

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

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2014

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

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Акулинин Виктор Александрович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор **Логвинов Сергей Валентинович**  
(Сибирский государственный медицинский университет, декан лечебного факультета, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии)

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

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Барнаул)

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.05 на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52, тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52; <http://www.ngmu.ru/dissertation/349>)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

А. В. Волков

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Актуальность сравнительного исследования возбуждающих и тормозных нейронов различных долей коры головного мозга (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 (Семченко В. В., Алексеева Г. В., 1999; Семченко В. В. и др., 2012; Семченко В. В., Степанов С. С., Боголепов Н. Н., 2014; Fiala J. C., 2005; Manto M., Oulad ben Taib N., Luftet A. R., 2006; Baron J. C. et al., 2014).

В современных исследованиях широко используются методы иммуногистохимической идентификации специфических белков нервной ткани, что в совокупности с морфометрическими методами (Мыщик А. В., 2012; Мыщик А. В. и др., 2012; Ferreira T. A., Rasband W., 2010) существенно углубляет наши представления о структурно-функциональной организации возбуждающих и тормозных систем коры головного мозга человека (Maekawa S., Al-Sarraj S., Kibble M., 2004; De Almeida J., Mengod G., 2007; Buritica E. et al., 2009).

Описаны форма и размеры тела, характер разветвления и длина отростков различных типов тормозных интернейронов (Охотин В. Е., Калиниченко С. Г., 2001; Калиниченко С. Г. и др., 2006; Druga R., 2009). Установлено, что тормозные интернейроны, экспрессирующие кальбиндин, превалируют в супрагранулярных слоях II и III. 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 (Druga R., 2009; Jovanović A.A. et al., 2013).

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.

Доказано влияние активации глиальных клеток, компенсаторной экспрессии кальбиндина и нейропептида Y (NPY) в тормозных интернейронах на механизмы эксайтотоксического повреждения возбуждающих пирамидных глутаматергических нейронов при ишемии (Buritica E. et al., 2009; Druga R., 2009; Duszczyk M., Ziembowicz A., Gadamski R., 2009; Desgent S., Boire D., Ptito M., 2010; Jovanović A. A. et al., 2013). Однако сравнительного изучения структурно-функционального состояния пирамидных и непиримидных нейронов разных долей и слоев коры головного мозга человека при хронической ишемии ранее не проводилось.

**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 сравниваемых 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.** 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 непирамидные тормозные нейроны, имеют повышенную, в сравнении с контролем, экспрессию белка, регулирующего кальциевый обмен – кальбиндин, что снижает риск эксайтотоксического повреждения нейронов.

С помощью морфометрических и иммуногистохимических методов изучения биопсийного материала впервые 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 p38-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.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на 41-й ежегодной конференции Neuroscience (Вашингтон, округ Колумбия, США, 2011), на 43-й ежегодной конференции Neuroscience (Сан Диего, Калифорния, США, 2013), на Объединенном 12-м конгрессе международной ассоциации морфологов и 7-м Всероссийском научном медицинском обществе анатомов, гистологов и эмбриологов (Тюмень, 2014).

**Внедрение.** Основные научные данные, теоретические положения, разработанные на их основе, практические рекомендации настоящего исследования внедрены в процесс преподавания на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии; кафедре неврологии и нейрохирургии; кафедре анатомии человека и кафедре судебной медицины с курсом правоведения Омской государственной медицинской академии при изучении вопросов морфологии и функционирования нервной ткани, органов центральной нервной системы человека в условиях нормы и при диффузно-очаговых ишемических повреждениях.

**Публикации.** 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.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Омской государственной медицинской академии (протокол № 61 от 19.06.2014).

Контролем служил мозг погибших в результате несчастных случаев ( $n = 5$ ). Аутопсийный материал забирали спустя 5–10 часов после смерти из соответствующих интраоперационному материалу полей лобной, теменной, височной и затылочной долей коры головного мозга. С каждого поля брали по пять фрагментов коры размером  $(5 \times 5 \times 5)$  мм, содержащих все слои КГМ (всего – 250). Интраоперационный материал получен в ходе операции по удалению опухолей головного мозга ( $n = 53$ , возраст пациентов 23–42 года). В силу глубокого расположения опухолей в удаляемый материал попадали как участки КГМ из перифокальной зоны (хроническая ишемия), так и частично неповрежденная кора. Сразу после изъятия материал фиксировали в 4 % растворе формалина, готовили блоки ткани размером  $(5 \times 5 \times 3)$  мм, 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. После лечения все пациенты были выписаны из стационара в удовлетворительном состоянии.

**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  $+4^{\circ}\text{C}$ . Через сутки раствор полностью заменялся.

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 Ниссю.

С помощью микроскопа Leica DM 1000 делались цифровые микрофотографии размером изображения  $2048 \times 1536$  пикселей всех слоёв КГМ на различных увеличениях.

На полученных микрофотографиях проводили общую и морфометрическую оценку структурно-функционального состояния основных типов пирамидных и непирамидных нейронов на уровне всех слоев КГМ.

**Иммуногистохимические методы.** Для иммуногистохимического исследования использовались стандартные антитела к NSE, GFAP-глия, синаптофизин (p38)-синапсы. 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 ммоль 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.

Использовались первичные кроличьи поликлональные антитела (ImG): к нейронспецифической енолазе NSE; к синаптофизину p-38 и к глиальному фибриллярному белку GFAP. Для иммунофлуоресцентного исследования тормозных интернейронов применяли первичные кроличьи поликлональные антитела: к кальбиндину D<sub>28k</sub> и нейропептиду Y.

Антитела к синаптофизину, GFAP, кальбиндину и нейропептиду Y 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  $\times 40$ , апертура 0,9, делались цифровые микрофотографии размером изображения  $1300 \times 1030$  пикселей, реальным размером  $220 \times 174$  мкм ( $38280 \text{ мкм}^2$ ).

Морфометрическое изучение изображений проводили с помощью программы ImageJ 1.46. На иммуногистохимических препаратах определяли площадь ( $\text{мкм}^2$ ) и количество флуоресцирующих гранул маркера в поле зрения ( $38280 \text{ мкм}^2$ ) препарата.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Для решения поставленных задач в настоящей работе было сформировано три группы. Контрольная группа (аутопсийный материал) – кора мозга человека, полученная от умерших. Группа сравнения – участки коры на отдалении от патологического очага, по своей структуре и характеристикам относящаяся к норме (интраоперационный материал). 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).

При гистологическом исследовании аутопсийного материала (группа контроля) нейроны были структурно изменены – гиперхромия цитоплазмы,

перичеселлюлярный отек, изменение ядерно-цитоплазматического отношения. Найденные структурные изменения нейронов 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 ОЧПН и белкового иммуногистохимического профиля (Lusk L. et al., 2008).

В отличие от аутопсийного материала в КГМ группы сравнения 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. Отсутствовали сморщенные (пикноморфные) нейроны, как и структурные признаки нарушения микроциркуляции (сладжи клеток, периваскулярный отек, набухание эндотелиоцитов).

Затем производилось сравнение ОЧПН на аутопсийном (группа контроля) и биопсийном (группа сравнения) материале. Это было необходимо для того, чтобы в последующем подтвердить высокую сохранность нейронов в группе сравнения биопсийного материала и охарактеризовать эту группу, как ткань КГМ без ишемических изменений. В ходе морфометрического исследования удалось показать, что ОЧПН КГМ группы сравнения была сопоставима с контрольной группой.

На основании вышеизложенного сделан вывод, что в участках КГМ, взятых нами в ходе операции (группа сравнения), не происходило гибели нейронов. 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.

Анализ полученных данных настоящего 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 1). В большей степени страдали пирамидные нейроны слоя II и V, в меньшей – слоя III.

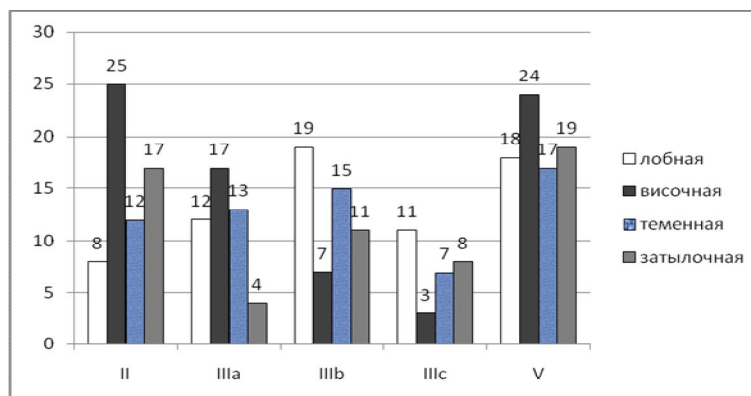


Рисунок 1 – Влияние хронической ишемии на общую численную плотность лобной, теменной, височной, затылочной коры головного мозга человека (%).

Сравнение с нормой (группа сравнения, биопсия).

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

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). Именно в этих слоях отмечалось максимальное количество тормозных интернейронов, содержащих кальбиндин.

Таким образом, по данным гистологического морфометрического изучения нейронов КГМ основной группы, установлено, что в зоне

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.

Таблица – Относительное содержание гиперхромных нейронов в различных слоях коры головного мозга человека основной группы

| Слой                                                                                                                                          | 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)                                 |
| 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);<br>$\chi^2 = 0,3, p = 0,6$   | 44,4 (40–48,9);<br>$\chi^2 = 4,0, p = 0,046^*$   |
| V                                                                                                                                             | 24,6 (20,9–28,6);<br>$\chi^2 = 1,5, p = 0,3$ | 52,9 (48,4–57,3);<br>$\chi^2 = 8,0, p = 0,005^*$ |
| VI                                                                                                                                            | 12,3 (9,6–15,5);<br>$\chi^2 = 0,0, p = 0,9$  | 32,8 (28,7–37,1);<br>$\chi^2 = 0,7, p = 0,4$     |
| Примечания:                                                                                                                                   |                                              |                                                  |
| 1.* – различия статистически значимы в сравнении со средним показателем верхнего этажа КГМ (слои II–III) при $p < 0,05$ (критерий $\chi^2$ ). |                                              |                                                  |
| 2. ^ – различия статистически значимы в сравнении со слоем II при $p = 0,01$ (критерий $\chi^2$ ).                                            |                                              |                                                  |

В ходе иммуногистохимического исследования на серийных срезах изучали NSE-, кальбиндин- и NPY-позитивные нейроны, а также распределение на телах пирамидных нейронов и в нейропиле височной КГМ р38-позитивного материала (синаптические терминалы) (рисунок 2). Клетки нейроглии в КГМ изучались с помощью иммуногистохимической реакции на GFAP.

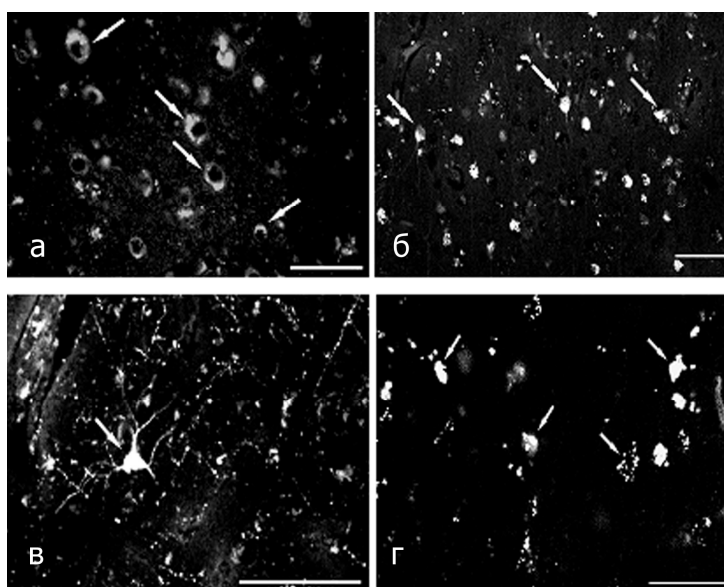


Рисунок 2 – Иммуногистохимическое исследование височной КГМ, основная группа: а – NSE-позитивные нейроны (стрелки); б – кальбиндин-позитивные нейроны; в – NPY-позитивный нейрон; г – p38-позитивные нейроны.

Иммунофлуоресценция. ув. x400. Шкала 50 мкм

Иммуногистохимическое исследование показало, что сохранившиеся в зоне хронической ишемии нормохромные нейроны содержали больше NSE, чем в норме (рисунок 3).

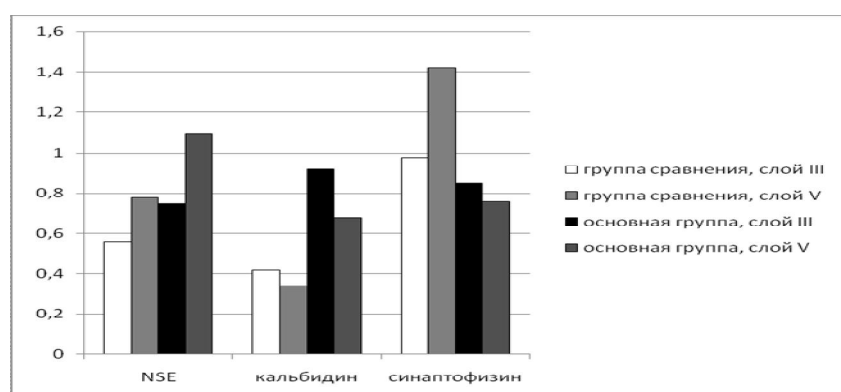


Рисунок 3 – Влияние хронической ишемии на экспрессию NSE, кальбиндина и синаптофизина (относительная площадь флюоресцирующей метки в поле зрения, %) в сохранившихся нейронах лобной доли неокортекса

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 непирамидных нейронах. Мы рассматривали это как компенсаторную реакцию на дефицит ОЧПН.

Иммуноцитохимическая реакция на NSE является хорошим индикатором активности всех типов нейронов в неокортексе. Усиление метаболической активности нейронов сопровождается увеличением количества этого белка в их цитоплазме (Yardimoğlu M. et al., 2008). При хронической ишемии также увеличивалась экспрессия кальбиндина, белка, регулирующего кальциевый обмен клетки. В большей степени это было характерно для слоя III (рисунок 3).

По содержанию кальбиндина в нейронах можно судит о степени их защищенности при ишемии (Druga R., 2009; Maekawa S. et al., 2004). Поэтому, вполне вероятно, что выявленное нами высокое содержание кальбиндина в крупных пирамидных нейронах слоя V обеспечивало сохранность этих нейронов при хронической ишемии. При хронической ишемии гибель нейронов и активация сохранившихся клеток сопровождались снижением относительного содержания синаптофизина в нейропиле и на телах нейронов КГМ (рисунок 4).

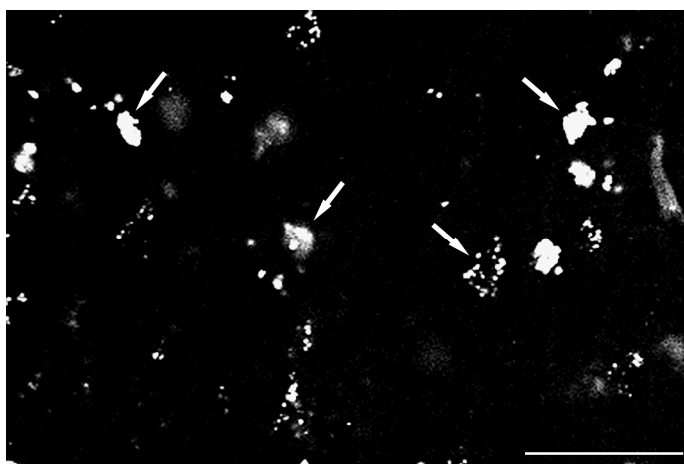


Рисунок 4 – P-38-позитивные структуры (стрелки), слой III лобной коры головного мозга человека, основная группа. Иммунофлуоресценция. Ув. x400.

Шкала 50 мкм

Изменялась мозаика флуоресцирующих гранул на поверхности тел нейронов – увеличивалась доля аксосоматических тормозных синапсов (см. рисунок 4). 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.

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 5). При этом общая численная плотность NPY-позитивных интернейронов от нормы не отличалась (1–2 % от всех типов нейронов).

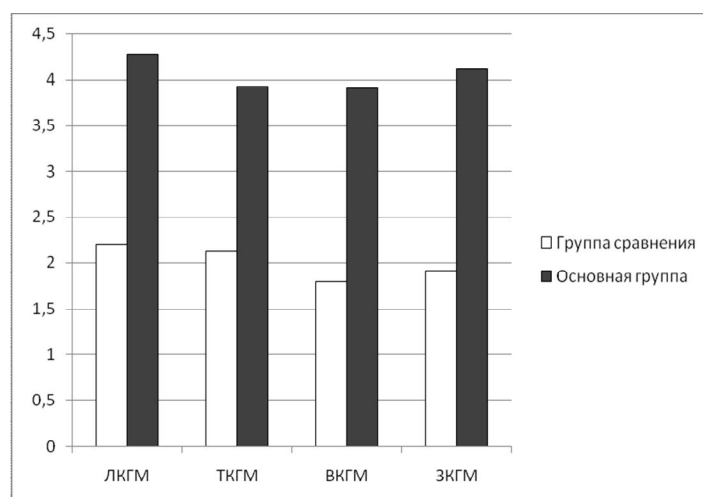


Рисунок 5 – Влияние хронической ишемии на содержание (относительная площадь флуоресцирующей метки в поле зрения, %) NPY-позитивных структур (отростки, тела) в слое III различных долей коры головного мозга человека

Сохранность интернейронов при ишемии рассматривается как результат компенсаторной экспрессии кальбиндина и NPY (Buritica E. et al., 2009; Druga R., 2009; Duszczuk M. et al., 2009; Desgent S. et al., 2010). По данным морфометрического исследования GFAP-позитивных клеток КГМ (рисунок 6),

установлено, что в зоне ишемической полутени площадь 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.

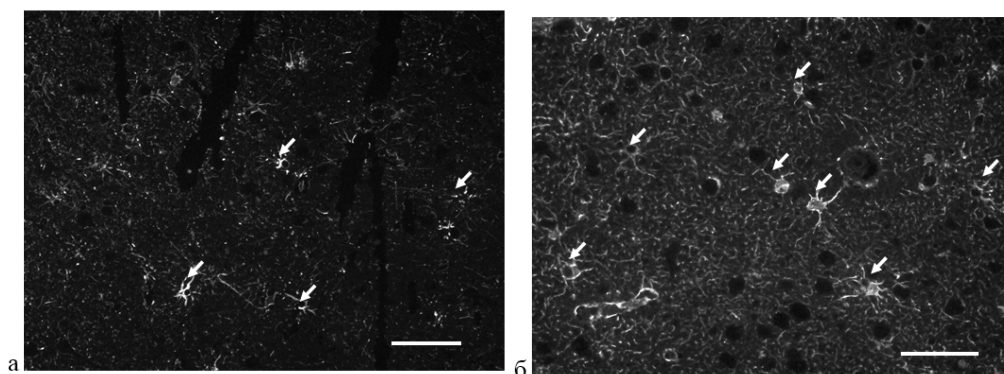


Рисунок 6 – Глиальные клетки (стрелки) коры головного мозга человека группы сравнения (а) и основной группы (б). Увеличение плотности клеточных тел и отростков при хронической ишемии вокруг нейронов (пустые темные пятна). Иммуногистохимическое окрашивание GFP (маркер глиоцитов).

Ув.  $\times 200$ , шкала 50 мкм

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

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 7).

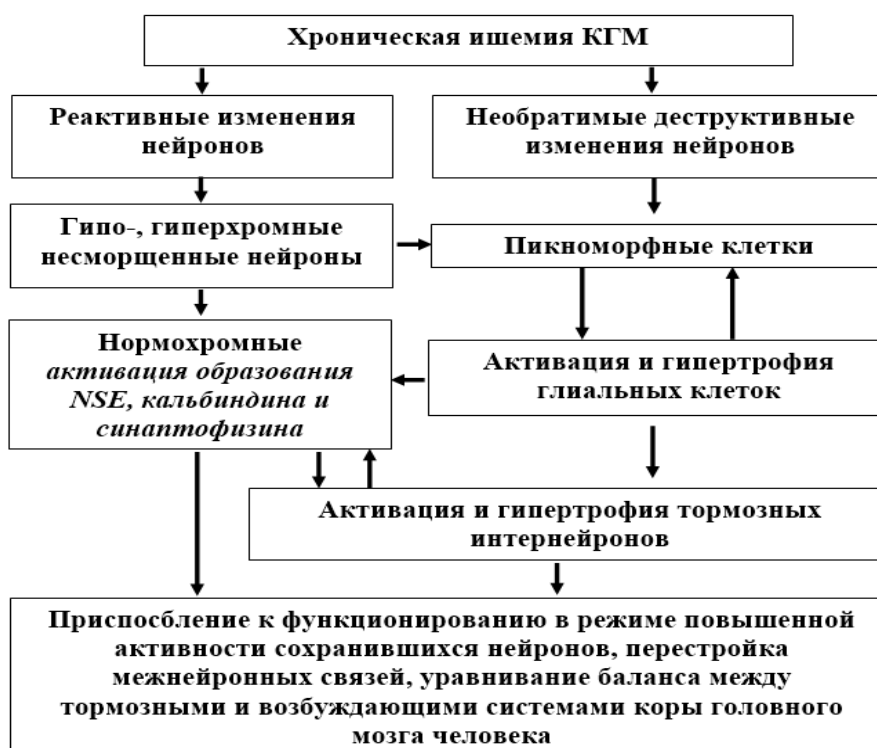


Рисунок 7 – Схема адаптивно-компенсаторной реорганизации нейронов и нейронных сетей коры головного мозга человека при хронической ишемии

В основе этой гипотезы лежат следующие основные положения, доказанные в работе.

1. В зоне длительных хронических нарушений микроциркуляции активируются механизмы естественной защиты нейронных сетей от эксайтотоксического повреждения.

2. Защита всех нейронов осуществляется путем увеличения синтеза кальбиндина, белка, регулирующего кальциевый обмен.

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

4. 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.

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

6. Баланс нейротоксического (активация возбуждающих нейронов) и цитопротективного эффектов (экспрессия кальбиндина, активация тормозных интернейронов и глиальных клеток) определяет избирательную устойчивость отдельных типов нейронов КГМ к повреждающим факторам хронической ишемии.

7. Процесс компенсации при хронической ишемии приводит к реорганизации межнейронных связей, 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 1,5–2,0 раза по сравнению с нормой. Компенсаторное усиление экспрессии NSE характерно для пирамидных и непиримидных 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 непиримидных 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 нейропилы, 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Иммунофлуоресцентная верификация и морфометрия аксосоматических синапсов неокортекса человека при острой и хронической ишемии / А. В. Мыщик, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, **А. В. Сергеев**, П. М. Ларионов // **Морфологические ведомости**. – 2012. – № 3. – С. 53–60.

2. Иммуногистохимическая и морфометрическая характеристика NPY-позитивных нейронов в различных полях мозга человека при хронической ишемии / **А. В. Сергеев**, С. С. Степанов, В. А. Акулинин, А. В. Мыщик // **Вестник новых медицинских технологий**. – 2013. – Т. 20, № 4. – С. 103–108.

3. Тинкториальные свойства нервной ткани неокортекса человека в зоне ишемической полутени (интраоперационный материал) / **А. В. Сергеев**, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, А. В. Мыщик, В. С. Разумовский // **Сибирский медицинский журнал**. – 2014. – Т. 126, № 5. – С. 35–39.

4. Современные проблемы морфологического изучения цитоархитектоники коры большого мозга человека в норме и при ишемии / **А. В. Сергеев**, А. В. Мыщик, В. А. Акулинин, С. С. Степанов // **Вестник новых медицинских технологий (электронный журнал)**. – 2014 (03.06.). – Т8, № 1. – 9 с. – Режим доступа: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4744.pdf>

5. Морфофункциональная характеристика возбуждающих и тормозных нейронов лобной коры большого мозга человека при хронической ишемии / **А. В. Сергеев**, А. В. Мыщик, В. А. Акулинин, С. С. Степанов // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2013. – Т. 2, № 3. – С. 37–45.

6. Проблемы сравнительного изучения структурно-функционального состояния нейронов в аутопсийном и биопсийном материале неокортекса человека / **А. В. Сергеев**, С. С. Степанов, В. А. Акулинин, А. В. Мыщик, В. С. Разумовский, П. В. Беличенко // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2014. – Т. 3, № 2. – С. 36–46.

7. Возбуждающие и тормозные нейроны коры большого мозга человека при хронической ишемии / **А. В. Сергеев**, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, А. В. Мыщик // Объединенный 12-й конгресс международной ассоциации морфологов и 7-й съезд Всероссийского научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов, 28–31 мая 2014 г., Тюмень // Морфология. – 2014. – № 3. – С.173.

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

Исследование интернейронов неокортекса человека у пациентов, выживших после острого инфаркта миокарда и контроль / В.А. Акулинин, **А. В. Сергеев**, А.В. Мыщик, С.С. Степанов, П.В. Беличенко // Neuroscience : материалы 41-го Ежегодного съезда, 12-16 ноября 2011, Вашингтон, округ Колумбия, США. – Y8 292,18. – Вс.

9. Immunohistochemical and morphometric characterization of neuronal networks in the frontal cortex of the human brain in acute and chronic ischemia / V.A. Akulinin, A.V. Mytsik, S.S. Stepanov, **A.V. Sergeev**, P.V. Belichenko // 43 Annual meeting, NEUROSCIENCE. 9-13 November. – 2013. San Diego. California. USA. D31 705.06-We.

Иммуногистохимическая и морфометрическая характеристика нейронных сетей в лобной коре головного мозга человека при острой и хронической ишемии / В.А. Акулинин, А.В. Мыщик, С.С. Степанов, **А. В. Сергеев**, П.В. Беличенко // Neuroscience : материалы 43-го Ежегодного съезда, 9-13 ноября 2013 года, Сан-Диего, Калифорния, США. – D31 705,06- Ср.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|      |                                     |
|------|-------------------------------------|
| КГМ  | кора головного мозга                |
| ОЧП  | общая численная плотность           |
| NPY  | нейропептид Y                       |
| NSE  | нейрон-специфическая енолаза        |
| p38  | синаптофизин                        |
| GFAP | глиальный фибриллярный кислый белок |