является ли она «шумовым» артефактом графического изображения. Поэтому на бинарном изображении самой маленькой частицей, с высокой степенью вероятности относящейся к NPY-позитивному материалу тормозного интернейрона, в настоящей работе считалась частица диаметром около 0,4–0,5 мкм (2–3 пикселя на цифровом изображении) (рисунок 60). Это примерно соответствует диаметру синаптического контакта среднего размера. Более мелкие частицы отсекались с помощью инструментов «Analyze particles». Верхний предел площади частиц устанавливался на уровне 5000 пикселей (225 мкм^2), что было больше самых крупных частиц, представленных крупными тормозными интернейронами с отростками (в норме площадь тела основной массы интернейронов была $30\text{--}40 \text{ мкм}^2$).

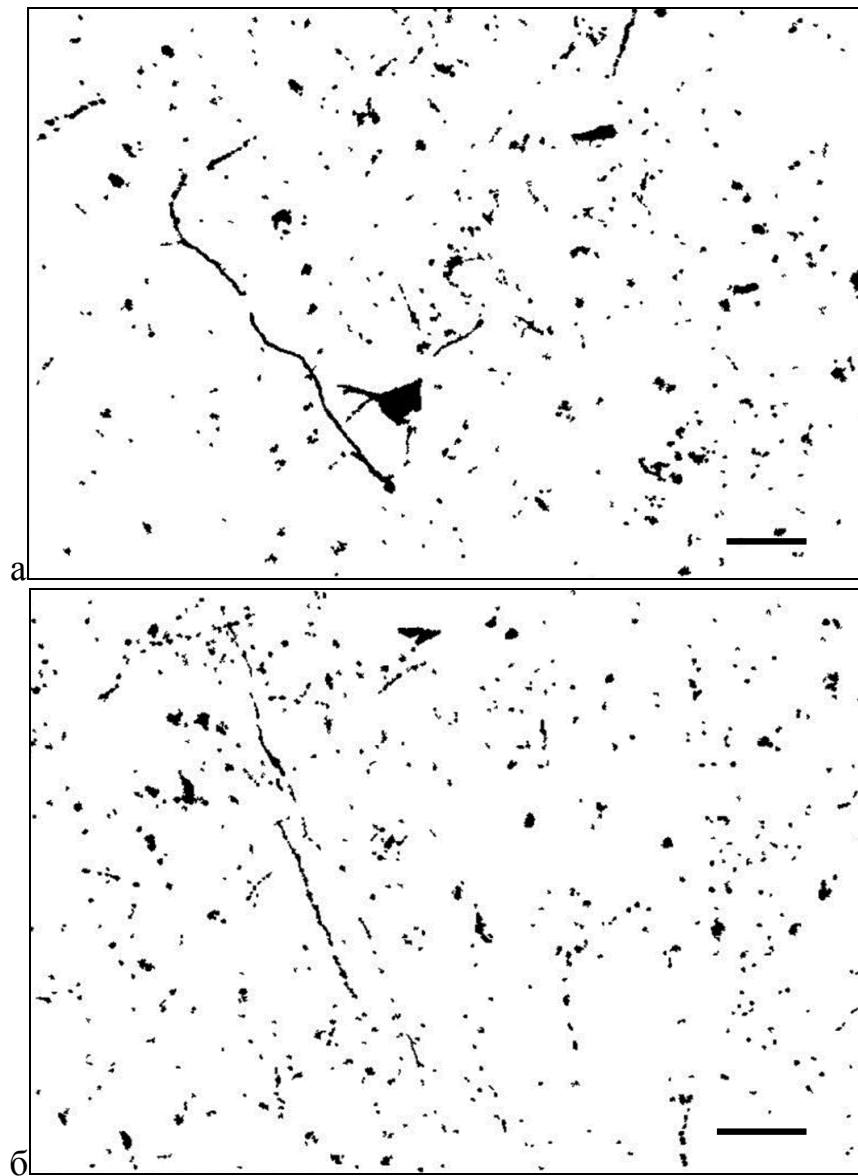


Рисунок 60 – Маски (бинарное изображение, 393216 пикселей) реального поля зрения (17500 мкм^2) при иммунофлюоресцентной маркировке NPY, зрительная кора головного мозга человека, группа сравнения, слой III. В плоскости среза выявляются фрагменты тел и отростков нейронов: а – NPY-иммунопозитивный интернейрон и окружающий нейропиль, всего 426 частиц различной формы площадью от 5 до 1296 пикселей, общая площадь всех частиц составляет 3,2 % поля зрения; б – фрагмент нейропиля с NPY-иммунореактивными отростками продольной и поперечной ориентации, всего 546 частиц площадью от 5 до 314 пикселей, общая площадь – 2,8 % поля зрения. Шкала – 20 мкм

Кривизна контура частиц (отношение длины осей овалов, построенных вокруг частицы) устанавливалась в зависимости от конкретной задачи:

- 1) для выявления общей площади или объема NPY-иммунопозитивных частиц в поле зрения или срезе этот показатель варьировал от 0,00 до 1,0 ус.ед.;
- 2) для выявления поперечных срезов дендритов в нейропиле – на уровне 0,90–1,0 ус.ед.

В последнем случае выявлялись только округлые частицы, которые и представляли поперечные срезы дендритов (рисунок 61).

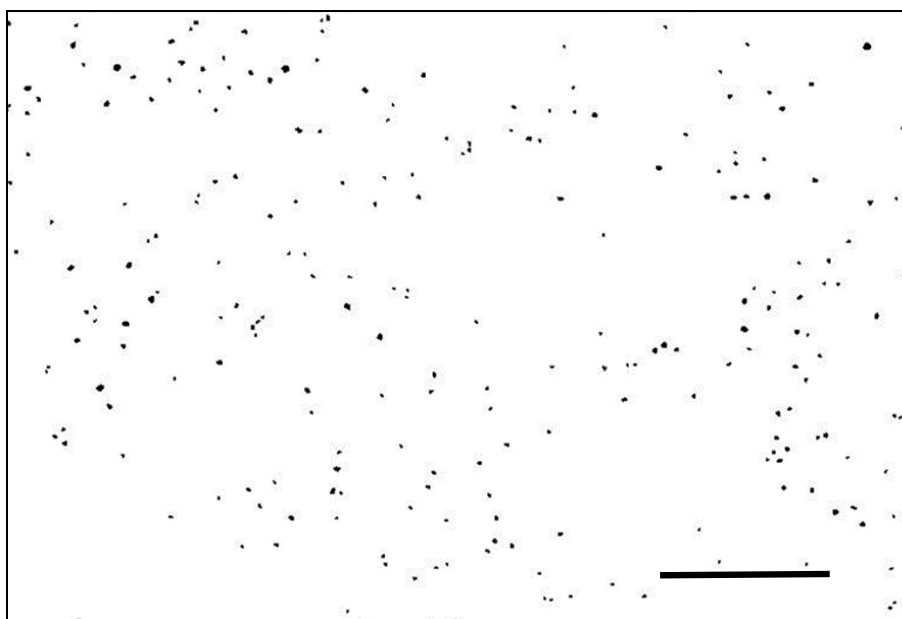


Рисунок 61 – Маска (бинарное изображение, 393216 пикселей) реального поля зрения (17500 мкм²) при иммунофлюоресцентной маркировке NPY, зрительная кора головного мозга человека, группа сравнения, слой III. Выявляются только поперечные срезы отростков нейронов. Всего 234 частиц площадью от 5 до 33 пикселей (диаметр 0,5–1,4 мкм), общая площадь – 0,6 % поля зрения.

Шкала - 20 мкм

В дендритном дереве на продольных срезах можно было выделить до пяти уровней, отличающихся диаметром отростков.

При морфометрическом исследовании поперечных срезов отростков интернейронов установлено, что по диаметру отростки в поле зрения всех изученных долей КГМ человека в норме, распределялись следующим образом:

- 1) более 1,40 мкм – 0,2–0,7 %;
- 2) 1,13–1,40 мкм – 2,9–4,2 %;
- 3) 0,97–1,12 мкм – 6,3–8,2 %;
- 4) 0,84–0,96 мкм – 11,6–14,1 %;
- 5) 0,72–0,83 мкм – 20,9–24,0 %;
- 6) 0,50–0,71 мкм – 51,9–55,5 % (95 % доверительный интервал) (рисунок 62)

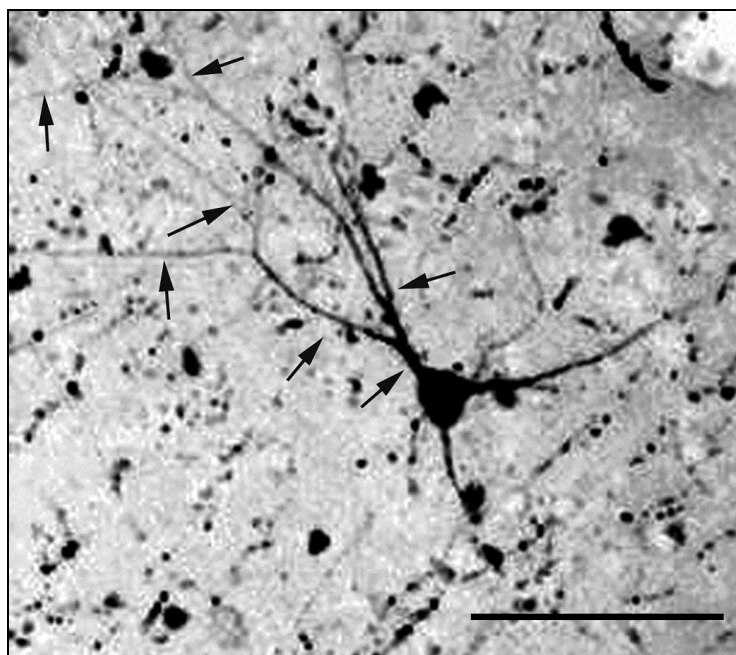


Рисунок 62 – Типичный NPY-иммунопозитивный тормозной нейрон: пять уровней дихотомического деления дендритного дерева (отмечено стрелками), отличающихся диаметром дендритов. Продольный срез, инвертированное изображение, зрительная кора головного мозга человека, слой III, группа сравнения. Ув. x400. Шкала – 25 мкм

Подобное соотношение диаметра и количества ветвей дендритов свидетельствует о том, что переход на следующий уровень дендритного дерева

(пять уровней) сопровождается увеличением количества дендритов примерно в два раза и уменьшением их диаметра на $0,12\text{--}0,13$ мкм.

Общая численная плотность поперечных срезов дендритов в единице поля зрения дает представление о степени пространственного распространения отростков сети тормозных интернейронов в конкретном объеме нервной ткани КГМ. Так, численная плотность поперечных срезов отростков в представленном участке нейропиля слоя III составляет 13371 на 1 мм^2 . При такой плотности расстояние между соседними частицами в среднем составляет $(8,6 \pm 2,2)$ мкм. Это чуть больше диаметра мелкого нейрона.

Распределение поперечных срезов дендритов в нейропиле неоднородно. Пустые зоны на рисунке, вероятно, соответствуют расположению тел крупных нейронов. Существенно то, что NPY-иммунопозитивные отростки вблизи тел и крупных дендритов тормозных нейронов образуют фигуры очень похожие на аксосоматические и аксодендритные синапсы. Вполне вероятно, что это – тормозные синапсы на тормозных нейронах.

Таким образом, NPY-иммунопозитивные тормозные интернейроны, содержание которых в норме в КГМ незначительно, формируют густую сеть отростков, по степени плотности которой можно судить о реакции тормозной системы коры головного мозга на хроническую ишемию.

Нами установлено, что во всех изученных долях КГМ основной группы изменялся характер распределения маркера в нейронах и нейропиле. Увеличивалось количество клеток с глыбчатым компактным распределением маркера, а также интернейронов с незначительным количеством диффузно распределенных мелких флуоресцирующих частиц. Кроме того, отростки тормозных интернейронов подвергались значительным варикозным изменениям (рисунок 63).

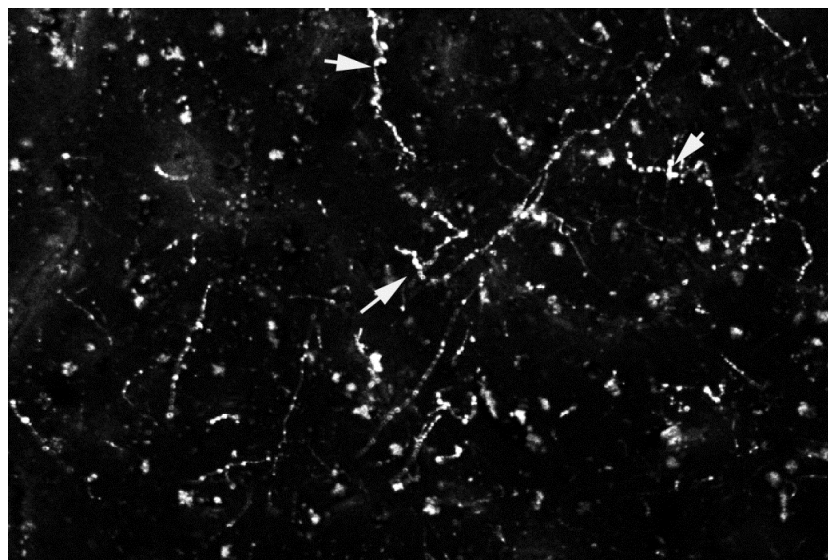


Рисунок 63 – Иммунофлюоресцентная маркировка NPY в отростках (стрелки) тормозных интернейронов, зрительная кора головного мозга человека, основная группа, слой III. Фрагментация NPY-иммунопозитивного материала, варикозные изменения отростков. Ув. x200. Шкала – 20 мкм

Качественные изменения сопровождались статистически значимыми изменениями параметров, характеризующих форму и размеры частиц иммунопозитивного материала, при этом общая численная плотность тел NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов в сравнении с контролем и группой сравнения статистически значимо не изменялась ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни). Морфометрическое исследование показало, что хроническая ишемия приводила к существенной реорганизации отростков тормозных интернейронов. По данным ANOVA, между полями КГМ контрольной группы и группы сравнения не было выявлено статистически значимых различий по показателю относительной площади всех NPY-иммунопозитивных структур, а в основной группе такие различия появлялись (таблица 25).

В основной группе относительная площадь NPY-иммунопозитивных структур (меченые тела нейронов и их отростки) КГМ была статистически значимо выше, чем в группе сравнения (таблица 25). Относительная площадь увеличивалась при хронической ишемии за счет увеличения количества

NPY-иммунопозитивных структур и, в меньшей степени, за счет размеров этих структур (таблица 25).

Таблица 25 – Основные морфометрические характеристики масок NPY-иммунопозитивных структур слоя III различных долей коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, программа ImageJ 1.46

Отдел коры	Группа сравнения	Основная группа	Уровень p
1 Относительная площадь всех NPY-иммунопозитивных частиц в поле зрения, %			
ЛКГМ	2,20 (1,87; 2,50)	4,28 (3,80; 4,86)	$< 0,001^*$
ТКГМ	2,13 (1,66; 2,76)	3,93 (3,07; 4,61) $p = 0,0001^{\wedge}$	$< 0,001^*$
ВКГМ	1,80 (1,50; 2,34)	3,91 (3,47; 4,67) $p = 0,003^{\wedge}$	$< 0,001^*$
ЗКГМ	1,91 (1,71; 2,41)	4,11 (3,30; 4,24)	$< 0,001^*$
ANOVA Фридмана	$df = 3; \chi^2 = 5,1; p = 0,16^{\#}$	$df = 3; \chi^2 = 13,6; p = 0,004^{\#}$	—
2 Количество NPY-иммунопозитивных частиц в поле зрения (17500 мкм ²)			
ЛКГМ	383 (265; 474)	670 (566; 744)	$< 0,001^*$
ТКГМ	352 (272; 446)	558 (492; 734)	$< 0,001^*$
ВКГМ	341 (237; 411) $p = 0,045^{\wedge}$	505 (471; 609) $p = 0,003^{\wedge}$	$< 0,001^*$
ЗКГМ	291 (231; 431) $p = 0,026^{\wedge}$	474 (419; 545) $p = 0,003^{\wedge}$	$< 0,001^*$
ANOVA Фридмана	$df = 3; \chi^2 = 9,3; p = 0,03^{\#}$	$df = 3; \chi^2 = 12,9; p = 0,005^{\#}$	—
3 Средний размер NPY-иммунопозитивных частицы, μm			
ЛКГМ	23,3 (21,4; 26,3)	24,5 (20,6; 29,2)	$> 0,1$
ТКГМ	22,5 (20,3; 26,0)	27,3 (24,2; 29,2)	$< 0,005^*$
ВКГМ	25,1 (21,8; 27,7)	29,2 (24,1; 32,8)	$< 0,05^*$
ЗКГМ	24,6 (22,3; 28,7)	31,6 (26,5; 35,4)	$< 0,005^*$
ANOVA Фридмана	$df = 3; \chi^2 = 5,5; p = 0,14^{\#}$	$df = 3; \chi^2 = 6,6; p = 0,09^{\#}$	—
* Различия статистически значимы между группами (критерий Колмогорова-Смирнова для парных сравнений независимых выборок).			
$\wedge$ Различия статистически значимы в сравнении с ЛКГМ (критерий Вилкоксона для парных сравнений зависимых выборок).			
$\#$ Различия статистически значимы между долями коры (ANOVA Фридмана), при $p < 0,05$.			

Возможны два основных варианта увеличения количества NPY-иммунопозитивных структур КГМ при хронической ишемии:

- 1) новообразование, рост и ветвление отростков;
- 2) варикозная фрагментация имеющихся отростков с трансформацией непрерывной структуры в цепочку округлых дискретных частиц.

В пользу преобладания первого варианта свидетельствует то, что при ишемии выявлялось статистически значимое увеличение медианы показателя площади частицы. То есть, несмотря на варикозные изменения, цепочки частиц (отростки) полностью не распадаются на мелкие фрагменты.

Изучение только поперечных срезов отростков тормозных интернейронов в нейропиле КГМ показал, что в группе сравнения во всех изученных долях КГМ преобладали отростки интернейронов диаметром от 0,45 до 0,83 мкм – около 76 %, более крупные отростки (0,84–1,40 мкм и выше) составляли 24 % (таблицы 26–29). При множественном сравнении (ANOVA) выявлены статистически значимые различия характера распределения данного показателя в изученных долях КГМ. В основном последнее касалось распределения крупных частиц (таблицы 26–30). Это, вероятно, свидетельствовало о наличии особенностей разветвления отростков 1–3-го порядка NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов в лобной, теменной, височной и затылочной КГМ.

Однако, при множественном сравнении, структура отношений по этому признаку была иной. Если в группе сравнения максимально отличались лобная и затылочная кора, то в основной группе – лобная и височная, затылочная и височная КГМ. Вполне вероятно, что это свидетельствовало о различной реорганизации тормозной системы в сравниваемых долях КГМ при хронической ишемии. Кроме того, ишемия приводила к увеличению доли поперечно срезанных крупных дендритов (см. таблицы 26–29).

Существенно то, что, несмотря на некоторое уменьшение доли самых тонких (площадь поперечного среза 5–8 μm^2) дистальных отростков интернейронов при хронической ишемии (см. таблицы 26–29), их плотность на единицу поля зрения в основной группе была больше, чем в группе сравнения.

Для поля лобной КГМ – на 26,7 % ($p < 0,001$), височной – 19,0 % ($p < 0,01$), затылочной – 28,2 % (критерий χ^2 , $p < 0,001$). Для крупных отростков столь значительное увеличение их плотности не было выявлено. Это, вероятно, свидетельствовало об интенсивном новообразовании, ветвлении и росте тонких отростков тормозных интернейронов при хронической ишемии.

Таблица 26 – Распределение по диаметру поперечных срезов отростков NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов слоя III лобной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения

Диаметр	Группа сравнения, (%)	Основная группа, (%)	χ^2 , уровень p
0,45–0,71 мкм	54,6 (51,5–57,7)	42,5 (39,3–45,8)	$\chi^2 = 26,7$; $p < 0,0001^*$
0,72–0,83 мкм	22,9 (20,4–25,6)	21,5 (18,9–24,3)	$\chi^2 = 0,5$; $p = 0,5$
0,84–0,96 мкм	13,4 (11,4–15,6)	12,7 (10,6–15,0)	$\chi^2 = 0,1$; $p = 0,7$
0,97–1,12 мкм	6,6 (5,2–8,3)	12,2 (10,2–14,5)	$\chi^2 = 16,4$; $p = 0,0001^*$
1,13–1,40 мкм	2,4 (1,6–3,5)	9,5 (7,7–11,6)	$\chi^2 = 40,5$; $p < 0,0001^*$
> 1,40 мкм	0,0	1,6 (0,9–2,6)	$\chi^2 = 12,9$; $p = 0,0003^*$
* Различия статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2). Примечание – В скобках даны значения 95 % доверительного интервала.			

Таблица 27 – Распределение по диаметру поперечных срезов отростков NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов слоя III теменной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения

Диаметр	Группа сравнения, (%)	Основная группа, (%)	χ^2 , уровень p
0,45–0,71 мкм	56,9 (53,8–59,9)	40,8 (37,7–43,9)	$\chi^2 = 51,2$; $p < 0,0001^*$
0,72–0,83 мкм	21,2 (18,8–23,8)	24,4 (21,8–27,2)	$\chi^2 = 2,7$; $p = 0,1$
0,84–0,96 мкм	9,0 (7,3–10,9)	15,6 (13,4–18,9)	$\chi^2 = 19,6$; $p < 0,0001^*$
0,97–1,12 мкм	9,2 (7,5–11,1)	12,6 (10,6–14,8)	$\chi^2 = 5,6$; $p = 0,03^*$
1,13–1,40 мкм	3,2 (2,2–4,5)	6,5 (5,1–8,2)	$\chi^2 = 11,1$; $p = 0,001^*$
> 1,40 мкм	0,4 (0,1–1,0)	0,1 (0,01–0,6)	$\chi^2 = 0,8$; $p = 0,4$
* Различия статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2). Примечание – В скобках даны значения 95 % доверительного интервала.			

Таблица 28 – Распределение по диаметру поперечных срезов отростков NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов слоя III височной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения

Диаметр	Группа сравнения,(%)	Основная группа,(%)	χ^2 , уровень p
0,45–0,71 мкм	50,1 (47,0–53,3)	41,8 (38,7–44,9)	$\chi^2 = 13,5$; $p = 0,0002^*$
0,72–0,83 мкм	23,1 (20,5–25,9)	20,9 (18,4–23,6)	$\chi^2 = 1,3$; $p = 0,3$
0,84–0,96 мкм	14,6 (12,4–17,0)	16,2 (14,0–18,6)	$\chi^2 = 0,9$; $p = 0,4$
0,97–1,12 мкм	7,1 (5,6–8,9)	12,4 (10,4–14,6)	$\chi^2 = 15,4$; $p = 0,0001^*$
1,13–1,40 мкм	4,6 (3,4–6,1)	7,1 (5,6–8,9)	$\chi^2 = 5,2$; $p = 0,02^*$
> 1,40 мкм	0,5 (0,2–1,2)	1,6 (0,9–2,6)	$\chi^2 = 4,8$; $p = 0,03^*$
* Различия статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2). Примечание – В скобках даны значения 95 % доверительного интервала.			

Таблица 29 – Распределение (%) по диаметру (мкм) поперечных срезов отростков NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов слоя III затылочной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения

Диаметр	Группа сравнения,(%)	Основная группа, (%)	χ^2 , уровень p
0,45–0,71 мкм	56,1 (52,8–59,4)	47,8 (44,7–51,0)	$\chi^2 = 13,5$; $p = 0,0002^*$
0,72–0,83 мкм	21,1 (18,5–24,0)	22,9 (20,3–25,6)	$\chi^2 = 0,5$; $p = 0,5$
0,84–0,96 мкм	11,9 (9,8–14,2)	14,0 (11,9–16,3)	$\chi^2 = 1,8$; $p = 0,2$
0,97–1,12 мкм	6,4 (4,9–8,2)	9,5 (7,8–11,5)	$\chi^2 = 6,2$; $p = 0,01^*$
1,13–1,40 мкм	3,6 (2,5–5,1)	4,7 (3,5–6,2)	$\chi^2 = 1,3$; $p = 0,3$
> 1,40 мкм	0,9 (0,4–1,8)	1,1 (0,6–2,0)	$\chi^2 = 0,1$; $p = 0,8$
* Различия статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2). Примечание – В скобках даны значения 95 % доверительного интервала.			

Статистически значимые различия между долями по диаметру поперечно срезаемых отростков выявлялись в основной группе и группе сравнения (таблица 30).

Таблица 30 – Множественное сравнение распределения (%) по диаметру (мкм) поперечных срезов отростков NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов слоя III всех отделов коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения

Доли	Группа сравнения	Основная группа
	$df = 15; \chi^2 = 32,2; p = 0,01^*$	$df = 15; \chi^2 = 51,3; p < 0,0001^*$
ЛКГМ и ТКГМ	$df = 5; \chi^2 = 14,1; p = 0,02^*$	$df = 5; \chi^2 = 15,2; p = 0,01^*$
ЛКГМ и ВКГМ	$df = 5; \chi^2 = 15,3; p = 0,01^*$	$df = 5; \chi^2 = 8,3; p = 0,1$
ЛКГМ и ЗКГМ	$df = 5; \chi^2 = 12,4; p = 0,03^*$	$df = 5; \chi^2 = 29,1; p < 0,0001^*$
ТКГМ и ВКГМ	$df = 5; \chi^2 = 14,8; p = 0,01^*$	$df = 5; \chi^2 = 7,1; p = 0,2$
ЛКГМ и ЗКГМ	$df = 5; \chi^2 = 5,1; p = 0,4$	$df = 5; \chi^2 = 22,2; p = 0,001^*$
ВКГМ и ЗКГМ	$df = 5; \chi^2 = 6,1; p = 0,3$	$df = 5; \chi^2 = 22,6; p = 0,0004^*$
* Различия статистически значимы при $p < 0,05$ (критерий χ^2).		

Корреляционный анализ (по Спирмену) выявил сильную положительную связь ($r = 0,82; p = 0,002$) между относительной площадью в поле зрения NPY- и GFAP-позитивного материала. Это свидетельствовало о том, что высокий уровень экспрессии специфического белка в тормозных интернейронах сопровождался высоким уровнем активности глиальных клеток.

Таким образом, по данным иммуногистохимического морфометрического исследования КГМ человека основной группы и группы сравнения, установлено, что хроническая ишемия приводила к статистически значимым изменениям метаболической активности нейронов (NSE), активации образования кальбиндина, регулирующего кальциевый обмен, в пирамидных возбуждающих и непирамидных тормозных нейронах, реорганизации межнейронных взаимоотношений (p38) и компенсаторной гиперплазии и гипертрофии (разрастание отростков) тормозных интернейронов (NPY). Имелись общие и специфические изменения в различных долях и слоях КГМ.

ГЛАВА 5 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование посвящено изучению структурных основ компенсаторной реорганизации возбуждающих (пирамидные) и тормозных (непирамидные) нейронов коры головного мозга человека при хронической ишемии. Для этого в разных долях КГМ с помощью гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов определялись особенности цитоархитектоники возбуждающих и тормозных нейронов в зоне ишемической полутени.

На первом этапе исследования необходимо было показать, что интраоперационный материал из удаленных от опухоли зон можно было использовать в качестве группы сравнения (норма). Поэтому сначала сравнивались группа контроля и группа сравнения. В ходе этого морфометрического исследования удалось показать, что ОЧПН КГМ в группе сравнения было сопоставимо с контрольной группой. Кроме того, в группе сравнения было мало реактивно измененных нейронов и практически отсутствовали сморщенные (пикноморфные) нейроны.

По данным морфометрического исследования, в группе сравнения, как и в контрольной группе, ОЧПН статистически значимо отличалась (ANOVA) в сравниваемых долях и слоях КГМ. Различия выявлены для II, IIIa, IIIb и IIIc слоев. Максимальная ОЧПН отмечалась в слое II ВКГМ и слое IV ЗКГМ.

Следовательно, в участках КГМ, взятых нами в ходе операции (группа сравнения) на значительном удалении от опухоли, не происходило гибели нейронов. Поэтому эти участки имели высокую ОЧПН, структурно-функциональное состояние их возбуждающих и тормозных нейронов можно рассматривать как норму и сравнивать с нейронами ишемически измененных участков КГМ из основной группы для выявления влияния хронической ишемии на цитоархитектонику КГМ человека.

В ходе иммуногистохимического исследования аутопсийного материала нами установлена высокая интенсивность флуоресценции для всех

использованных меток (NSE, p38, кальбиндин, NPY, GFAP) в свойственных для них местах без диффузии белка в межклеточное пространство. При быстрой фиксации (около 6 часов) в аутопсийном материале сохраняется большинство нейрональных белков. Поэтому аутопсийный материал можно было использовать для иммуногистохимического изучения нейронов, синапсов и глиальных клеток.

Решение проблем получения объективной информации при изучении структурно-функционального состояния нейронов головного мозга человека лежит в рамках комплексного использования методов автоматизированного компьютерного изучения изображений, морфометрии и иммуногистохимии [2; 3; 123]. В этой связи нами, на базе программы ImageJ 1.46, разработан способ изучения тинкториальных свойств нейронов и нейропиля КГМ с помощью гистограмм пиксельного распределения на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином.

Эффективность данного комплексного методического подхода наглядно демонстрируется при сравнении результатов нашего исследования КГМ в норме с результатами других авторов. Например, по нашим данным автоматического расчета различных полей зрения фронтального среза слоя IIIb (ЛКГМ) приходилось от 200 до 400 пирамидных нейронов (на 1 мм^2). По данным W.Y. Ong, L.J. Garey [125], в норме в зрительной коре на 1 мм^2 выявлялось около 440 пирамидных нейронов (наш расчет по микрофото из цитируемой работы), что было несколько больше, чем лобной коре. Эти различия можно объяснить тем, что зрительная кора отличается высокой плотностью нейронов. Наши данные по плотности распределения нейронов сравнимы также с данными E. Van Otterloo et al. [125].

Таким образом, приведенное выше сравнение наших и литературных контрольных данных позволяет судить в пользу применения разработанного в настоящем исследовании способа автоматического морфометрического изучения нейронов КГМ человека при хронической ишемии.

Анализ литературных данных по аутопсийному материалу, проведенных морфометрических исследований с определением размеров, численной плотности

клеток и даже их общего содержания по полям в норме и при различных патологических состояниях выявил следующие закономерности. Так в работе E. Van Otterloo et al. [159], в частности, проведена морфометрия дорсолатеральной префронтальной и орбитофронтальной коры (поле 9) в норме. По данным этих авторов, толщина серого вещества лобной коры варьировала от 1,8 до 2,2 мм ($2,02 \text{ мм} \pm 0,245 \text{ мм}$).

По данным этих авторов, общая численная плотность нейронов в дорсолатеральной префронтальной коре в норме варьировала от 18000 до 28000/мм³. При этом максимальная плотность пирамидных нейронов отмечена в слое IIIa и IIIb ($32000 \text{ мм}^3 \pm 6000 \text{ мм}^3$ среднее $\pm$ стандартные отклонение). В слое V численная плотность в норме была на уровне $28000 \text{ мм}^3 \pm 4000 \text{ мм}^3$. В орбитофронтальной коре общая численная плотность варьировала от 14000 до 26000/мм³, а максимальная численная плотность пирамидных нейронов отмечалась в слое IIIc – $41000 \text{ мм}^3 \pm 14000 \text{ мм}^3$. В слое V численная плотность в норме была на уровне $33000 \text{ мм}^3 \pm 7000 \text{ мм}^3$ [159].

При депрессии в старческом возрасте морфометрические параметры, характеризующие слой III статистически значимо не изменялись (в сравнении с аналогичным возрастом) [159].

В первичной слуховой коре в норме объемная доля слоя I составляла – 11,1 %, II – 8,7 %, III – 35,6 % (451 мм^3), IV – 9,5 %, V – 13,4 % и VI – 21,8 %. При шизофрении доля слоя I составляла – 11,7 %, II – 9,0 %, III – 34,3 % (428 мм^3), IV – 9,8 %, V – 12,7 % и VI слоя – 22,5 %, что статистически значимо не отличалось от нормы. Численная плотность пирамидных нейронов в слое III в норме была $20700 \text{ мм}^3 \pm 270 \text{ мм}^3$, а у больных шизофренией – $28600 \text{ мм}^3 \pm 280 \text{ мм}^3$, что было статистически значимо больше на 38,2 %. Однако, при пересчете на весь объем слоя III количество нейронов не различалось [131].

В сравнении с литературными данными настоящее исследования свидетельствует о том, что при хронической ишемии (основная группа), в

сравнении с нормой (группа сравнения), происходило снижение ОЧПН во всех изученных долях КГМ (рисунок 64).

В большей степени страдали пирамидные нейроны слоя II и V, в меньшей – слоя III. Именно в слое III располагается основная доля кальбиндин-позитивных тормозных интернейронов [80]. Однако полной зависимости степени редукции ОЧПН от содержания тормозных интернейронов во всей коре не прослеживалось – в слое II также много тормозных интернейронов, однако общая численная плотность в ВКГМ и ЗКГМ была на уровне слоя V (см. рисунок 64).

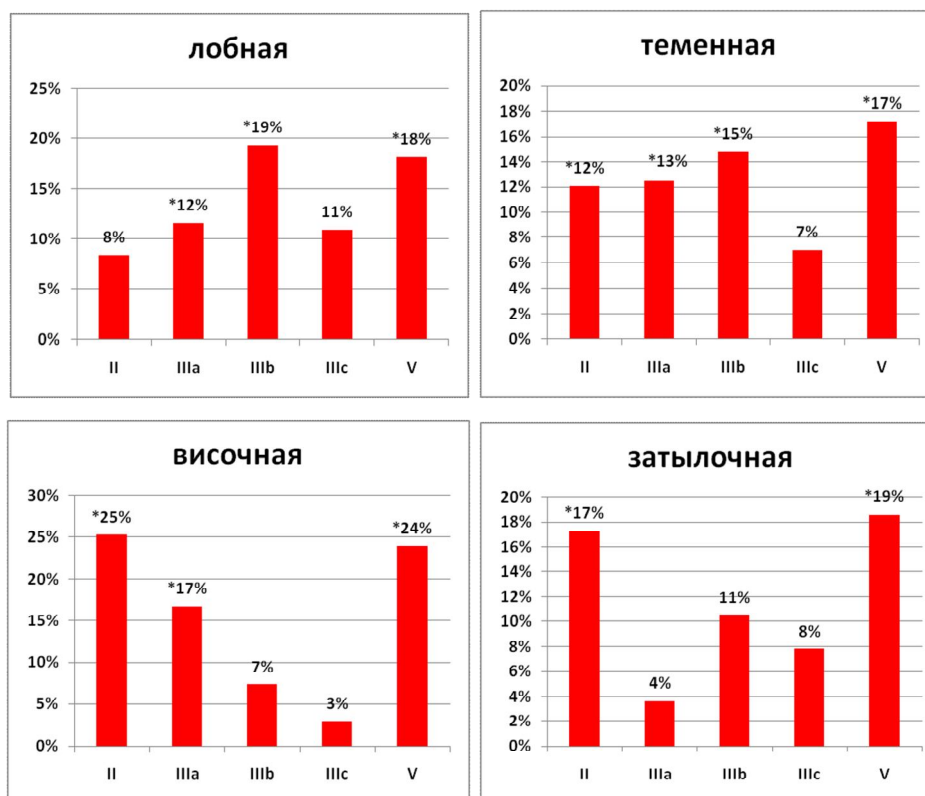


Рисунок 64 – Влияние хронической ишемии на общую численную плотность лобной (париектальный тип), теменной (фронтальный тип), височной (фронтальный тип), затылочной (париектальный тип) коры головного мозга человека. Сравнение с нормой (группа сравнения, биопсия)

Редукция ОЧПН в КГМ при хронической ишемии сопровождалась высоким содержанием реактивно и деструктивно измененных нейронов (рисунок 65).

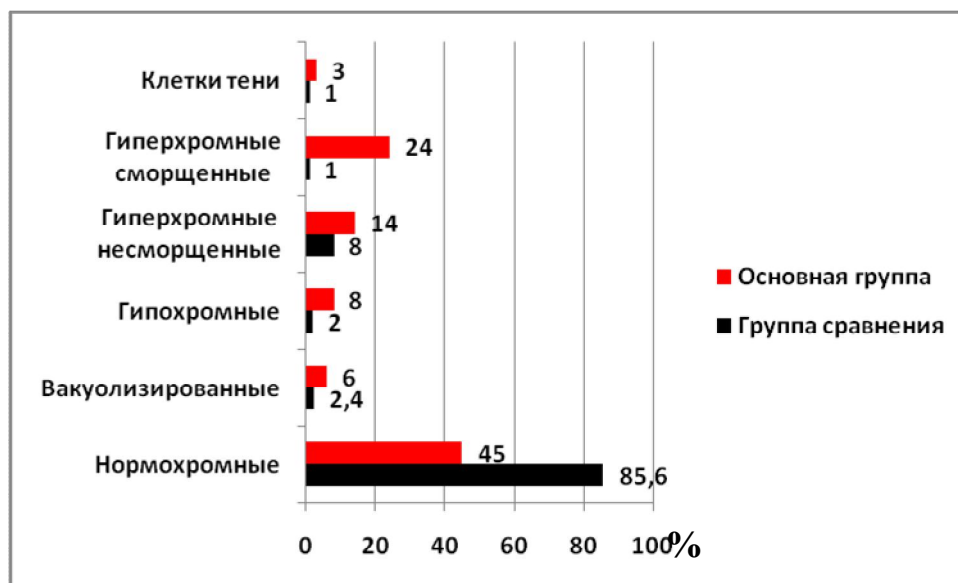


Рисунок 65 – Влияние хронической ишемии на относительное содержание (%) реактивно и деструктивно измененных (пикноморфные) нейронов коры головного мозга человека

В зонах с высоким содержанием пикноморфных нейронов отмечались проявления отека – относительный объем межклеточного пространства и набухших глиальных отростков в нейропиле был в 2,79 раза больше, чем в норме. Это свидетельствовало о появлении свободной жидкости, недостаточности ее реабсорбции глией и капиллярами.

Роль этиологии и патогенеза заболеваний нервной системы широко обсуждаются в литературе. Практически во всех работах подтверждается факт значительной гибели нейронов. Наибольший дефицит нейронов отмечается при нейродегенеративных заболеваниях и очаговой ишемии головного мозга (инсульты).

Наше иммуногистохимическое исследование показало, что сохранившиеся в зоне хронической ишемии нормохромные нейроны содержали больше NSE, чем в норме (рисунок 66).

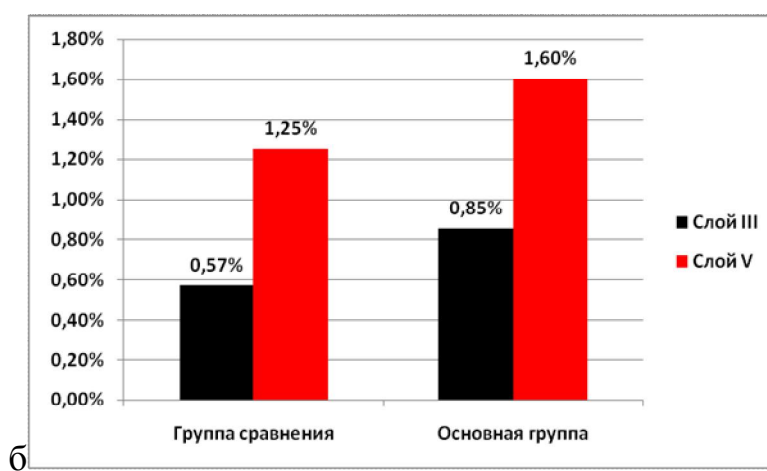
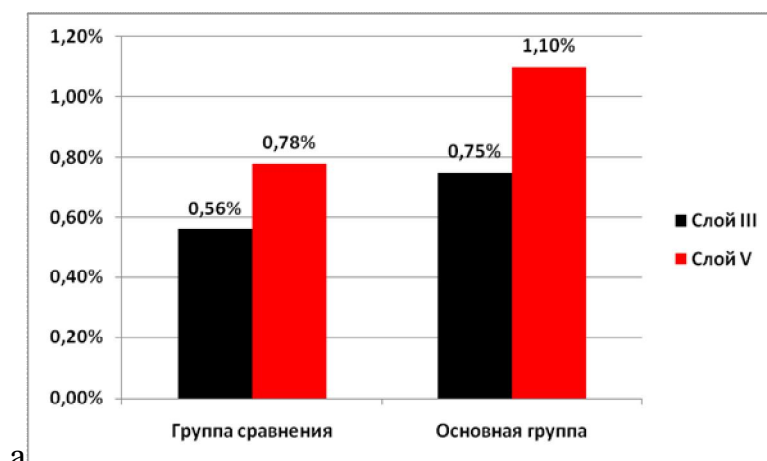


Рисунок 66 – Влияние хронической ишемии на экспрессию NSE (относительная площадь флюоресцирующей метки в поле зрения, %) в сохранившихся нейронах коры головного мозга человека: а – лобная, б – височная кора

С учетом гибели и необратимой деструкции части нейронов при хронической ишемии в сохранившихся нейронах количество NSE увеличивалось в 1,5–2 раза в сравнении с нормой. Это свидетельствовало о высоком уровне метаболической активности нейронов. Усиление экспрессии NSE отмечалось в пирамидных и непиримидных нейронах. Мы рассматривали это как компенсаторную реакцию на дефицит ОЧПН.

Компенсация дефицита общей численной плотности нейронов при хронической ишемии обеспечивается за счет значительной активации сохранившихся нейронов и межнейронных синапсов. Возможность подобной

реорганизации метаболизма сохранившихся после ишемии нейронов показана в эксперименте и на клиническом материале [35; 40; 110].

Иммуноцитохимическая реакция на NSE является хорошим индикатором активности всех типов нейронов в неокортексе. NSE – гликолитический фермент (2-фосфо-D-глицерат гидролаза), относящийся к семейству енолаз, участвует в предпоследнем этапе гликолиза – катализирует переход 2-фосфо-О-глицериновой кислоты в фосфоенолпируват. Усиление метаболической активности нейронов сопровождается увеличением количества этого белка в их цитоплазме.

По нашим данным, в сохранившихся нейронах увеличивалась экспрессия кальбиндина, белка, регулирующего кальциевый обмен клетки и в значительном количестве содержащегося в тормозных интернейронах. В большей степени это было характерно для слоя III (рисунок 67).

Имеются работы, в которых установлено, что после различных патологических воздействий на головной мозг экспериментальных животных и человека происходит реорганизация тормозных и возбуждающих нейронных систем неокортекса. Так, в работе Buritica E. et al. [68] показано, что после черепно-мозговой травмы в зоне ишемической полутени увеличивается количество кальбиндин-позитивных пирамидных нейронов в слое III и непиримидных нейронов в слое IV. В экспериментальных исследованиях выявлено увеличение экспрессии кальбиндина в нейронах после ишемии.

Увеличение количества и большая сохранность кальбиндин-позитивных нейронов рассматривается как результат компенсаторной экспрессии белков, регулирующих внутриклеточную концентрацию ионов кальция и играющих ключевую роль в инициации механизмов некроза и апоптоза [68; 80; 85; 114]. Все это, как и наши данные, свидетельствует о том, что популяция различных кальбиндин-позитивных нейронов (и пирамидных возбуждающих, и непиримидных тормозных) в меньшей степени подвержена необратимой деструкции и элиминации при ишемии.

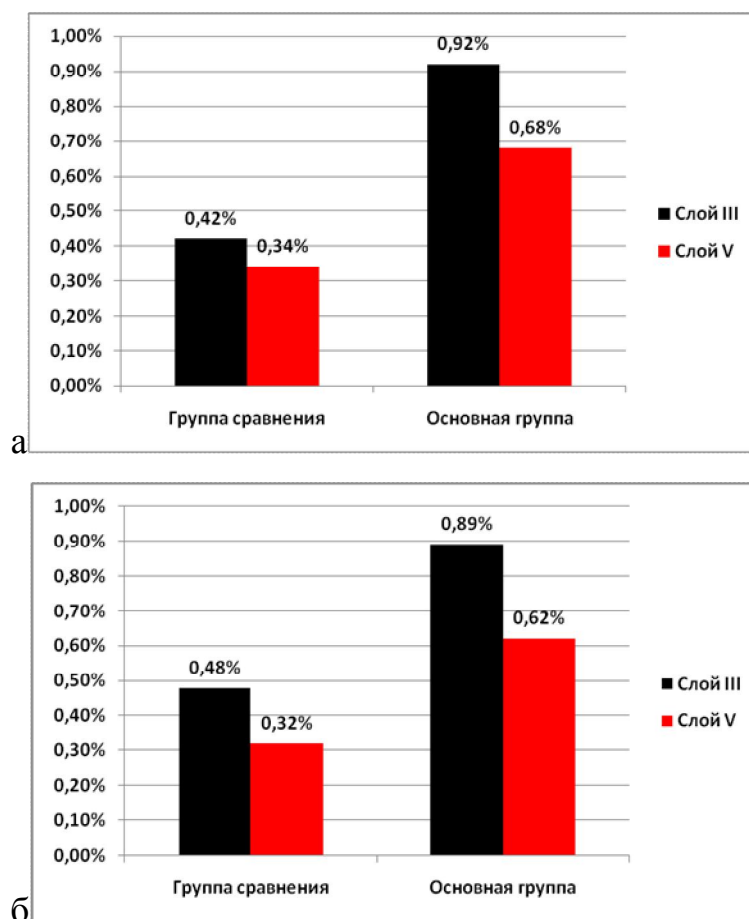


Рисунок 67 – Влияние хронической ишемии на экспрессию кальбиндина (относительная площадь флюоресцирующей метки в поле зрения, %) в сохранившихся нейронах коры головного мозга человека:

а – лобная кора, б – теменная кора

Кроме того, по содержанию кальбиндина в нейронах можно судит о степени защищенности при ишемии конкретной нейронной сети [80; 114].

Поэтому, вполне вероятно, что выявленное нами высокое содержание кальбиндина в крупных пирамидных нейронах слоя V обеспечивало сохранность этих нейронов при хронической ишемии. Известно, что экспрессия кальбиндина и NPY служит защитным механизмом от кальциевой перегрузки при перевозбуждении нейронов – это своеобразные «телохранители» нейронов [80; 81; 114].

При хронической ишемии гибель нейронов и активация сохранившихся клеток сопровождались снижением относительного содержания синаптофизина в

нейропиле и на телах нейронов КГМ. В большей степени разрушались синапсы в слое V (рисунок 68).

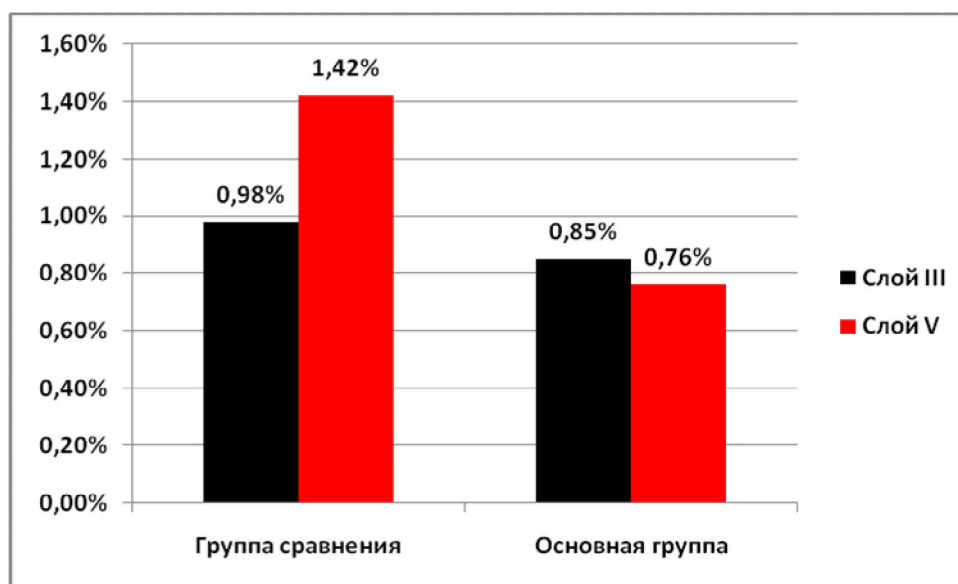


Рисунок 68 – Влияние хронической ишемии на содержание синаптофизина (относительная площадь флюоресцирующей метки в поле зрения, %) в нейропиле и на соме сохранившихся нейронов лобной коры головного мозга человека. В теменной, височной и затылочной коре головного мозга выявлялись аналогичные изменения

При хронической ишемии появлялись дискретные конгломераты флуоресцирующего маркера синапсов на телах нейронов. Хроническая ишемия приводила к уменьшению размеров р38-позитивных флуоресцирующих комплексов. Изменялась мозаика флуоресцирующих гранул на поверхности тел нейронов, увеличивалась доля аксосоматических синапсов. Все это можно рассматривать как структурную основу реорганизации межнейронных отношений КГМ при хронической ишемии.

Изучение тормозных интернейронов показало, что при хронической ишемии относительная площадь NPY-иммунопозитивных структур (меченые тела интернейронов и их отростки) КГМ была статистически значимо выше, чем в норме (рисунок 69). При этом общая численная плотность NPY-позитивных интернейронов от нормы не отличалась (1–2 % от всех типов нейронов).

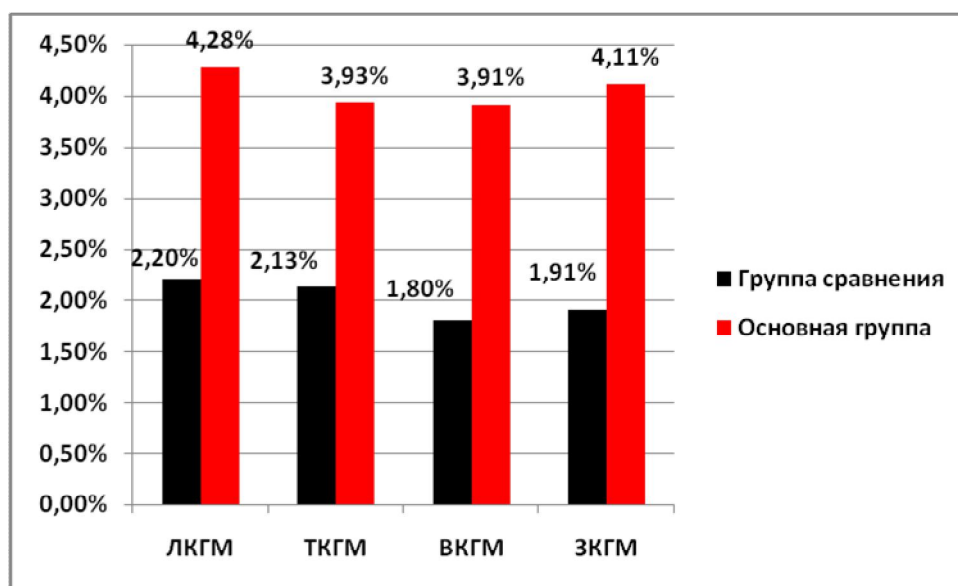


Рисунок 69 – Влияние хронической ишемии на содержание (относительная площадь флюоресцирующей метки в поле зрения, %) NPY-позитивных структур (отростки, тела) в слое III различных долей коры головного мозга человека

Тормозные интернейроны (около 30 %) – разнородной популяцией непирамидных клеток, содержащих медиатор ГАМК, комедиаторы и нейропептиды (соматостатин, NPY, кальбиндин, парвальбумин, кальренин, холецистокинин). Кальбиндин содержится в 25 %, а NPY – в 1–2 % всех тормозных ГАМК-ергических интернейронах [16; 80; 114].

Кальбиндин и NPY выявляются в тормозных интернейронах, что позволяет проводить их специфическую идентификацию и морфометрическую оценку [16; 80; 114]. При этом терминали аксонов тормозных нейронов неокортекса образуют в основном аксосоматические синапсы на возбуждающих пирамидных нейронах и легко идентифицируются на телах этих клеток с помощью иммуногистохимической окраски на p38. Синаптофизин обеспечивает контакт синаптического пузырька с цитоплазматической мембраной и участие в процессе экзо- и эндоцитоза медиатора при синаптической передаче импульса. В настоящее время p38 входит в панель маркеров, применяемых для оценки дифференцировки стволовых клеток. Иммуногистохимические методы выявления p38 используются для оценки

синаптогенеза, а также синаптической плотности нервной ткани в модельных нейробиологических экспериментах [15; 115; 150].

Несомненно, высокая функциональная активность части нейронов КГМ при хронической ишемии неизбежно приводит к реорганизации межнейронных отношений между этими нейронами [35; 41].

При хронической ишемии для обеспечения функционирования нейронных сетей требуется существенно больше синаптических пузырьков и более значительных энергетических затрат для интеграции сохранившихся нейронов в нейронную сеть.

Возбуждающие нейроны (около 70 % всех нервных клеток) в коре головного мозга представлены, в основном, глутаматэргическими и пирамидными эфферентными нейронами [16; 80; 114].

Наличие возбуждающих и тормозных нейронов показано во всех слоях неокортекса. Форма, размеры тела, характер разветвления, длина отростков различных возбуждающих и тормозных нейронов существенно отличаются, что так же позволяет дискриминировать эти клетки [16; 80].

К сожалению, прямое выявление возбуждающих пирамидных нейронов затруднено в силу того, что глутамат, основной медиатор этих нейронов, не является белком и не может быть выявлен с помощью специфических иммуногистохимических методов. Поэтому судить о содержании возбуждающих пирамидных нейронов можно лишь по разнице между общим количеством нейронов и тормозных нейронов. Активность нейронов КГМ в целом определялась по количеству маркера к NSE, а состояние межнейронных аксосоматических (тормозных) синапсов – по количеству маркера к p38 на телах пирамидных нейронов [57; 68; 74; 79; 85; 101].

Сохранность интернейронов при ишемии рассматривается, как результат компенсаторной экспрессии кальбиндина [68; 76; 80; 114].

Кроме того, известно, что экспрессия нейропептида Y служит защитным механизмом от кальциевой перегрузки при перевозбуждении нейронов. Действие нейропептида Y может быть связано с влиянием как на пресинаптические Y2

рецепторы, ингибирующие выделение глутамата, так и на Y1 рецепторы (в пре- и постсинаптической структуре), уменьшающие вход ионов кальция и выделение глутамата [71; 81; 83].

Таким образом, сочетанное использование в настоящей работе окраски по Нисслю, иммуногистохимического выявления белков NSE, кальбиндина, NPY и p38 на серийных срезах неокортекса позволило получить новые данные о структурно-функциональном состоянии популяции возбуждающих и тормозных нейронов, а также о синаптических взаимоотношениях этих нейронов в норме и при хронической ишемии. При хронической ишемии в возбуждающих и тормозных нейронах КГМ существенно усиливается экспрессия белков, обеспечивающих активацию метаболизма (NSE), а также белков, регулирующих кальциевый обмен (кальбиндин и p38). Вероятно, что все это повышает устойчивость нейронных сетей и обеспечивает возможность реализации механизмов их компенсаторной реорганизации за счет гипертрофии сохранившихся нейронов, роста их отростков и синаптической пластичности.

Положительная корреляционная связь между показателями структурно-функционального состояния тормозных интернейронов и глиальных клеток свидетельствовала о том, что в совокупности деятельность этих клеток направлена на сохранение возбуждающих нейронов КГМ. Тормозные интернейроны снижают возбудимость клеток, уменьшают выделение глутамата (основной нейромедиатор КГМ) в синаптическую щель, а астроциты обеспечивают захват свободного глутамата из межклеточного пространства. Все это препятствует развитию механизмов эксайтотоксического повреждения (некроза и апоптоза).

Кроме того, астроциты и микроглия обеспечивают утилизацию поврежденных клеток и структурно-функциональное восстановление нейронных сетей в поврежденном головном мозге. Глиальные клетки-сателлиты способствуют восстановлению частично поврежденных нейронов за счет симбиоза, усиливающего адаптивный потенциал взаимодействующих клеток [40; 83; 116].

В этой связи предлагается гипотеза о роли тормозных интернейронов и глиальных клеток в защите и адаптивно-компенсаторной реорганизации нейронных сетей КГМ человека при хронической ишемии (рисунок 70).



Рисунок 70 – Схема адаптивно-компенсаторная реорганизация нейронов и нейронных сетей коры головного мозга человека при хронической ишемии

В работе доказаны следующие основные положения в соответствии с поставленными целями и задачами.

В зоне длительных хронических нарушений микроциркуляции активируются механизмы естественной защиты нейронных сетей от эксайтотоксического повреждения путем увеличения синтеза кальбиндина, белка, регулирующего кальциевый обмен.

Защита нейронных сетей осуществляется активацией тормозных интернейронов, плотная сеть их отростков блокирует внутрикорковое распространение возбуждающей импульсации от переживающих гиперактивных нейронов по КГМ.

Гипертрофия клеток нейроглии обеспечивает удаление избытка глутамата из межклеточного пространства, снижая тем самым вероятность активации кальций-зависимых механизмов цитотоксичности, которая развертывается в результате неуправляемого нарастания возбуждающей активности глутаматергических нейронов.

Тормозные интернейроны осуществляют локальную регуляцию гемодинамики путем увеличения в межклеточном пространстве нейротрансмиттера NPY.

Процесс компенсации при хронической ишемии перестраивает утраченные межнейронные связи, уравнивает баланс между тормозными и возбуждающими системами коры, выступает элементом пластичности и регенерации.

Таким образом, полученные нами данные могут служить для понимания компенсаторной реорганизации возбуждающих и тормозных нейронов коры головного мозга человека при хронической ишемии.

ВЫВОДЫ

1. Хроническая ишемия, в сравнении с нормой, приводит к уменьшению общей численной плотности нейронов во всех слоях лобной, теменной, височной и затылочной коры головного мозга человека, а также компенсаторно-восстановительной реорганизации сохранившихся пирамидных и непирамидных нейронов, глиальных клеток и синапсов. В большей степени страдают нейроны слоя II и V всех изученных долей коры головного мозга человека.

2. Уменьшение общей численной плотности (на 24–25 %) нейронов при хронической ишемии сопровождается изменениями тинкториальных свойств нервной ткани коры головного мозга, высоким содержанием реактивно и деструктивно измененных нейронов. Преобладают гиперхромные несморщенные (11,9–16,3 %) и пикноморфные (21,4–26,8 %) нейроны.

3. Снижение общей численной плотности нейронов при хронической ишемии компенсируется за счет значительной активации сохранившихся нормохромных нейронов, в которых содержание NSE увеличивается в 1,5–2 раза по сравнению с нормой. Компенсаторное усиление экспрессии NSE характерно для пирамидных и непирамидных нейронов.

4. Хроническая ишемия приводит к снижению относительного содержания p38 (синаптофизина) в нейропиле и на телах нейронов коры головного мозга. Появляется большое количество p38-негативных нейронов. В большей степени разрушаются синапсы в слое V всех изученных долей коры головного мозга человека.

5. При хронической ишемии в сохранившихся пирамидных и непирамидных нейронах коры головного мозга увеличивается экспрессия кальбиндина, белка, регулирующего кальциевый обмен клетки. В большей степени это характерно для тормозных интернейронов слоя III всех изученных долей коры головного мозга человека.

6. Относительная площадь NPY-иммунопозитивных структур (меченые тела тормозных интернейронов и их отростки) коры головного мозга при хронической

ишемии статистически значимо выше (в 2 раза), чем в норме. При этом общая численная плотность NPY-позитивных интернейронов от нормы не отличается (1–2 % от всех типов нейронов).

7. При хронической ишемии существует сильная положительная корреляционная связь между показателями структурно-функционального состояния тормозных интернейронов и глиальных клеток, что является морфологическим отражением защиты нейронов от повреждения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Используемый в ходе настоящего исследования подход к изучению изменений тинкториальных свойств нервной ткани по палитре цветного изображения и распределению пикселей может быть использован для точного определения степени базо- и эозинофилии нейропиля, нейронов и их отростков, проведения сравнительного анализа структурно-функционального состояния ткани по ее тинкториальным свойствам, оценки степени отека-набухания нервной ткани.

2. Полученные результаты целесообразно использовать для разработки систем объективного автоматизированного морфометрического изучения нервной ткани на серийных срезах при окраске по Нисслю, гематоксилином-эозином и иммуногистохимических исследованиях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ	– аденозиндифосфат
АМФ	– аденозинмонофосфат
АТФ	– аденозинтрифосфат
БВ	– белое вещество
ВКГМ	– височная кора головного мозга
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЗКГМ	– затылочная кора головного мозга
ЗХИП	– зона хронической ишемической полутени
КГМ	– кора головного мозга
ЛКГМ	– лобная кора головного мозга
ОЧПН	– общая численная плотность нейронов
РНК	– рибонуклеиновая кислота
ТКГМ	– теменная кора головного мозга
ЦНС	– центральная нервная система
ANOVA	– Analysis of Variance (однофакторный дисперсионный анализ)
GFAP	– глиальный фибриллярный кислый белок
NeuN	– neuronal specific nuclear protein (специфический нейрональный ядерный белок)
NPY	– нейропептид Y
NSE	– нейронспецифическая енолаза
p38	– синаптофизин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г. Г. Основы количественной патологической анатомии / Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Актуальные проблемы изучения нейроглиальных взаимоотношений коры головного мозга человека в постишемическом периоде / А. В. Мыщик [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 113, № 6. – С. 48–51.
3. Актуальные проблемы изучения структурно-функционального состояния нейронов коры головного мозга человека в постишемическом периоде / А. В. Мыщик // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2012. – Т. 1, № 1. – С. 37–48.
4. Бережная, М. А. Межполушарная асимметрия нейроно-глиально-капиллярных взаимоотношений V слоя в верхних лобных извилинах головного мозга человека / М. А. Бережная, В. В. Гаргин, С. Ю. Масловский // Вестник проблем биологии и медицины. – 2013. – Т. 2, № 3 (103). – С. 274–277.
5. Беритов, И. С. Структура и функции коры большого мозга / И. С. Беритов. – М.: Наука, 1969. – 532 с.
6. Блинков, С. М. Мозг в цифрах и таблицах / С. М. Блинков, И. И. Глезер. – Л. : Медицина, 1964. – 471 с.
7. Богданов, О. В. Структурно-функциональное развитие конечного мозга / О. В. Богданов, М. В. Медведева, Н. Н. Василевский. – Л. : Наука, 1986. – 152 с.
8. Боголепова, И. Н. Возрастные изменения цитоархитектоники речедвигательных полей лобной области коры мозга мужчин / И. Н. Боголепова, Л. И. Малофеева // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2013. – Т. 2, № 1. – Р. 25–30.
9. Вараксин, А. Н. Статистический анализ биологической и медицинской информации: проблемы и решения / А. Н. Вараксин // Международный журнал медицинской практики. – 2006. – № 2. – С. 35–38.

10. Волкова, Д. А. Структурно-функциональный анализ нейродегенеративных перестроек в коре больших полушарий крыс при фокальной ишемии разной степени тяжести: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Д. А. Волкова – Москва, 2012. – 24 с.
11. Гармашева, Н. Л. Критические периоды развития центральной нервной системы человека в раннем онтогенезе / Н. Л. Гармашева // Архив анат., гистол и эмбриологии. – 1988. – № 6. – С. 9–15.
12. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М. : Практика, 1999. – 334 с.
13. Глиальный фибриллярный кислый белок в астроцитах неокортекса человека / Д. Э. Коржевский [и др.] // Морфология. – 2004. – Т. 126, № 5. – С. 7–10.
14. Гринхальх, Т. Основы доказательной медицины / Т. Гринхальх. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 240с.
15. Иммунофлуоресцентная верификация и морфометрия аксосоматических синапсов неокортекса человека при острой и хронической ишемии / А. В. Мыщик [и др.] // Морфологические ведомости. – 2012. – № 3. – С. 53–60.
16. Калиниченко, С. Г. Нейроглиоформные клетки: нейрохимическая характеристика, пространственная организация и роль в тормозной системе новой коры / С. Г. Калиниченко, Ю. В. Дудина, П. А. Мотавкин // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 508–514.
17. Кононова, Е. П. Лобная область головного мозга / Е. П. Кононова. – Л. : Медицина, 1965. – 176с.
18. Куликова, С. Н. Реорганизация коры и изменения проводящих путей у пациентов с рассеянным склерозом в динамике после обострения с двигательными нарушениями / С. Н. Куликова, А. В. Переседова, В. В. Брюхов // Медицинская визуализация. – 2013. – № 6. – С. 7–18.
19. Ланг, Т. А. Описание статистики в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т. А. Ланг, М. Сесик. – М. : Практическая медицина. – 2011. – 477с.

20. Лурия, А. Р. Высшие корковые функции человека и их нарушения при локальных поражениях мозга / А. Р. Лурия. – М. : Изд-во МГУ, 1962. – 431 с.
21. Маслов, Н. В. Структурно-функциональная организация нейронов теменной коры головного мозга крыс при действии малых доз ионизирующего излучения / Н. В. Маслов // Журнал теоретической и практической медицины. – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 43–46.
22. Матвеев, А. Г. Феномен цитотоксичности и механизмы повреждения нейронов новой коры при гипоксии и ишемии / А. Г. Матвеев // Pacific Medical Journal. – 2004. – №. 2. – Р. 18–23.
23. Морфологические изменения вентрикулярной герминативной зоны и неокортекса больших полушарий головного мозга у плодов человека и новорожденных с 22-й по 40-ю недели пренатального онтогенеза / Е. В. Проценко [и др.] // Онтогенез. – 2014. – Т. 45, № 5. – С. 349.
24. Морфологические изменения головного мозга при вич-инфекции на фоне наркомании / М. М. Одинак [и др.] // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 65–75.
25. Морфологические изменения головного мозга при острых комбинированных отравлениях азалептином и этиловым алкоголем / А. М. Голубев [и др.] // Общая реаниматология. – 2012. – Т. 8, № 6. – С. 31–36.
26. Морфометрическая автоматическая оценка морфологии митохондрий коры головного мозга экспериментальных животных и человека в норме и в постишемическом периоде / С. С. Степанов [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19, № 3. – С. 14–18.
27. Морфофункциональная характеристика поясничного утолщения спинного мозга крысы / Е. Г. Гилерович [и др.] // Морфология. – 2007. – Т. 132, № 5. – С. 33–37.
28. Мыщик А. В. Структурно-функциональная реорганизация популяции нейронов лобной коры головного мозга человека при хронической ишемии различной степени тяжести / А. В. Мыщик // Омский научный вестник. – № 1 (94). – 2010. – С. 13–16.

29. Оленев, С. Н. Конструкция мозга / С. Н. Оленев. – Л. : Медицина, 1987. – 206 с.
30. Охотин, В. Е. Гистофизиология корзинчатых клеток неокортекса / В. Е. Охотин, С. Г. Калиниченко // Морфология. – 2001. – Т. 120, № 4. – С. 7–24.
31. Платонов А. Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А. Е. Платонов. – М. : Из-во РАМН, 2000. – 52 с.
32. Поляков, Г. И. Кора головного мозга человека// Естественнаучные основы психологии / Г. И. Поляков. – М. : МГУ, 1978. – С. 55–75.
33. Поляков, Г. И. О принципах нейронной организации мозга / Г. И. Поляков. – М. : Наука, 1965. – 166 с.
34. Поляков, Г. И. Основы систематики нейронов новой коры большого мозга человека / Г. И. Поляков. – М.: Наука, 1973. – 305 с.
35. Постишемическая реорганизация межнейронных синапсов неокортекса млекопитающих // Патологическая физиология и экспериментальная терапия / В. В. Семченко, [и др.]. – 2012. – № 4. – С. 30–34.
36. Развитие височной области коры мозга человека в средний и поздний периоды пренатального онтогенеза / Е. И. Краснощекова [и др.] // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. – 2007. – № 3. – С. 108–116.
37. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2002. – 312с.
38. Савельев, С. В. Происхождение мозга / С. В. Савельев. – М.: ВЕДИ, 2005. – 368 с.
39. Савельев, С. В. Сравнительная анатомия нервной системы позвоночных / С. В. Савельев. – М. : Гэотар-мед, 2001. – 272 с.
40. Семченко, В. В. Постаноксическая энцефалопатия / В. В. Семченко, С. С. Степанов, Г. В. Алексеева. – Омск: Омская областная типография, 1999. – 448 с.
41. Семченко, В. В. Синаптическая пластичность головного мозга

(фундаментальные и прикладные аспекты) / В. В. Семченко, С. С. Степанов, Н. Н. Боголепов. – М.: Директ-Медиа, 2014. – 499 с.

42. Симчера, В. М. Методы многомерного анализа статистических данных / В. М. Симчера. – М.: Финансы и статистика, 2008. – 400 с.

43. Сравнительные аспекты структурной организации астроцитов первого слоя коры головного мозга человека и крысы // Журнал эволюционной биохимии и физиологии / Е. Г. Сухорукова [и др.]. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 280–286.

44. Структурно–функциональное состояние пирамидных нейронов коры головного мозга человека в постреанимационном периоде / В. А. Акулинин [и др.] // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2012. – Т. 10, №4. – С. 21–28.

45. Фарбер, Д. А. Принципы системной структурно–функциональной организации мозга и основные этапы ее формирования / Д. А. Фарбер // Структурно-функциональная организация развивающегося мозга. – Л. : Наука, 1990. – 168 с.

46. Хренов, Ф. И. Количественный анализ синаптофизина (p38) в мозге потомства второго поколения от самцов крыс с длительной морфинной интоксикацией / Ф. И. Хренов, П. В. Беличенко, И. Ю. Шамакина // Бюллетень экспер. биол. и мед. – 2000. — Т. 129, № 1. — С. 50–52.

47. Худоевков, Р. М. Количественная морфохимическая характеристика нейронов черной субстанции мозга крысы и ее объемная реконструкция / Р. М. Худоевков, Д. Н. Воронков, Ю. В. Дикалова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – № 12. – С. 834–838.

48. Худоевков, Р. М. Количественная оценка нейронов и нейроглии с помощью компьютерной морфометрии / Р. М. Худоевков, Д. Н. Воронков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 1. – С. 109–112.

49. Черток, В. М. Новые нейротрансмиттеры и их роль в центральных механизмах регуляции кровообращения / В. М. Черток, А. Е. Коцюба // Pacific Medical Journal. – 2013. – № 4. – Р. 22–27.

50. Шевченко, Ю. Г. Развитие коры мозга человека в свете онтофилогенетических соотношений / Ю. Г. Шевченко. – М. : Наука, 1972. – 256 с.
51. Шилко, В. И. Поражение головного мозга при фетальном алкогольном синдроме / В. И. Шилко, Ж. Л. Малахова, А. А. Бубнов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 7. – С. 100–103.
52. A cross-platform freeware tool for digital reconstruction of neuronal arborizations from image stacks / K. M. Brown [et al.] // Neuroinformatics. – 2005. – Vol. 3, № 4. – P. 343–360.
53. A light and electron microscopic study of GAT-1-positive cells in the cerebral cortex of man and monkey / W. Y. Ong [et al.] // J Neurocytol. – 1998. – Vol. 27, № 10. – P. 719–730.
54. A new model of transient focal cerebral ischemia for inducing selective neuronal necrosis / E. M. Arsava [et al.] // Brain Res Bull. – 2009. – Vol. 78, № 4–5. – P. 226–231.
55. A voxel-based morphometric analysis of cerebral gray matter in subcortical ischemic vascular dementia patients and normal aged controls / C. Li [et al.] // Int J Med Sci. – 2011. – Vol. 8, № 6. – P. 482–486.
56. Abramoff, M. D. Image processing with ImageJ / M. D. Abramoff, P. J. Magelhaes, S. J. Ram // Biophotonics International. – 2004. – Vol. 11, № 7. – P. 36–42.
57. Altered posterior cingulate cortical cytoarchitecture, but normal density of neurons and interneurons in the posterior cingulate cortex and fusiform gyrus in autism / A. L. Oblak [et al.] // Autism Res. – 2011. – Vol. 4, № 3. – P. 200–211.
58. Associative image analysis: A method for automated quantification of 3D multi-parameter images of brain issues / C. S. Bjornsson [et al.] // J Neurosci Methods. – 2008. – Vol. 170. – P. 165–178.
59. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat / E. Vicente [et al.] // Brain Res. – 2009. – Vol. 1251. – P. 204–212.

60. Automated neurite labeling and analysis in fluorescence microscopy images / G. Xiong [et al.] // *Cytometry A*. – 2006. – Vol. 69, № 6. – P. 494–505.
61. Bauer, K. F. Elektronenmikroskopische beobachtungen an der menschlichen hirnrinde / K. F. Bauer // *Fortschritte der Neurologie, Psychiatrie und ihre Grenzgebiete*. – 1968. – Vol. 36. – P. 275–309.
62. Berdard, A. Chemical characterization of newly generated neurons in the striatum of adult primates / A. Berdard, C. Gravel, A. Parent // *Exp Brain Res*. – 2006. – Vol. 170. – P. 501–512.
63. Braak, H. Architectonics of the human telencephalic cortex / H Braak. – Berlin : Springer-Verlag, 1980. – 279 p.
64. Bukovics, P. Aldehyde fixation is not necessary for the formation of "dark" neurons / P. Bukovics, J. Pál, F. Gallyas // *Acta Neuropathol*. – 2008. – Vol. 116, № 4. – P. 463–464.
65. Bystron I. Development of the human cerebral cortex: boulder committee revisited / I. Bystron, C. Blakemore, P. Rakic // *Nat Rev Neurosci*. – 2008. – Vol. 9. – P. 110–122.
66. Cerebral microinfarcts: a systematic review of neuropathological studies / M. Brundel [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2012. – Vol. 32. – P. 425–436.
67. Cerebral perfusion changes in chronic subdural hematoma / P. J. Slotty [et al.] // *J Neurotrauma*. – 2013. – Vol. 30, № 5. – P. 347–351.
68. Changes in calcium-binding protein expression in human cortical contusion tissue / E. Buriticá [et al.] // *J Neurotrauma*. – 2009. – Vol. 26, № 12. – P. 2145–2155.
69. Changes in immunoreactivity to calcium-binding proteins in the anterior olfactory nucleus of the rat after neonatal olfactory deprivation / M. V. Barbado [et al.] // *Exp. Neurol*. – 2002. – Vol. 177. – P. 133–150.
70. Characterizing infarction and selective neuronal loss following temporary focal cerebral ischemia in the rat: a multi-modality imaging study / S Ejaz [et al.] // *Neurobiol Dis*. – 2013. – Vol. 51. – P. 120–132.
71. Chen, S. H. Peripheral and central administration of neuropeptide Y in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model reduces cerebral blood flow and increases

infarct volume / S. H. Chen, R. T. Cheung // Brain Res. – 2002. – Vol. 927, № 2. – P. 138–143.

72. Clinical significance of T1-weighted MR images following transient cerebral ischemia / H. Aoe [et al.] // J Neurol Sci. – 2006. – Vol. 241. – P. 19–24.

73. Cragg, B. G. Ultrastructural features of human cerebral cortex / B. G. Cragg // Journal of Anatomy. – 1976. – Vol. 121. – P. 331–362.

74. De Almeida, J. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT_{2A} receptors in human and monkey prefrontal cortex / J. De Almeida, G. Mengod // Journal of Neurochemistry. – 2007. – Vol. 103. – P. 475–486.

75. De Felipe J. Cortical interneurons: from Cajal to 2001 / J. De Felipe // Pr. Brain Res. – 2002. – Vol. 136. – P. 215–234.

76. Desgent, S. Altered expression of parvalbumin and calbindin in interneurons within the primary visual cortex of neonatal enucleated hamsters / S. Desgent, D. Boire, M. Ptito // Neuroscience. – 2010. – Vol. 171, № 4. – P. 1326–1340.

77. Developmental regulation and individual differences of neuronal H3K4me₃ epigenomes in the prefrontal cortex / I. Cheung [et al.] // PNAS. – 2010. – Vol. 107, № 19. – P. 8824–8829.

78. Differential localisation of the metabotropic glutamate receptor mGluR1a and the ionotropic glutamate receptor GluR2/3 in neurons of the human cerebral cortex / W. Y. Ong [et al.] // Exp Brain Res. – 1998. – Vol. 119, № 3. – P. 367–374.

79. Ding, S. L. Borders, extent, and topography of human perirhinal cortex as revealed using multiple modern neuroanatomical and pathological markers / S. L. Ding, G. W. Van Hoesen // Hum Brain Mapp. – 2010. – Vol. 31, № 9. – P. 1359–1379.

80. Druga, R. Neocortical inhibitory system (cortical interneurons / GABAergic neurons/calcium-binding proteins/neuropeptides) / R. Druga // Folia Biologica (Praha). – 2009. – Vol. 55. – P. 201–217.

81. Duszczek, M. Changes in the NPY immunoreactivity in gerbil hippocampus after hypoxic and ischemic preconditioning / M. Duszczek,

A. Ziembowicz, R. Gadamski // *Neuropeptides*. 2009. – Vol. 43, № 1. – P. 31–39.

82. Eccles, J. C. *The cerebral cortex. A theory of its operation* / J. C. Eccles // *Cerebral cortex*. Vol. 2. *Functional properties of cortical cells* / ed. by E. G. Jones, A. Peters. – N.Y., 1984. – P. 1–36.

83. Effects of transient forebrain ischemia on peptidergic neurons and astroglial cells: evidence for recovery of peptide immunoreactivities in neocortex and striatum but not hippocampal formation / R. Grimaldi [et al.] // *Exp Brain Res*. – 1990. – Vol. 82, № 1. – P. 123–136.

84. Excess of neurons in the human newborn mediodorsal thalamus compared with that of the adult / M. Abitz [et al.] // *Cereb. Cortex*. – 2007. – Vol. 17. – P. 2573–2578.

85. Expression of interneuron markers in the dorsolateral prefrontal cortex of the developing human and in schizophrenia / S. J. Fung [et al.] // *Am J Psychiatry*. – 2010. – Vol. 167, № 12. – P. 1479–1488.

86. Expression of neurocan after transient middle cerebral artery occlusion in adult rat brain / K. Deguchi [et al.] // *Brain Res*. – 2005. – Vol. 1037, № 1–2. – P. 194–199.

87. Feldman, M. L. *Morphology of the neocortical pyramidal neuron* / M. L. Feldman // *Cerebral cortex*. Vol. 1. *Cellular components of the cerebral cortex*. – N. Y.; London : Plenum Press, 1984. – P. 123–189.

88. Ferreira, T. A. *The ImageJ user guide version 1.43* / T. A. Ferreira, W. Rasband. – 2010. – <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>.

89. Ferrer, I. A Golgi study of the sixth layer of the cerebral cortex. II. The gyrencephalic brain of Carnivora, Artiodactyla and Primates / I. Ferrer, I. Fabregues, E. Condom // *J. Anat*. – 1986. – Vol. 146. – P. 87–104.

90. Fetal blood-brain barrier P-glycoprotein contributes to brain protection during human development / D. Virgintino [et al.] // *J Neuropathol Exp Neurol*. – 2008. – Vol. 67, № 1. – P. 50–61.

91. Fiala, J. C. *Reconstruct: a free editor for serial section microscopy* / J. C. Fiala // *Journal of Microscopy*. – 2005. – Vol. 218, № 1. – P. 52–61.

92. Gittins, R. A. A morphometric study of glia and neurons in the anterior cingulate cortex in mood disorder / R. A. Gittins, P. J. Harrison // *J Affect Disord.* – 2011. – Vol. 133, №1–2. – P. 328–332.
93. Gonzalez-Albo, M. C. The human temporal cortex: characterization of neurons expressing nitric oxide synthase, neuropeptides and calcium-binding proteins, and their glutamate receptor subunit profiles / M. C. Gonzalez-Albo, G. N. Elston, J. DeFelipe // *Cerebral Cortex.* – 2001. – Vol. 11. – P. 1170–1181.
94. Hemodynamic compromise as a cause of internal border-zone infarction and cortical neuronal damage in atherosclerotic middle cerebral artery disease / H. Yamauchi [et al.] // *Stroke* 2009. – Vol. 40. – P. 3730–3735.
95. Hernandez-Orallo, J. ROC curves for regression / J. Hernandez-Orallo // *Pattern Recognition.* – 2013. – Vol. 46, № 12. – P. 3395–3411.
96. Hua, R. Doublecortin-expressing cells in the ischemic penumbra of a small-vessel stroke / R. Hua, R. Doucette, W. Walz // *J Neurosci Res.* – 2008. – Vol. 86, № 4. – P. 883–893.
97. Igarashi, T. Regional vulnerability after traumatic brain injury: gender differences in mice that overexpress human copper, zinc superoxide dismutase / T. Igarashi, T-T. Huang, L. J. Noble // *Experimental Neurology.* – 2001. – Vol. 172. – P. 332–341.
98. Immunocytochemistry of neuron specific enolase (NSE) in the rat brain after single and repeated epileptic seizures / M. Yardimoglu [et al.] // *Int. J Neurosci.* – 2008. – Vol. 118, № 7. – P. 981–983.
99. Immunoreactivity of calcium-binding proteins in the central auditory nervous system of aged rats / S. M. Hong [et al.] // *J. Korean Neurosurg Soc.* – 2009. – Vol. 45. – P. 231–235.
100. Improvement in neuronal survival after ischemic pre-conditioning in hippocampal slice cultures / G. P. Xu [et al.] // *Brain Res.* – 2002. – Vol. 952, № 2. – P. 153–158.

101. Inhibitory interneurons of the human prefrontal cortex display conserved evolution of the phenotype and related genes / C. C. Sherwood [et al.] // *Proc Biol Sci.* – 2010. – Vol. 277, № 1684. – P. 1011–1020.

102. Is neural activation within the rescued penumbra impeded by selective neuronal loss? / E. Carrera [et al.] // *Brain.* – 2013. – Vol. 136. – P. 1816–1829.

103. Ischemia-related changes in naive and mutant forms of ubiquitin and neuroprotective effects of ubiquitin in the hippocampus following experimental transient ischemic damage / H. C. Ahn [et al.] // *Experimental Neurology.* – 2009. – Vol. 220. – P. 120–132.

104. Jortner, B. S. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation / B. S. Jortner // *Neurotoxicology.* – 2006. – Vol. 27. – P. 628–634.

105. Kherani, Z. S. Pharmacologic analysis of the mechanism of dark neuron production in cerebral cortex / Z. S. Kherani, R. N. Auer // *Acta Neuropathol.* – 2008. – Vol. 116, № 4. – P. 447–452.

106. Korzhevskii, D. E. Glial fibrillary acidic protein in astrocytes in the human neocortex / D. E. Korzhevskii, V. A. Otellin, I. P. Grigor'ev // *Neurosci Behav Physiol.* – 2005. – Vol. 35, № 8. – P. 789–792.

107. Kostovic, I. Structural and histochemical reorganization of the human prefrontal cortex during perinatal and postnatal life / I. Kostovic // *Prog. Brain Res.*, 1990. – Vol. 85. – P. 223–240.

108. Late development of the GABAergic system in the human cerebral cortex and white matter / G. Xu [et al.] // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2011. – Vol. 70, № 10. – P. 841–858.

109. Leandro J. J. Automatic contour extraction from 2D neuron images / J. J. Leandro, R. M. Cesar-Jr, F. Costa Lda // *J Neurosci Methods.* – 2009. – Vol. 177, № 2. – P. 497–509.

110. Liu F. TTC, fluoro-jade b and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion / F. Liu, D. P. Schafer, L. D. McCullough // *J Neurosci Methods.* – 2009. – Vol. 179. – P. 1–8.

111. Localization of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in the human cerebral cortex and subcortical white matter – a double immunolabelling and electron microscopic study / W. Y. Ong [et al.] // *J Neurocytol.* – 1995. – Vol. 24, № 8. – P. 602–610.

112. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note / I. Unal-Cevik, M. Kilinc, Y. Gursoy-Ozdemir [et al.] // *Brain Res.* – 2004. – Vol. 1015, № 1–2. – P. 169–174.

113. Loss of synaptophysin and synaptosomal-associated protein 25-kDa (SNAP-25) in elderly Down syndrome individuals / E. G. Downes [et al.] // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2008. – Vol. 34, № 1. – P. 12–22.

114. Maekawa, S. Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study / S. Maekawa, S. Al-Sarraj, M. Kibble // *Brain.* – 2004. – Vol. 127. – P. 1237–1251.

115. Manto, M. Modulation of excitability as an early change leading to structural adaptation in the motor cortex / M. Manto, N. Oulad ben Taib, A. R. Luft // *J Neurosci Res.* – 2006. – V. 83, № 2. – P. 177–180.

116. Mapping selective neuronal loss and microglial activation in the salvaged neocortical penumbra in the rat / J. L. Hughes [et al.] // *Neuroimage.* – 2010. – Vol. 49. – P. 19–31.

117. Marshall, R. S. On the trail of chronic ischemia / R. S. Marshall // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2010. – Vol. 81, № 3. – P. 240.

118. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia / X. Hu [et al.] // *Stroke.* – 2012. – Vol. 43. – P. 3063–3070.

119. Microstructural white matter abnormalities and remission of geriatric depression / C. F. Alexopoulos, C. F. Murphy, F. M. Gunning-Dixon [et al.] // *Am J Psychiatry.* – 2008. – Vol. 165. – P. 238–244.

120. Multiparametric assessment of acute and subacute ischemic neuronal damage: a small animal positron emission tomography study with rat photochemically

induced thrombosis model / D. Fukumoto [et al.] // Synapse. – 2011. – Vol. 65. – P. 207–214.

121. Nag, T. S. Differential expression of syntaxin-1 and synaptophysin in the developing and adult human retina / T. S. Nag, S. Wadhwa // J. Biosci. – 2001. – Vol. 26, № 2. – C. 179–191.

122. NeuriteTracer: a novel ImageJ plugin for automated quantification of neurite outgrowth / M. Pool [et al.] // J Neurosci Methods. – 2008. – Vol. 168, № 1. – P. 134-139.

123. NeurphologyJ: An automatic neuronal morphology quantification method and its application in pharmacological discovery / S-Y. Ho [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2011. – Vol. 12. – P. 1–18.

124. New techniques for imaging, digitization and analysis of threedimensional neural morphology on multiple scales / S. L. Wearne [et al.] // Neuroscience. – 2005. – Vol. 136, № 3. – P. 661–680.

125. Ong, W. Y. Ultrastructural characteristics of human adult and infant cerebral cortical neurons / W. Y. Ong, L. J. Garey // J. Anat. – 1991. – Vol. 175. – P. 79–104.

126. Ong, W. Y. Distribution of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in human cerebral cortical astrocytes – a light and electron microscopic study / W. Y. Ong, L. J. Garey, R. Reynolds // J Neurocytol. – 1993. – Vol. 22, № 10. – P. 893–902.

127. Ong, W. Y. Neuronal architecture of the human temporal cortex / W. Y. Ong, L. J. Garey // Anat Embryol. – 1990. – Vol. 181, № 4. – P. 351–364.

128. Ong, W. Y. Ultrastructural features of biopsied temporopolar cortex (area 38) in a case of schizophrenia / W. Y. Ong, L. J. Garey // Schizophr Res. – 1993. – Vol. 10, № 1. – P. 15–27.

129. Permanent or transient chronic ischemic stroke in the non-human primate: behavioral, neuroimaging, histological, and immunohistochemical investigations /

E. Bihel [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2010. – Vol. 30. – P. 273–285.

130. Preuss T. M. Human-specific organization of primary visual cortex: alternating compartments of dense cat-301 and calbindin immunoreactivity in layer 4 A / T. M. Preuss, G. Q. Coleman // *Cerebral Cortex*. – 2002. – Vol. 12. – P. 671–691.

131. Pyramidal neuron number in layer 3 of primary auditory cortex of subjects with schizophrenia / K-A. Dorph-Petersen [et al.] // *Brain Res*. – 2009. – Vol. 1285. – P. 42–57.

132. Quantitative immunohistochemical analysis of human brain basic fibroblast growth factor, glial fibrillary acidic protein and single-stranded DNA expressions following traumatic brain injury / Q. Wang, T. Ishikawa, T. Michiue [et al.] // *Forensic Sci Int*. – 2012. – Vol. 221, № 1–3. – P. 142–151.

133. Quantitative neurite outgrowth measurement based on image segmentation with topological dependence / W. Yu [et al.] // *Cytometry A*. – 2009. – Vol. 75, N 4. – P. 289–297.

134. Rajkowska, G. Gliogenesis and glial pathology in depression / G. Rajkowska, J. J. Miguel-Hidalgo // *CNS Neurol Disord Drug Targets*. – 2007. – Vol. 6, № 3. – P. 219–233.

135. Rakic, S. Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex / S. Rakic, N. Zecevic // *Cerebral Cortex*. – 2003. – V. 13. – P. 1072–1183.

136. Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression / R. D. Gosselin [et al.] // *Neuroscience*. – 2009. – Vol. 159, № 2. – P. 915–925.

137. Robinson, S. Neonatal loss of gamma-aminobutyric acid pathway expression after human perinatal brain injury / S. Robinson, Q. Li, A. Dechant, M. L. Cohen // *J Neurosurg*. – 2006. – Vol. 104, № 6. – P. 396–408.

138. Robinson, S. Systemic prenatal insults disrupt telencephalon development / S. Robinson // *Epilepsy Behav*. – 2005. – Vol. 7, №3. – P. 345–363.

139. Roland, P. E. Structural divisions and functional fields in the human cerebral cortex / P. E. Roland, K. Zilles // *Brain Research Reviews*. – 1998, № 26. – P. 87–105.
140. Roudenok, V. The development of synaptophysin immunoreactivity in the human sympathetic ganglia / V. Roudenok, W. Kuhnel // *Ann. Anat.* – 2001. – V. 183, № 4. – P. 345–351.
141. Sasaki, S. Ultrastructural study of Betz cells in the primary motor cortex of the human brain / S. Sasaki, M. Iwata // *J. Anat.* – 2001. – Vol. 199. – P. 699–708.
142. Secondary neurodegeneration in remote regions after focal cerebral infarction: a new target for stroke management? / Y. Zhang [et al.] // *Stroke*. – 2012. – Vol. 43. – P. 1700–1705.
143. Selective neuronal damage and Wisconsin card sorting test performance in atherosclerotic occlusive disease of the major cerebral artery / H. Yamauchi [et al.] // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 2011. – Vol. 82. – P. 150–156.
144. Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease / J. C. Baron [и др.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2014. – Vol. 34, № 1. – P. 2–18.
145. Sereno, M. I. Brain mapping in animals and humans / M. I. Sereno // *Current Opinion in Neurobiology*. – 1998, № 8. – 188–194.
146. Silent cortical neuronal damage in atherosclerotic disease of the major cerebral arteries / H. Yamauchi [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2011. – Vol. 31. – P. 953–961.
147. Structural and functional effects of social isolation on the hippocampus of rats with traumatic brain injury / B. Khodaie [et al.] // *Behav Brain Res.* – 2014. – Vol. 278. – C. 55–65.
148. Sugawara, T. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia / T. Sugawara, P. H. Chan // *Antioxid Redox Signal.* – 2003. – Vol. 5, № 5. – P. 597–607.

149. Suzuki, N. Inhibitory neurons in the anterior piriform cortex of the mouse: classification using molecular markers / N. Suzuki, J. M. Bekkers // *J Comp Neurol.* – 2010. – Vol. 518, № 10. – P. 1670–1687.

150. Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood / L. A. Glantz [et al.] // *Neurosci.* – 2007. – Vol. 149, № 3. – P. 582–591.

151. Szentrothai, J. The "module-concept" in cerebral cortex architecture / J. Szentrothai // *Brain Research.* – 1975. – Vol. 95. – P. 475–496.

152. Tarsa, L. Nerve growth factor regulates synaptophysin expressing in developing trigeminal ganglion neurons in vitro / L. Tarsa, A. Balkowiec // *Neuropeptides.* — 2009. — V. 43. — C. 47–52.

153. The cerebral cortex overlying periventricular leukomalacia: analysis of pyramidal neurons / S. E. Andiman [et al.] // *Brain Pathol.* – 2010. – Vol. 20, № 4. – P. 803–814.

154. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate / H. Oogawa [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2006. – Vol. 112. – P. 471–481.

155. The neuropathology of the vegetative state after head injury / J. H. Adams [и др.] // *J Clin Pathol.* – 1999. – Vol. 52. – P. 804–806.

156. The role of C-Fos protein, somatostatin and neuropeptide Y in the pathogenesis of ischemic brain injuries based on animal model of cerebral ischemia / A. A. Jovanović [et al.] // *Coll Antropol.* – 2013. – Vol. 37, № 3. – P. 847–852.

157. Ultrastructural characteristics of blood vessels in the infant and adult human cerebral cortex / H. F. Zhang [et al.] // *Histol Histopathol.* – 1997. – Vol. 12, № 1. – P. 85–97.

158. Uylings, H. B. Development of the cerebral cortex in rodents and man / H. B. Uylings // *Europ. J. Morphol.* – 2000. – Vol. 38. – P. 309–312.

159. Van Otterloo, E. Reductions in neuronal density in elderly depressed are region Specific / E. Van Otterloo, G. O'Dwyer, C. A. Stockmeier // *Int J Geriatr Psychiatry.* – 2009. – Vol. 24, № 8. – P. 856–864.

160. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives / M. Zille [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. – 2012. – Vol. 32. – P. 213–231.

161. Wiedenmann, B. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of M 38000 characteristic of presynaptic vesicles / B. Wiedenmann, W. W. Franke // Cell. — 1985. — V. 41. — P. 1017–1028.

162. Zhang, F. Apoptosis in cerebral ischemia: executional and regulatory signaling mechanisms / F. Zhang, W. Yin, J. Chen // Neurol Res. – 2004. – Vol. 26, № 8. – P. 835–845.

163. Zheng, Z. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications / Z. Zheng, M. A. Yenari // Neurol Res. – 2004. – Vol. 26, № 8. – P. 884–892.

164. Zink, D. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells / D. Zink, N. Sadoni, E. Stelzer // Methods. – 2003. – Vol. 29, № 1. – P. 42–50.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

- 1 Рисунок 1 – Схема дизайна исследования..... С. 32
- 2 Рисунок 2 – Фронтальный срез всех слоев лобной коры (поле 10, париетальный тип) головного мозга, группа контроля. БВ – белое вещество, I – молекулярный, II – наружный зернистый, IIIa, IIIb, IIIc – наружный пирамидный, IV – внутренний зернистый, V – внутренний пирамидный, VI – полиморфный слои коры. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x40. Шкала – 100 мкм. С. 47
- 3 Рисунок 3 – Фронтальный срез всех слоев теменной коры (поле 7, фронтальный тип) головного мозга, группа контроля. БВ – белое вещество, I – молекулярный, II – наружный зернистый, IIIa, IIIb, IIIc – наружный пирамидный, IV – внутренний зернистый, V – внутренний пирамидный, VI – полиморфный слои коры. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x40. Шкала – 100 мкм..... С. 48
- 4 Рисунок 4 – Фронтальный срез всех слоев височной коры (поле 21, фронтальный тип) головного мозга, группа контроля. БВ – белое вещество, I – молекулярный, II – наружный зернистый, IIIa, IIIb, IIIc – наружный пирамидный, IV – внутренний зернистый, V – внутренний пирамидный, VI – полиморфный слои коры. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x40. Шкала – 100 мкм..... С. 49
- 5 Рисунок 5 – Фронтальный срез всех слоев затылочной коры (поле 19, париетальный тип) головного мозга, группа контроля. БВ – белое вещество, I – молекулярный, II – наружный зернистый, IIIa, IIIb, IIIc – наружный пирамидный, IV – внутренний зернистый, V – внутренний пирамидный, VI –

- полиморфный слой коры. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x40. Шкала – 100 мкм..... С. 50
- 6 Рисунок 6 – Фронтальный срез, слои I–IIIa теменной коры головного мозга, группа контроля. I – молекулярный, II – наружный зернистый, IIIa – наружный пирамидный слой коры. Преобладают мелкие пирамидные и непиримидные гиперхромные нейроны. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм. Площадь поля зрения: $468 \times 351 = 164268 \mu^2$ С. 51
- 7 Рисунок 7 – Фронтальный срез, слои IIIa – IV теменной коры головного мозга, группа контроля. IIIa, IIIb, IIIc – наружный пирамидный, IV – внутренний зернистый слой коры. Преобладают средние и крупные пирамидные и непиримидные гиперхромные нейроны, в слое IV – округлые клетки-зерна. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм..... С. 52
- 8 Рисунок 8 – Фронтальный срез, слои IV–VI теменной коры головного мозга, группа контроля. IV – внутренний зернистый, V – внутренний пирамидный, VI – полиморфный слой коры. Преобладают крупные пирамидные гиперхромные нейроны. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм..... С. 53
- 9 Рисунок 9 – Фронтальный срез, слой VI и белое вещество теменной коры головного мозга, группа контроля. БВ – белое вещество, VI – полиморфный слой коры. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм С. 54
- 10 Рисунок 10 – Фронтальный срез, слой III затылочной коры головного мозга, группа контроля. Стрелки – радиальные миелинизированные волокна. Окраска гематоксилин-эозином.

- Ув. х200. Шкала – 100 мкм С. 54
- 11 Рисунок 11 – Маска оригинального изображения (соответствует рисунку 6, слои II и IIIa)..... С. 55
- 12 Рисунок 12 – Различные морфотипы нейронов коры головного мозга, группа контроля (аутопсийный материал): *а, в* – пирамидные нейроны (слой IIIc), *б, г* – непиримидные нейроны (слой VI). Окраска гематоксилин-эозином (*а, б*) и по Нисслю тионином (*в, г*). Ув. х400, шкала 50 мкм..... С. 58
- 13 Рисунок 13 – Фронтальные срезы участков интактной коры головного мозга пациентов, оперированных по поводу опухоли головного мозга. Высокое содержание нормохромных нейронов: *а* – париетальный тип коры (поле 21), *б* – фронтальный тип коры (поле 19), *в* – париетальный тип коры (поле 21). Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200. Шкала – 100 мкм С. 59
- 14 Рисунок 14 – Участок неповрежденной ткани коры головного мозга пациента, оперированного по поводу опухоли головного мозга. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. х400. Шкала – 50 мкм..... С. 60
- 15 Рисунок 15 – Фронтальные срезы височной коры головного мозга пациента, оперированного по поводу опухоли головного мозга, группа сравнения. Тотальное превалирование нормохромных нейронов с хорошо выраженным круглым ядром и базофильной цитоплазмой, дендриты не прокрашены. Окраска тионином по Нисслю. Ув. х200. Шкала – 100 мкм..... С. 61
- 16 Рисунок 16 – Маска оригинального изображения (рисунок 13, височная кора, слои II и IIIa). Все нейроны представлены в виде однородных округлых частиц, что позволяет провести их автоматизированный подсчет в целом и по слоям с помощью

- «Analyze Particles». В поле зрения 103 частицы (628 нейронов на 1 мм²) С. 62
- 17 Рисунок 17 – Различные морфотипы нейронов височной коры головного мозга, группа сравнения (операционный материал, интактные участки): *а, б* – нейроны слоя IIIa и IIIb (окраска гематоксилин-эозином), *в, г* – слоя IIIb и IIIc (окраска по Нисслю тионином). Об. x40, шкала 50 мкм С. 67
- 18 Рисунок 18 – Гистограммы, отражающие клеточный состав полей зрения участков теменной коры головного мозга человека (группа контроля), содержащих только нейропиле (а) и нейропиле+нейроны (б). Стрелка – пиксели 8–29 соответствуют клеткам. 30–79 – фону, более 80 – нейропиле . С. 68
- 19 Рисунок 19 – Гистограммы изображений различных слоев теменной коры головного мозга (поле 7) человека, группа контроля (аутопсийный материал); а – слой I, б – слой II, в – слой IIIa, г – IIIb, д – слой IIIc, е – слой IV, з – слой V, ж – слой VI С. 70
- 20 Рисунок 20 – Гистограммы изображений различных слоев височной коры головного мозга (поле 7) человека, группа контроля (аутопсийный материал); а – нейропиле (без нейронов), б – слой II, в – слой IIIa, г – IIIb, д – слой IIIc, е – слой IV, з – слой V, ж – слой VI С. 71
- 21 Рисунок 21 – Пиксельный состав «клеточной зоны» гистограмм ($n = 100$) изображений участков теменной коры (поле 7) головного мозга человека, группа контроля. Преобладали пиксели (33–40). Материал представлен как относительное содержание (%) и 95 % доверительный интервал (разброс, %) .. С. 72
- 22 Рисунок 22 – Пиксельный состав «клеточной зоны» гистограмм ($n = 100$) изображений височной коры (поле 21), группа

- контроля. Преобладали пиксели (8–20). Материал представлен как относительное содержание (%) и 95 % доверительный интервал (разброс, %). 100 полей зрения С. 73
- 23 Рисунок 23 – Зоны гистограммы, отражающие пиксельный состав нейропиля, клеток, крупных отростков и светлого фона коры головного мозга. Отдельно показана интегральная гистограмма всего поля зрения С. 74
- 24 Рисунок 24 – Гистограммы изображений височной коры, содержащих только нейропиль (а) и нейропиль+нейроны (б). Красная стрелка – пиксели нейропиля, черная – пиксели нейрона С. 75
- 25 Рисунок 25 – Гистограммы изображений различных слоев интактной височной коры головного мозга (поле 21) человека, группа сравнения (биопсийный материал), а – слой I, б – слой II, в – слой IIIa, г – IIIb, д – слой IIIc, е – слой IV, з – слой V, ж – слой VI С. 76
- 26 Рисунок 26 – ROC-кривые, построенные для определения чувствительности и специфичности метода оценки тинкториальных свойств нервной ткани с помощью изучения распределения пикселей в гистограммах цветных изображений теменной коры головного мозга человека. Слой I – AUC = 0,68 (95 % ДИ: 0,64–0,72), $p < 0,0001$; слой V – AUC = 0,72 (95 % ДИ: 0,68–0,76), $p < 0,0001$. AUC – площадь под кривой. Уровень p – в сравнении с диагональю С. 78
- 27 Рисунок 27 – Неповрежденные (черные стрелки) и реактивно измененные (белая стрелка) нейроны, височная кора головного мозга, слои II–IIIa, биопсия. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200. Шкала – 100 мкм С. 80
- 28 Рисунок 28 – Гистограммы пиксельного состава изображений

- различных участков поля зрения слоя II височной коры головного мозга (поле 21) человека при хронической ишемии (биопсийный материал): а – нейропиль, б – интактные нейроны, в – гиперхромные нейроны..... С. 81
- 29 Рисунок 29 – Фрагмент гистограммы (рисунок 27в) изображения коры, отражающий тинкториальные свойства нормохромных нативных (пики 127 и 131) и гиперхромных дегидратированных сморщенных (пики 141, 143 и 146) нейронов С. 81
- 30 Рисунок 30 – Гистограммы пиксельного состава изображений различных участков нейропиля поля зрения слоя II височной коры головного мозга (поле 21) человека при хронической ишемии (биопсийный материал): а – интактный нейропиль, б – нейропиль с умеренными проявлениями отека-набухания (незначительное просветление) С. 82
- 31 Рисунок 31 – Изображения различных участков слоя II височной коры головного мозга (поле 21) человека при хронической ишемии (биопсийный материал) и их гистограммы. Шкала – 50 мкм С. 83
- 32 Рисунок 32 – Изображения различных участков слоя II височной коры головного мозга (поле 21) человека при хронической ишемии (биопсийный материал) и их гистограммы. Шкала – 50 мкм С. 85
- 33 Рисунок 33 – Нейроны слоя IIb в зоне хронической ишемической полутени ТКГМ: а – участок преобладания нормохромных нейронов, умеренная реакция глии; б – гиперхромные нейроны с начальными проявлениями дегидратации по периферии цитоплазмы; в – гиперхромные нейроны с выраженными проявлениями дегидратации и

- сморщиванием клеток; г – гипохромные нейроны, набухание ядра. а, б, г – окраска гематоксилином и эозином, в – окраска по Нисслю тионином. Ув. x400, шкала 50 мкм С. 86
- 34 Рисунок 34 – Пирамидные нейроны слоя V в зоне хронической ишемической полутени ВКГМ, больной Р-в: а – гиперхромные нейроны с начальными проявлениями дегидратации цитоплазмы, перицеллюлярный отек; б – гиперхромные нейроны с выраженными проявлениями дегидратации и сморщиванием клеток; в – гиперхромный сморщенный нейрон с картиной фагоцитоза. а – окраска гематоксилином и эозином, б, в – окраска по Нисслю тионином. Ув. x400, шкала 50 мкм С. 87
- 35 Участок зоны хронической ишемической полутени в ВКГМ с незначительным содержанием реактивно измененных нейронов, больной Р-в. Во всех слоях преобладали нормохромные нейроны. Окраска по Нисслю тионином ув. x100, шкала 100 мкм С. 88
- 36 Рисунок 36 – Участок реактивно измененных нейронов в зоне хронической ишемической полутени ВКГМ, больной Р-в. Во всех слоях преобладали гиперхромные сморщенные нейроны. Окраска по Нисслю тионином. Ув. x100, шкала 100 мкм..... С. 89
- 37 Рисунок 37 – Участок ВКГМ с незначительным содержанием реактивно измененных нейронов, больной П-в, группа сравнения. Во всех слоях преобладали нормохромные нейроны. Окраска по Нисслю тионином. Об. x10, шкала 100 мкм..... С. 90
- 38 Рисунок 38 – Глиальные клетки (стрелки) из слоя III лобной (а), теменной (б), височной (в) и затылочной (г) коры головного мозга человека основной группы. Высокая плотность

- клеточных тел и отростков вокруг нейронов (пустые темные пятна). Иммуногистохимическое окрашивание GFAP (маркер глиоцитов). Ув. x400, шкала 50 мкм С. 96
- 39 Рисунок 39 – Глиальные клетки (стрелки) коры головного мозга человека группы сравнения (а) и основной группы (б). Увеличение плотности клеточных тел и отростков при хронической ишемии вокруг нейронов (пустые темные пятна). Иммуногистохимическое окрашивание GFAP (маркер глиоцитов). Ув. x200, шкала 50 мкм С. 98
- 40 Рисунок 40 – Маски изображений (см. рисунок 39) для определения относительной площади маркера GFAP С. 99
- 41 Рисунок 41 – NSE-позитивные нейроны слоя III лобной коры головного мозга человека, группа ср NSE-позитивные нейроны (стрелки) слоя III лобной коры головного мозга человека, группа сравнения. Иммунофлуоресценция. Ув. x400. Шкала 50 мкм авнения..... С. 101
- 42 Рисунок 42 – NSE-позитивные нейроны (стрелки) слоя III височной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. x200. Шкала 50 мкм С. 102
- 43 Рисунок 43 – NSE-позитивные нейроны (стрелки) слоя IV (а) и V (б) теменной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. x200. Шкала 50 мкм С. 103
- 44 Рисунок 44 – NSE-позитивные нейроны (стрелки) слоя III теменной коры головного мозга человека, зона ишемической полутени с преобладанием деструктивно измененных пикноморфных нейронов, основная группа, Иммунофлуоресценция. Ув. X400. Шкала 50 мкм С. 106
- 45 Рисунок 45 – p-38-позитивные структуры нейропиля (стрелки), слой III теменной коры головного мозга человека, группа

- сравнения. Иммунофлуоресценция. Ув. х400. Шкала 50 мкм С. 107
- 46 Рисунок 46 – р38-позитивные нейроны (стрелки), слой III височной коры головного мозга человека, группа сравнения. Иммунофлуоресценция. Ув. х400. Шкала 50 мкм С. 108
- 47 Рисунок 47 – р38-позитивные структуры (стрелки) слоя III лобной коры головного мозга человека, группа контроля. Иммунофлуоресценция. Ув. х400. Шкала 50 мкм С. 108
- 48 Рисунок 48 – р-38-позитивные структуры нейропиля (стрелки), слой III теменной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. х400. Шкала 50 мкм С. 109
- 49 Рисунок 49 – позитивные структуры (стрелки), слой III затылочной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. х200. Шкала 50 мкм С. 110
- 50 Рисунок 50 – р38-позитивные нейроны (стрелки), слой V теменной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. х400. Шкала 50 мкм С. 110
- 51 Рисунок 51 – Маска 8-битового изображения слоя III лобной коры головного мозга распределения р38 С. 111
- 52 Рисунок 52 – Синаптофизин-позитивные структуры нейропиля (стрелки), слой III лобной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. х400. Шкала 50 мкм С. 114
- 53 Рисунок 53 – Кальбиндин-позитивные непиримидные нейроны (стрелки), слой III лобной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. х400. Шкала 50 мкм С. 115
- 54 Рисунок 54 – Кальбиндин-позитивные пирамидные и непиримидные нейроны (стрелки), слои II–III (а) и слой V (б) лобной коры головного мозга человека, основная группа.

- Иммунофлуоресценция. Ув. х400. Шкала 50 мкм С. 117
- 55 Рисунок 55 – Кальбиндин-позитивные нейроны, слои II–III (а) и слой V (б) теменной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Стрелка – глиоморфные нейроны с видимыми отростками и интенсивным свечением маркера. Ув. х400. Шкала 50 мкм..... С. 118
- 56 Рисунок 56 – Кальбиндин-позитивные нейроны, слой IIIc теменной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Стрелка – крупные непиримидные нейроны с высоким содержанием кальбиндина. Ув. х400. Шкала 50 мкм..... С. 119
- 57 Рисунок 57 – NPY-позитивные нейроны (стрелка), слой III лобной (а), теменной (б), височной (в) и затылочной (г) коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. х400. Шкала 50 мкм С. 121
- 58 Рисунок 58 – NPY-позитивный нейрон, слой III лобной коры головного мозга человека, основная группа. Распределение меток в теле и отростках, нейропиле. Иммунофлуоресценция. Ув. х400. Шкала 50 мкм С. 122
- 59 Рисунок 59 – Иммунофлюоресцентная маркировка NPY в теле и отростках нейронов, зрительная кора головного мозга человека, группа сравнения, слой III: а – NPY-иммунопозитивный тормозной интернейрон и окружающий нейропил, б – фрагмент нейропиля с NPY-иммунореактивными отростками продольной (стрелка) и поперечной ориентации, отчетливо видны очень тонкие отростки с непрерывным содержанием метки. Ув. х200. Шкала – 20 мкм..... С. 123
- 60 Рисунок 60 – Маски (бинарное изображение, 393216 пикселей)

- реального поля зрения (17500 мкм^2) при иммунофлюоресцентной маркировке NPY, зрительная кора головного мозга человека, группа сравнения, слой III. В плоскости среза выявляются фрагменты тел и отростков нейронов: а – NPY-иммунопозитивный интернейрон и окружающий нейропиль, всего 426 частиц различной формы площадью от 5 до 1296 пикселей, общая площадь всех частиц составляет 3,2 % поля зрения; б – фрагмент нейропиля с NPY-иммунореактивными отростками продольной и поперечной ориентации, всего 546 частиц площадью от 5 до 314 пикселей, общая площадь – 2,8 % поля зрения. Шкала – 20 мкм С. 125
- 61 Рисунок 61 – Маска (бинарное изображение, 393216 пикселей) реального поля зрения (17500 мкм^2) при иммунофлюоресцентной маркировке NPY, зрительная кора головного мозга человека, группа сравнения, слой III. Выявляются только поперечные срезы отростков нейронов. Всего 234 частиц площадью от 5 до 33 пикселей (диаметр 0,5–1,4 мкм), общая площадь – 0,6 % поля зрения. Шкала - 20 мкм..... С. 126
- 62 Рисунок 62 – Типичный NPY-иммунопозитивный тормозной нейрон: пять уровней дихотомического деления дендритного дерева (отмечено стрелками), отличающихся диаметром дендритов. Продольный срез, инвертированное изображение, зрительная кора головного мозга человека, слой III, группа сравнения. Ув. x400. Шкала – 25 мкм С. 127
- 63 Рисунок 63 – Иммунофлюоресцентная маркировка NPY в отростках (стрелки) тормозных интернейронов, зрительная кора головного мозга человека, основная группа, слой III. Фрагментация NPY-иммунопозитивного материала,

- варикозные изменения отростков. Ув. x200. Шкала – 20 мкм ... С. 129
- 64 Рисунок 64 – Влияние хронической ишемии на общую численную плотность лобной (париетальный тип), теменной (фронтальный тип), височной (фронтальный тип), затылочной (париетальный тип) коры головного мозга человека. Сравнение с нормой (группа сравнения, биопсия) С. 139
- 65 Рисунок 65 – Влияние хронической ишемии на относительное содержание (%) реактивно и деструктивно измененных (пикноморфные) нейронов коры головного мозга человека С. 140
- 66 Рисунок 66 – Влияние хронической ишемии на экспрессию NSE (относительная площадь флюоресцирующей метки в поле зрения, %) в сохранившихся нейронах коры головного мозга человека: а – лобная, б – височная кора С. 141
- 67 Рисунок 67 – Влияние хронической ишемии на экспрессию кальбиндина (относительная площадь флюоресцирующей метки в поле зрения, %) в сохранившихся нейронах коры головного мозга человека: а – лобная кора, б – теменная кора ... С. 143
- 68 Рисунок 68 – Влияние хронической ишемии на содержание синаптофизина (относительная площадь флюоресцирующей метки в поле зрения, %) в нейропиле и на some сохранившихся нейронов лобной коры головного мозга человека. В теменной, височной и затылочной коре головного мозга выявлялись аналогичные изменения С. 144
- 69 Рисунок 69 – Влияние хронической ишемии на содержание (относительная площадь флюоресцирующей метки в поле зрения, %) NPY-позитивных структур (отростки, тела) в слое III различных долей коры головного мозга человека С. 145
- 70 Рисунок 70 – Схема адаптивно-компенсаторной реорганизации нейронов и нейронных сетей коры головного мозга человека

	при хронической ишемии	С. 148
71	Таблица 1 – Методы морфологического исследования.....	С. 33
72	Таблица 2 – Ширина различных слоев коры головного мозга человека в норме (аутопсийный материал, окраска гематоксилин-эозином), <i>Me (Ql-Qh)</i>	С. 45
73	Таблица 3 – Численная плотность нейронов (на 1 мм ²) различных отделов и слоев коры головного мозга человека группа контроля (аутопсийный материал, окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), <i>Me (Ql-Qh)</i> ...	С. 56
74	Таблица 4 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм ²) в коре головного мозга человека, группа сравнения (интраоперационный материал, окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), <i>Me (Ql-Qh)</i>	С. 63
75	Таблица 5 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм ²) в лобной коре головного мозга человека контрольной группы и группы сравнения (окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), <i>Me (Ql-Qh)</i>	С. 64
76	Таблица 6 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм ²) в теменной коре головного мозга человека контрольной группы и группы сравнения (окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), <i>Me (Ql-Qh)</i>	С. 64
77	Таблица 7 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм ²) в височной коре головного мозга человека контрольной группы и группы сравнения (окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), <i>Me (Ql-Qh)</i>	С. 65
78	Таблица 8 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм ²) в затылочной коре головного мозга человека контрольной группы и группы сравнения (окраска гематоксилин-эозином и тионином по Нисслю), <i>Me (Ql-Qh)</i>	С. 65

- 79 Таблица 9 – Относительная площадь нейропиля, клеток и межклеточного пространства в поле зрения ($n = 120$) височной коры головного мозга человека основной группы и группы сравнения, окраска гематоксилин-эозином С. 84
- 80 Таблица 10 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм^2) различных слоев ЛКГМ человека (биопсийный материал), *Me (Ql-Qh)* С. 91
- 81 Таблица 11 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм^2) различных слоев ТКГМ человека (биопсийный материал), *Me (Ql-Qh)*..... С. 91
- 82 Таблица 12 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм^2) различных слоев ВКГМ человека (биопсийный материал), *Me (Ql-Qh)*..... С. 92
- 83 Таблица 13 – Общая численная плотность нейронов (на 1 мм^2) различных слоев ЗКГМ человека (биопсийный материал), *Me (Ql-Qh)*..... С. 92
- 84 Таблица 14 – Относительное содержание (% в пересчете на 1000 верифицированных нейронов, 50 полей зрения) реактивно измененных нейронов коры головного мозга человека (биопсийный материал) С. 94
- 85 Таблица 15 – Относительное содержание (% в пересчете на 500 верифицированных нейронов, 50 полей зрения) гиперхромных нейронов в различных слоях коры головного мозга человека основной группы С. 94
- 86 Таблица 16 – Площадь NSE-позитивного материала в поле зрения лобной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, *Me (Ql; Qh)* С. 104
- 87 Таблица 17 – Площадь NSE-позитивного материала в поле зрения теменной коры головного мозга человека в основной

	группе и группе сравнения, $Me (Ql; Qh)$	С. 104
88	Таблица 18 – Площадь NSE-позитивного материала в поле зрения височной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, $Me (Ql; Qh)$	С. 105
89	Таблица 19 – Площадь р38-позитивного материала в поле зрения лобной коры головного мозга человека, $Me (Ql; Qh)$	С. 112
90	Таблица 20 – Площадь р38-позитивного материала в поле зрения теменной коры головного мозга человека, $Me (Ql; Qh)$...	С. 113
91	Таблица 21 – Площадь р38-позитивного материала в поле зрения височной коры головного мозга человека, $Me (Ql; Qh)$..	С. 113
92	Таблица 22 – Площадь р38-позитивного материала в поле зрения затылочной коры головного мозга человека, $Me (Ql; Qh)$	С. 113
93	Таблица 23 – Численная плотность кальбиндин-содержащих интернейронов и относительная площадь их тел в поле зрения лобной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, $Me (Ql; Qh)$	С. 120
94	Таблица 24 – Численная плотность кальбиндин-содержащих интернейронов и относительная площадь их тел в поле зрения теменной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, $Me (Ql; Qh)$	С. 120
95	Таблица 25 – Основные морфометрические характеристики масок NPY-иммунопозитивных структур слоя III различных долей коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения, программа ImageJ 1.46	С. 130
96	Таблица 26 – Распределение по диаметру поперечных срезов отростков NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов слоя III лобной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения	С. 133
97	Таблица 27 – Распределение по диаметру поперечных срезов	

	отростков NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов слоя III теменной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения	C. 133
98	Таблица 28 – Распределение по диаметру поперечных срезов отростков NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов слоя III височной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения	C. 134
99	Таблица 29 – Распределение (%) по диаметру (мкм) поперечных срезов отростков NPY-иммунопозитивных тормозных интернейронов слоя III затылочной коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения	C. 134
100	Таблица 30 – Множественное сравнение распределения (%) по диаметру (мкм) поперечных срезов отростков NPY- иммунопозитивных тормозных интернейронов слоя III всех отделов коры головного мозга человека в основной группе и группе сравнения	C. 135