

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616.831-005.4

Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов С.С.

Структурно-функциональные изменения нейронов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, 644099, г. Омск, Россия, ул. Ленина, д. 12

Цель исследования — изучение структурно-функциональных изменений нейронов сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в норме и после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. **Методика.** С помощью световой (окраска гематоксилином и эозином, по Нисслю), флуоресцентной (окраска DAPI), иммунофлуоресцентной (нейрон-специфическая енолаза — NSE) и электронной микроскопии была изучена нейроцитоархитектоника сенсомоторной коры (СМК) головного мозга белых крыс в норме ($n=5$) и в динамике — 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут.; после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий ($n=30$). Согласно рекомендациям Nomenclature Committee on Cell Death (2009), проведено детальное описание и сравнение всех морфотипов измененных пирамидных нейронов СМК мозга белых крыс после острой ишемии. Морфометрический анализ проведен с помощью программы ImageJ 1.46. **Результаты.** Использование комплекса морфологических методов позволило классифицировать нейроны на основании четких структурных маркеров и доказать возможность апоптоза гиперхромных нейронов СМК после воспроизведения ишемии. Показано, что через 3 сут. в слое III 6—12% гиперхромных нейронов подверглось апоптозу, 13,4—24,6% — коагуляционному некрозу, а остальные выходили из патологического состояния в отдаленном восстановительном периоде. Необратимо измененные клетки-тени составляли 11,5% (95% ДИ: 7,4—16,8%). Общая численная плотность пирамидных нейронов в течение 30 сут. постишемического периода в слое III СМК снижалась на 30,5% (95% ДИ: 24,2—38,7%), а в слое V — на 14,4% (95% ДИ: 9,9—20,0%). **Заключение.** Показана смешанная природа гибели нейронов — одновременное сочетание процессов некроза и апоптоза (парапоптоз). Однако основную роль в гибели нейронов играли процессы быстрого и отдаленного ишемического некроза.

Ключевые слова: острая ишемия; белая крыса; неокортекс; нейроны; световая, флуоресцентная, электронная микроскопия; морфометрия; некроз; апоптоз.

Для цитирования: Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов С.С. Структурно-функциональные изменения нейронов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 30—38.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.30-38

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru

Поступила 27.09.2017

Stepanov A.S., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Stepanov S.S.

Structural and functional changes in neocortical neurons of white rats following a 20-minute occlusion of common carotid arteries

Omsk State Medical University; Lenina Str. 12, Omsk 644099, Russia

Aim. To study sensorimotor cortical neurons of white rats in the control conditions and after a 20-minute occlusion of common carotid arteries. **Methods.** Neuronal cytoarchitectonics of rat sensorimotor cortex (SMC) was studied in the control conditions ($n=5$) and at 1, 3, 7, 14, 21, and 30 days ($n=30$) following a 20-minute occlusion of common carotid arteries using light (hematoxylin and eosin; Nissl staining), fluorescent (DAPI staining), immunofluorescence (neuron-specific enolase, NSE), and electron microscopy. All morphotypes of modified pyramidal neurons were described in detail for the SMC of albino rats after acute ischemia according to recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death (2009). The morphometric analysis was performed using the ImageJ 1.46 software. **Results.** Using a set of morphometric methods allowed to classify neurons and demonstrate a possibility of apoptosis in a part of SMC hyperchromic neurons exposed to ischemia based on the presence of clear structural markers (decay of nuclei and cells; phagocytosis). For example, in layer III at 3 days, 6—12% of hyperchromic neurons underwent apoptosis, 13.4—24.6% — coagulation necrosis, and

the remaining neurons came out of the pathological condition during a remote rehabilitation period. The proportion of irreversibly changed shadow cell was 11.5% (95% CI: 7.4—16.8%). During 30 days of the postischemic period, the numerical density of pyramidal neurons reduced by 30.5% (95% CI: 24.2—38.7%) in SMC layer III and by 14.4% (95% CI: 9.9—20.0%) in SMC layer V. **Conclusion.** The study demonstrated a mixed nature of neuronal death, a simultaneous combination of necrosis and apoptosis (parapoptosis). However, processes of immediate and remote ischemic necrosis played the major role in neuronal death.

Keywords: acute ischemia; white rat; neocortex; neurons, light microscopy; fluorescent microscopy; electron microscopy; morphometry; necrosis; apoptosis.

For citation: Stepanov A.S., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Stepanov S.S. Structural and functional changes in the neurons of the neocortex of white rats after a 20-minute occlusion of the common carotid arteries. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 30—38. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.30-38

For correspondence: Akulinin Viktor Aleksandrovich, Doctor of Medical Science, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology FSBEI HE «Omsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 12, ul. Lenina, Omsk, 644099, Russian Federation, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Stepanov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-8392-9514>

Avdeev D.B., <https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>

Akulinin V.A., <https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

Stepanov S.S., <https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>

Received 27.09.2017

Введение

Необратимые изменения нейронных сетей коры головного мозга (КГМ) после острой ишемии являются причиной многих неврологических нарушений, которые по своему медико-социальному значению остаются одной из актуальных проблем современной медицины [1 — 3]. Особое значение при этом уделяется заболеваниям, связанным с повреждением магистральных артерий головного мозга [4]. В связи с этим представляет интерес изучение структурно-функционального состояния нейронов КГМ после острой дозированной по времени ишемии, вызванной окклюзией общих сонных артерий в эксперименте.

Именуются исследования, в которых изучалось структурно-функциональное состояние нервных структур КГМ на различных экспериментальных моделях локальной, тотальной транзиторной, полной и неполной ишемии головного мозга [1, 5—7], а также у человека на аутопсийном и биопсийном материале [8—11].

В этих работах охарактеризованы основные реакции нейронов на ишемию и реперфузию. Гибель нейронов происходит путем некроза (острого, отсроченного, отдаленного) и апоптоза [12, 13], а также сочетания обоих процессов — парапоза [14, 15]. Есть работы, посвященные изучению коры головного мозга белых крыс после окклюзии общих сонных артерий [1, 16]. Однако структурные механизмы реорганиза-

ции нервной ткани неокортекса в период реперфузии во многом остаются неясными [12, 15, 17].

Особое значение для понимания механизмов повреждения и структурно-функционального восстановления высших отделов головного мозга млекопитающих при ишемии и реперфузии имеет изучение ультраструктуры различных поврежденных нейронов, так как это позволяет понять механизм гибели конкретной клетки (некроз или апоптоз) [15]. Флуоресцентные (окраска DAPI), иммунофлуоресцентные (NSE) методы дают дополнительную информацию о пространственном распределении ДНК в ядре и степени ее конденсации, используется для выявления различных этапов постишемической некротической и апоптозной трансформации ядра [18, 19].

Цель исследования — изучение с помощью световой, флуоресцентной (окраска DAPI), иммунофлуоресцентной (NSE) и электронной микроскопии морфофункционального состояния нейронов сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в норме и в динамике после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Методика

Исследования проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77

№ 755) и с рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей» и одобрена этическим комитетом ГБОУ ВПО Омского государственного медицинского университета.

Эксперименты выполнены на самцах белых беспородных крыс массой 180—200 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария.

Моделирование острой ишемии мозга проводили путем 20-минутной окклюзии общих сонных артерий (сосудистая модель неполной глобальной ишемии без гипотонии) на фоне премедикации (сульфат атропина 0,1 мг/кг, подкожно) и общей анестезии (Zoletil 100, 10 мг/кг). Материал для морфологического исследования нейронов брали через 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут. после окклюзии по 5 животных на каждый срок. Контролем служили интактные крысы (n = 5).

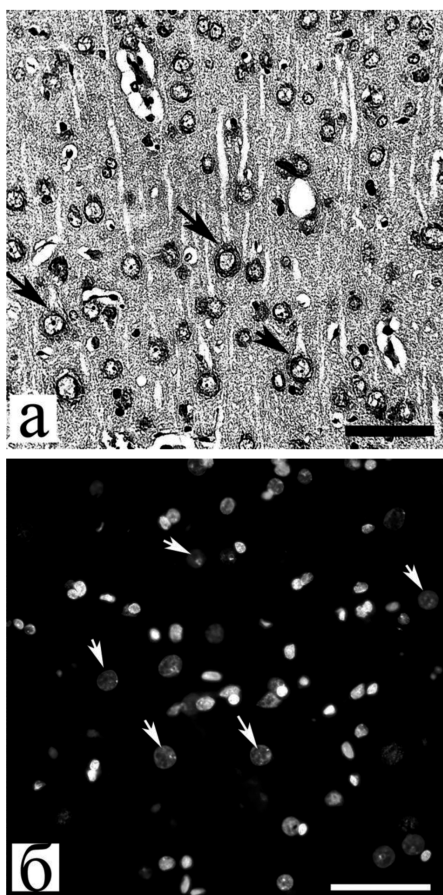


Рис. 1. Слой V моторной коры головного мозга белой крысы в норме: а — при окраске по Нисслю пирамидные нейроны (черные стрелки) имели большие округлые ядра с ядрышком и незначительным количеством конденсированного хроматина; б — при окраске DAPI ядра нейронов (белые стрелки) имели слабое свечение, а ядра глиальных клеток (овальные) — яркое свечение. Объектив x40, шкалы — 60 мкм.

Головной мозг фиксировали путем перфузии смеси 1% раствора глутарового альдегида, 4% раствора параформа на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) и 5% раствора сахарозы через восходящую часть дуги аорты под давлением 90—100 мм рт. ст. и путем погружения в аналогичный раствор. Затем часть материала заключали в парафин, готовили фронтальные срезы (5 мкм) на уровне сенсомоторной коры (СМК) [20]. Эти срезы окрашивали по Нисслю и DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Для иммуногистохимической окраски использовали антитела к нейронспецифической енолазе (NSE), визуализацию иммунной реакции осуществляли с помощью козьих поликлональных вторичных антител, ассоциированных с флуоресцентным красителем TexasRed® Sulfonyl Chloride. Применялась двухканальная флуоресценция для одновременного выявления в нейронах ядер (DAPI — различные оттенки синего) и цитоплазмы нейронов (NSE — красная) [8].

Цифровые изображения получали с помощью камеры AxioCam MRc и объектива EC Plan-Neofluar x40 (апертура 0.9). Применялись 2 фильтра производства Karl Zeiss: для Texas Red® и DAPI. С помощью программы AxioVision формировались двухслойные графические файлы [8]. Нейроны легко верифицировались, их цитоплазма окрашена в красный цвет (NSE).

Для ультраструктурного исследования выделяли СМК, рассекали на пирамидные блоки, контрастировали 1—2 ч в 1% незабуференном растворе четырехоксида осмия, промывали, обезвоживали и заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие (70—100 нм) срезы готовили на ультрамикротоме LKB-8800 (Швеция), окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали и фотографировали на микроскопе Hitachi-600H (Япония). На каждый срок фотографировали по 50 полей зрения при увеличении x12 000. На оцифрованных электронограммах проводили качественную оценку ультраструктуры клеток.

Статистический анализ осуществлялся с помощью программ MedCalc® и StatSoft Statistica 8.0. Проверку статистических гипотез проводили при помощи непараметрических критериев. В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 показаны два поля зрения СМК головного мозга белой крысы в норме, окрашенные по Нисслю (а) и DAPI (б). При окраске по Нисслю можно было оценить общую численную плотность (ОЧП) перикарионов. Например, на рисунке 1, а, по данным морфометрического анализа, она составила 315/1 мм². Глиальные клетки трудно различались среди других структур СМК, что затрудняло оценку

их количества и размеров (рис. 1, а). Флуоресцентная окраска с помощью DAPI позволила надежно верифицировать нейроны (большие, круглые ядра темно-синего цвета с небольшим количеством конденсированного хроматина — яркое свечение) и астроциты (небольшие овальные, яркие светло-синие ядра) (рис. 2 и 3). Например, на рисунке 1, б ОЧП ядер нейронов составила 290, а глиальных клеток — 435 на 1 мм².

Таким образом, при использовании окраски по Нисслю и DAPI в одинаковых слоях СМК нами были получены близкие значения ОЧП нейронов. Однако окраска DAPI точно верифицировала ещё и ядра других клеток.

По данным светооптического исследования, после острой ишемии в СМК выявлены: различные проявления гидропической дистрофии нервных клеток, очаговый и тотальный хроматолиз, эктопия ядер, гиперхроматоз, гомогенизация ядер и цитоплазмы, распад ядер и ядрышка, кариоцитолитизис (клетки-тени), гиперхромные сморщенные клетки (пикноморфные) и нейронафагия. Превалировали гиперхромные ишемические изменения без сморщивания нейронов.

Морфометрический анализ (для каждого срока оценивалось по 250 нейронов в произвольно взятых полях зрения) показал, что содержание наиболее типичных для острой ишемии гиперхромных нейронов (всех типов) статистически значимо изменялось в течение 30 сут. постшемического периода: в слое III (ANOVA, H-критерий Краскела—Уоллиса =15,5, $\rho=0,001$) и слое V (14,7, $\rho=0,002$). На 3-и сут. после ишемии выявлено максимальное содержание гиперхромных нейронов в слое III — 62,5% (95% ДИ: 56,2—68,5%) и слое V — 58,5% (95% ДИ: 52,1—64,7%). В этот же срок отмечено максимальное содержание необратимо измененных клеток-теней — 11,5% (95% ДИ: 7,8—16,1%) и пикноморфных клеток — 18,5% (95% ДИ: 13,9—23,9%, слой III), 12,2% (95% ДИ: 8,4—16,9%, слой V). В сравнении с нормой (интактные животные) общая численная плотность пирамидных нейронов в течение 30 сут. постшемического периода в слое III СМК снижалась на 30,5% (95% ДИ: 24,9—36,6%), а в слое V — на 14,4% (95% ДИ: 10,3—19,4%).

Таким образом, по данным светооптического исследования (окраска по Нисслю), после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий установлены диффузно-очаговые реактивные и патологические изменения нейронов СМК. Однако только часть этих нейронов острого периода (1 и 3 сут.) в последующем подвергалась необратимой деструкции и элиминации.

При двойной окраске DAPI и на NSE было установлено, что нормохромные пирамидные нейроны

имели большие округлые ядра с незначительным количеством конденсированного хроматина на фоне равномерного синего свечения окружающего эухроматина. В цитоплазме нейронов четко верифицировались скопления NSE (красные гранулы), что отличало их от ярких ядер глиальных клеток (рис. 2, а). В постшемическом периоде в ядрах гиперхромных нейронов увеличивалось количество конденсированного хроматина (рис. 2, б, в). В цитоплазме несморщенных гиперхромных нейронов выявляли высокое содержание NSE, что, вероятно, свидетельствовало о компенсаторной активации данного фермента гликолиза при ишемии.

После острой ишемии вокруг реактивно измененных темных пирамидных нейронов прогрессивно увеличивалось количество астроцитов, максимально через 7 и 14 сут. Ядра этих клеток были мельче, чем ядра нейронов, содержали существенно больше конденсированного хроматина, что объясняет их очень яркое свечение (рис. 2, б, в).

Среди реактивно измененных темных нейронов отмечали клетки с признаками апоптоза (рис. 2, г, д, е), относительное содержание которых через 1 сут. было на уровне 4% (95% ДИ: 1,9—7,2%), а через 3 сут. достигало максимума — 9% (95% ДИ: 5,8—13,3%). Выявили статистически значимую динамику содержания апоптотических клеток (слой III: $H=12,2$, $\rho=0,01$; слой V: $H=11,4$,

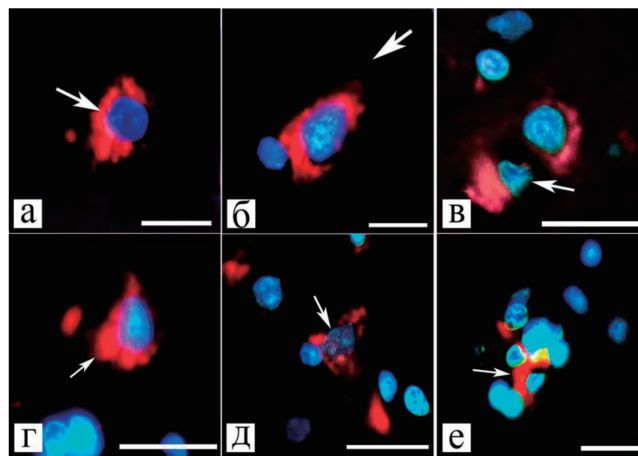


Рис. 2. Пирамидные нейроны слоя III соматосенсорной (а, г) и слоя V моторной коры (б, в) головного мозга белой крысы в норме (а) и через 3 сут. после острой ишемии (б, в, г, д, е): а — пирамидный нейрон, округлое ядро содержит незначительное количество конденсированного хроматина, в цитоплазме скопления NSE (красные гранулы); б, в — пирамидные нейроны, конденсация хроматина, изменение формы ядра (стрелки); г — начальная стадия апоптоза, конденсация хроматина, фрагментация цитоплазмы (стрелка) без разрушения; д — апоптотический распад ядра и цитоплазмы на фрагменты (стрелка); е — фагоцитоз поврежденного нейрона (стрелка) глиальными клетками (овальные с яркой флуоресценцией). Флуоресцентная окраска DAPI и иммунофлуоресцентная окраска на NSE. Объектив х40, шкала — 25 мкм.

$\rho = 0,03$). При окраске ДАР1 фрагментированные апоптозные ядра отчетливо выявлялись в виде типичных групп, близко расположенных плотных флуоресцирующих телец ДНК-содержащего материала, что позволяло их легко идентифицировать (рис. 2, д). Необходимо отметить длительное сохранение в постишемическом периоде реакции на NSE в цитоплазме нейронов с конденсированным ядерным хроматином (гиперхромные и апоптозные клетки) (рис. 2. е).

Проведено сопоставление различных морфотипов нейронов, выявленных при световой, флуоресцентной и электронной микроскопии. Функциональное состояние нейронов в ходе электронно-микроскопического исследования оценивали на основании сравнительного анализа показателей:

- 1) количества и распределения гетеро- и эухроматина, РНП-частиц (транскрипционной активности);
- 2) структурной организации ядрышка (размеры, форма, плотность, состав);
- 3) состояния ядерных мембран (инвагинации, поры, перинуклеолярное пространство);
- 4) белоксинтезирующего аппарата цитоплазмы (гранулярная эндоплазматическая сеть — ГЭС);
- 5) энергетической системы (популяции митохондрий);
- 6) аппарата Гольджи и системы вакуолей.

Перикарион нормохромных нейронов на ультраструктурном уровне представлен крупным округлым ядром, содержащим ядрышко и гомогенную кариоплазму, а также цитоплазмой с клеточными органеллами. Конденсированного хроматина в ядрах было мало, превалировал эухроматин (рис. 3, а). Ультра-

структурная организация нормохромных нейронов была сопоставима с результатами световой и флуоресцентной микроскопии этих клеток (рис. 1, а, 2, а)

В постишемическом периоде в СМК белых крыс были выявлены изменения ультраструктуры всех ее компонентов — нейронов, их отростков (аксонов, дендритов), синапсов, глиальных клеток, а также микрососудов. Характер реактивных, деструктивных и компенсаторно-восстановительных изменений нейронов прежде всего зависел от периода: острый постишемический (1, 3 сут.), ранний восстановительный (7, 14 сут.) и поздний восстановительный период (21, 30 сут.).

В остром постишемическом периоде (1, 3 сут.) прежде всего появлялись структурные изменения, связанные с дисфункцией водно-электролитного и белкового обмена, приводящие к развитию цитотоксического отека-набухания (рис. 3, б, в). В наибольшей степени повреждались отростки фибриллярных астроцитов вокруг микрососудов, протоплазматических астроцитов и других структур нейропиля (синаптические терминалы, мелкие дендриты).

Необратимый распад нейронов сочетался с деструкцией митохондрий и разрушением цитомембран (рис. 3, в). Такие изменения нейронов являлись выражением быстрого фокального или тотального ишемического колликационного некроза (развитие кардиоцитолитиса, клетки-тени).

Другие нейроны СМК, напротив, превращались в гиперхромные с различной степенью конденсации хроматина (рис. 3, г). Именно эти клетки были наиболее многочисленными, неоднородными по структу-

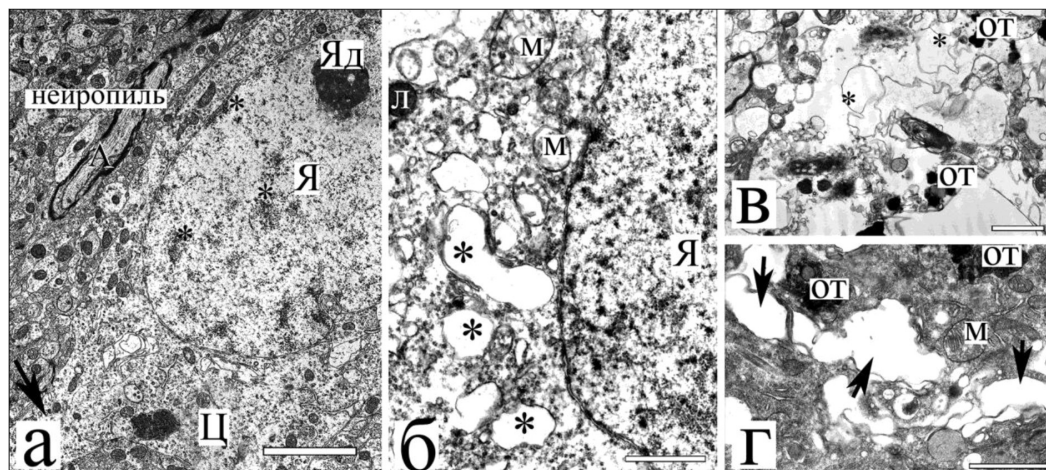


Рис. 3. Пирамидные нейроны слоя III соматосенсорной коры головного мозга белой крысы в норме (а) и через 1 сут. после острой ишемии (б): а — ультраструктура всех составляющих нейрона (ядро, цитоплазма), его отростков (дендрит, аксон) и окружающего нейропиля без признаков повреждения, небольшое количество околомембранного и внутриядерного конденсированного хроматина (*); б — гидропическая дистрофия, появление в клетке вакуолей (*), наполненных цитоплазматической жидкостью; в — необратимый распад (*) структур нейрона; г — формирование «темного нейрона». А — аксон, стрелка — базальный дендрит, От — остаточные тельца, Л — лизосома, М — митохондрия, Ц — цитоплазма, * — небольшие фрагменты околомембранного и внутриядерного конденсированного хроматина, Я — овальное ядро, окруженное двойной мембраной с инвагинацией, Яд — ядрышко. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение x15000, шкала — 2 мкм (а, б) и 1 мкм (в, г).

ре и длительно сохранялись в постиншемическом периоде. Общим для них явилось наличие электронно-плотного ядра и цитоплазмы. По ультраструктурным признакам выделяли несколько состояний гиперхромных нейронов: 1 — сниженной активности, 2 — дегенеративных (необратимых) изменений с исходом в коагуляционный некроз (пикноморфные нейроны) (рис. 4, а, б, в) и 3 — с исходом в апоптоз (рис. 4, г, д), а также 4 — с повышенной активностью и функциональным напряжением (рис. 5).

Через 1 и 3 сут. после острой ишемии преобладали гиперхромные нейроны в состоянии сниженной биосинтетической активности, с признаками дегенеративных изменений. Через 7, 14, 21 и 30 сут. после острой ишемии — необратимо поврежденные пикноморфные нейроны, а также нейроны с признаками повышенной активности и функционального напряжения. В отдаленном постиншемическом периоде (в сравне-

нии с острым) в 2—3 раза увеличивалась доля нормохромных нейронов. То есть, тинкториальные свойства части гиперхромных нейронов восстанавливались.

В нейронах с снижением функциональной активности, по сравнению с нормой, уменьшались размеры ядра и ядрышка, увеличивалось содержание гетерохроматина и отсутствовали интерхроматиновые гранулы, отмечалась выраженная осмиофилия кариоплазмы. Плотные ядрышки смещались на периферию ядра, неравномерно расширялись перинуклеарные пространства, появлялись складки поверхности ядра, многочисленные светлые митохондрии с разрушенными кристами, расширялись канальцы эндоплазматической сети (рис. 4, а). При этом эти нейроны сохраняли неповрежденные аксосоматические синапсы (рис. 4, е). Итогом тяжелого ишемического повреждения нейронов были коагуляционный некроз (пикноморфные ней-

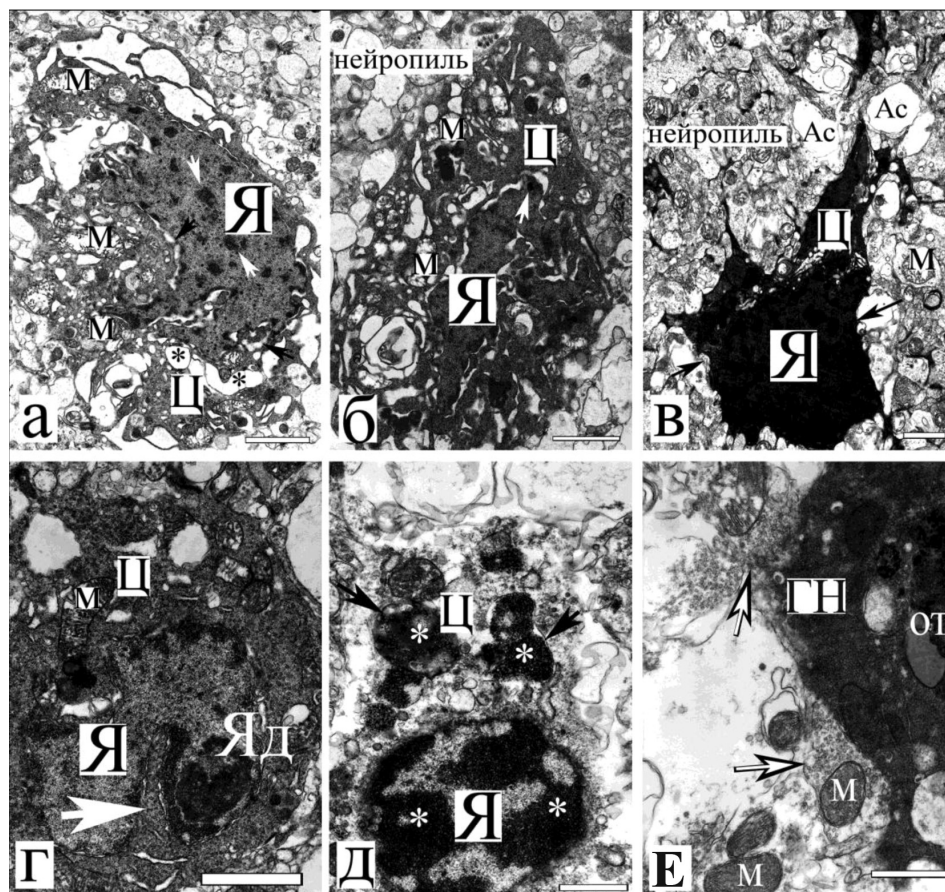


Рис. 4. Пирамидные нейроны в слое III соматосенсорной коры белой крысы в постиншемическом периоде: а — гиперхромный нейрон со сниженной функциональной активностью (описание см. в тексте), конденсированным хроматином (стрелки), через 1 сут.; б — гиперхромный нейрон с неполной дегидратацией и деградацией цитоплазмы, через 3 сут.; в — пикноморфный гиперхромный пирамидный нейрон (полная дегидратация цитоплазмы, выраженная гомогенизация перикариона), через 3 сут.; г — начальная стадия апоптоза, конденсация хроматина и изменение формы ядра, через 1 сут.; д — завершающая стадия апоптоза, появления апоптотических ядерных телец, разрушение цитоплазматической мембраны; е — аксосоматические синапсы (стрелки) на гиперхромном нейроне (ГН). Ас — отечные отростки протоплазматического астроцита, ОТ — остаточные тела, М — митохондрии, Ц — цитоплазма, Я — ядро, * — расширенная эндоплазматическая сеть, белые стрелки; черная стрелка — перинуклеарное пространство. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение $\times 10000$, шкала — 3 $\mu\text{м}$ (а, б, г, д), 2 $\mu\text{м}$ (в), 0,5 $\mu\text{м}$ (е).

роны) и апоптоз (рис. 4, в, д). Для пикноморфных нейронов характерно: выраженная осмиофилия ядра и цитоплазмы, уменьшение размеров тела клетки за счет сморщивания; деформация клеточного ядра, инвагинации; массивные скопления гетерохроматина под внутренней ядерной мембраной; фрагментация ядрышка и перемещение его частей к внутренней ядерной мембране; суженное перинуклеарное пространство; увеличенные размеры митохондрий, светлый матрикс и разрушение значительной части крист; плохо различимые каналцы эндоплазматической сети. Пикноморфные нейроны были окружены зоной отека-набухания астроцитарных отростков (рис. 4, в).

Начальные проявления коагуляционно-ишемического некроза и апоптоза, из-за сходных ультраструктурных характеристик, очень сложно было отличить даже с помощью электронной микроскопии (рис. 4, б, г). Однако для ишемического коагуляционного некроза нейронов в большей степени были характерны такие ультраструктурные изменения, как набухание митохондрий, локальная коагуляция, гиперосмиофилия протеинов мембран, микротрубочек, крист митохондрий и цистерн эндоплазматической сети, конденсация хроматина ядра в плотные глыбки, увеличение в кариоплазме количества перихроматиновых гранул, уплотнение агрегированного хроматина и дезинтеграция ядрышка. От цистерн гранулярной эндоплазматической сети отделялись рибосомы, значительно расширились цистерны оболочки ядра и эндоплазматической сети, отмечалась необратимая денатурация и коагуляция белков цитозоля, появлялись неструктурированные нерастворимые соединения (рис. 4, а, б, в). При коагуляционно-ишемическом

отсроченном некрозе не выявлено признаков активации лизосом (рис. 4 а, б, в), а утилизация остатков погибших нейронов происходила длительное время с привлечением фагоцитов.

Наиболее надежным дифференциальным критерием, отличающим коагуляционно-ишемический некроз от апоптоза в раннем постишемическом периоде, являлось морфологическое состояние ядра. При апоптозе в пикнотизированном ядре с гофрированными контурами ядрышко сохранялось (рис. 4, г). При коагуляционном некрозе наблюдали глубокий пикноз ядра с разрушением ядрышка (рис. 4, в). Абсолютным признаком программированной клеточной гибели было формирование апоптотических тел и разрушение цитолеммы (рис. 4, д).

Кроме нормохромных и гиперхромных нейронов в отдаленном восстановительном периоде в СМК встречались гипохромные нейроны 7% (ДИ: 4,2—10,9%) с большим содержанием остаточных телец, поврежденными митохондриями, расширенными цистернами эндоплазматической сети, малым содержанием рибонуклеопротеинов в ядре (хроматина) и цитоплазме, неровными краями ядра. Вполне вероятно, что подобные изменения отражали функциональное истощение нейронов. Очень редко 3% (95% ДИ: 1,3—6%) встречались апоптотические клетки (рис. 4, г, д).

Таким образом, после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий нами выявлены реактивные тинкториальные, гидропические дистрофические и некробиотические (коликвационные и коагуляционные) изменения, а также структурные признаки апоптоза. Максимальной активности механизмы апоптоза достигали через 3 сут. после острой ишемии. За счет апоптоза ОЧП нейронов СМК уменьшалась на 9—17%.

В отдаленном восстановительном периоде (14, 21 и 30 сут.) часть не сморщенных гиперхромных и нормохромных нейронов имела признаки активного функционирования и напряжения (транскрипционной активности). У этих нейронов отмечалась высокая электронная плотность ядер, неровность их контуров, очаговые скопления интерхроматиновых гранул и перихроматиновых фибрилл на фоне светлого эухроматина. Ядрышки этих нейронов увеличивались в размере, располагались эксцентрично, содержали гранулярные компоненты. Краевой хроматин ядра был представлен небольшими скоплениями под внутренней ядерной мембраной, фрагментарно расширилось перинуклеарное пространство, отмечались складки ядерной мембраны. В перинуклеарной зоне цитоплазмы выявлено большое количество темных неповрежденных митохондрий. В некоторых клетках наблюдалось очаговое расширение каналцев эндоплазматической сети, увеличение плотности свободных рибосом, гипертрофированный комплекс Гольджи, мультивезикулярные и мультиламинарные тела (рис. 5).

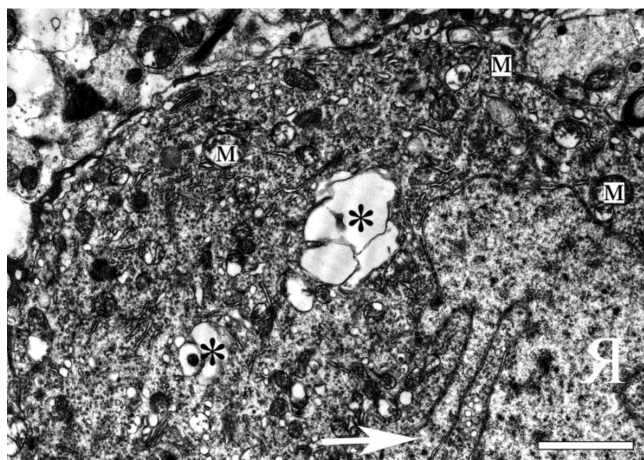


Рис. 5. Ультраструктурные проявления функционального напряжения темного пирамидного нейрона соматосенсорной коры белой крысы в постишемическом периоде, 14 сут.: расширение каналцев эндоплазматической сети (*), большое количество митохондрий (М), складки ядерной мембраны (стрелка), свободные рибосомы. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца, увеличение $\times 12000$, шкала — 1 мкм.

Следовательно, структурная организация части нормохромных и гиперхромных нейронов (в состоянии активации и напряжения) указывала на высокую интенсивность протекающих в них транскрипционных процессов (в клеточном ядре) и белоксинтетических процессов (в цитоплазме — внутриклеточная регенерация и компенсаторная гиперплазия). Вероятно, именно за счет подобных нейронов происходило восстановление функций поврежденного головного мозга в отдаленном постиншемическом периоде.

По данным литературы, динамика, основные фазы и направления структурно-функциональных изменений нейронов головного мозга белых крыс после острой ишемии остаются актуальными проблемами нейроморфологии [1]. Изучение структурных механизмов повреждения нейронов в постиншемическом периоде неизбежно сталкивается с необходимостью верификации некроза и апоптоза. Существует множество различных методов, которые позволяют визуализировать различные признаки постиншемической гибели клеток. Однако наиболее надежным методом, способным однозначно различать некроз и апоптоз, является детальный анализ клеточной ультраструктуры с помощью электронной микроскопии [15]. Поэтому в настоящее время многие авторы рекомендуют делать акцент на детальном описании морфологической картины патологически измененных клеток. Наряду с иммуногистохимией, TUNEL- и ISEL-методами это позволяет избежать искажения интерпретации морфометрических результатов и наиболее точно дифференцировать «апоптоз» и «некроз» [15, 21].

Необходимо учитывать, что механизмы, посредством которых нейроны погибают и восстанавливаются при ишемии очень сложны и до конца не изучены [15]. Согласно рекомендациям Nomenclature Committee on Cell Death (2009), смерть клетки может быть классифицирована на основе морфологического внешнего вида (некроз, апоптоз, аутофагия и различные смешанные фенотипы), но только тогда, когда доказаны: 1 — потеря целостности плазматической мембраны, 2 — полный распад клетки, включая ее ядро, или 3 — фагоцитоз фрагментов или клетки в целом. При этом иммуногистохимические маркеры апоптоза играют вспомогательную роль [22].

К сожалению, несмотря на огромный объем информации, «точка невозврата» и направление гибели при оценке состояния конкретных гиперхромных нейронов после острой ишемии до сих пор не определены и нет простых решений этих проблем. В большинстве случаев при анализе морфологических данных можно судить только о вероятности появления некроза или апоптоза для конкретного гиперхромного нейрона [15].

В настоящей работе проведено детальное описание всех морфотипов измененных пирамидных нейронов СМК белых крыс после острой 20-минутной ишемии с помощью световой, флуоресцентной (DAPI) и электронной микроскопии. Сочетанное использование методов позволило классифицировать нейроны и, при наличии четких структурных маркеров (распад ядер, клетки, фагоцитоз) доказать возможность апоптоза гиперхромных нейронов СМК после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. При окраске DAPI фрагментированные апоптозные ядра отчетливо выявлялись в виде типичных групп, близко расположенных плотных флуоресцирующих телец ДНК-содержащего материала, что позволяло их легко идентифицировать. Наиболее надежным критерием, отличающим коагуляционно-ишемический некроз от апоптоза в раннем постиншемическом периоде, являлось морфологическое состояние ядра, а абсолютным признаком программированной клеточной гибели является формирование апоптотических тел и разрушение цитолеммы.

Например, на основании подобного подхода, в слое III через 3 сут. показано, что 5,8—13,3% гиперхромных нейронов подверглось апоптозу, 13,9—23,9% — коагуляционному некрозу, а остальные выходили из патологического состояния в отдаленном восстановительном периоде. Необратимо измененные клетки-тени составляли 7,8—16,1%. В результате общая численная плотность пирамидных нейронов в течение 30 сут. постиншемического периода в слое III СМК снижалась на 24,9—36,6%, а в слое V — на 10,3—19,4%. Ранее близкие значения показаны в процессе формирования очага ишемического инсульта после полной локальной ишемии в зоне пенумбры [14, 15].

Заключение

Таким образом, при использовании 2-сосудистой модели неполной глобальной ишемии без гипотонии была доказана смешанная природа гибели нейронов в СМК — одновременное сочетание процессов некроза и апоптоза (параапоптоз). Однако основную роль в гибели нейронов все же играли процессы быстрого и отдаленного ишемического некроза. Полученные результаты могут быть полезны при изучении динамики, основных фаз и направлений структурно-функциональных изменений нейронов неокортекса млекопитающих при сравнении разных экспериментальных моделей острой ишемии головного мозга, а также для понимания структурных основ патогенеза постиншемической энцефалопатии.

References

1. Semchenko V.V., Stepanov S.S., Bogolepov N.N. *Synaptic plasticity of the brain (fundamental and applied aspects). [Sinapticheskaya plastichnost' golovного mozga (fundamental'nye i prikladnye aspekty)]*. 2nd ed. Moscow; 2014. (in Russian)
2. Wehman J.C., Hanel R.A., Guidot C.A. et al. Atherosclerotic occlusive extracranial vertebral artery disease: indications for intervention, endovascular techniques, short-term and long-term results. *J Interv Cardiol*. 2004; 17(4): 219-32.
3. Nguyen-Huynh M.N., Johnston S.C. Transient ischemic attack: a neurologic emergency. *Current neurology and neuroscience reports*. 2005; 5(1): 13-20.
4. Gusev E. I., Konovalov A. N., Skvortsova V. I. *Neurology and neurosurgery: textbook: in 2 V. [Nevrologiya i neyrokhirurgiya: uchebnik: v 2 t.]*. 2nd ed., correction and additional. V. 3: Neurology. Moscow; GEOTAR-Media; 2013. (in Russian)
5. Shertaev M.M., Ibragimov U.K., Ikramova S.Kh. et al. Morphological changes in brain tissue during experimental ischemia. *Vestnik NGPU*. 2015; 1(23): 72-9. (in Russian)
6. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews*. 1999; 79(4): 1431-568.
7. Back T., Hemmen T., Schuler O.G. Lesion evolution in cerebral ischemia. *J Neurol*. 2004; 251: 388-97.
8. Mytsik A.V., Stepanov S.S., Larionov P.M., Akulinin V.A. Actual problems of studying the structural and functional state of neurons of the human cerebral cortex in the postischemic period. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2012; 1(1): 37-47. (in Russian)
9. Sergeev A.V., Stepanov S.S., Akulinin V.A., Mytsik A.V. Natural mechanisms of protecting the human brain in chronic ischemia. *Obshchaya reanimatologiya*. 2015; 11(1): 22-32. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-1-22-32. (in Russian)
10. Akulinin V.A., Stepanov S.S., Mytsik A.V., Stepanov A.S., Razumovskiy V.S. Brain interneurons of human neocortex after clinical death. *Obshchaya reanimatologiya*. 2016; 12(4): 24-36. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-4-24-36. (in Russian)
11. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Mytsik A.V. Immunohistochemical characteristics of communication structures of neurons of the human cerebral cortex in norm and after reperfusion. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2016; 5(4): 61-8. (in Russian)
12. Winkelmann E.R., Charcansky A., Faccioni-Heuser M.C., Netto C.A., Achaval M. An ultrastructural analysis of cellular death in the CA1 field in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia followed by 2, 4 and 10 days of reperfusion. *Anat Embryol*. 2006; 211: 423-34.
13. Zeng Y.S., Xu Z.C. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience research*. 2000; 37: 113-25.
14. Ruan Y.W., Ling G.Y., Zhang J.L., Xu Z.C. Apoptosis in the adult striatum after transient forebrain ischemia and the effects of ischemic severity. *Brain research*. 2003; 982: 228-40.
15. Zille M., Farr T.D., Przesdzing I., Muller J. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: problems, and perspectives. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012; 32: 213-31.
16. Nudo R.J. Functional and structural plasticity in motor cortex: implications for stroke recovery. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*. 2003; 14(1): 57-76.
17. Pagnussat A.S., Faccioni-Heuser M.C., Netto C.A., Achaval M. An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion. *J Anat*. 2007; 211: 589-99.
18. Zink D., Sadoni N., Stelzer E. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods*. 2003; 29(1): 42-50.
19. Ullah I., Ullah N., Naseer M.I., Lee H. Y., Kim M.K. Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons. *BMC neuroscience*. 2012; 13: 1-11. DOI: 10.1186/1471-2202-13-11
20. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego (California): Elsevier Academic Press; 2005.
21. Galluzzi L., Aaronson S.A., Abrams J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation*. 2009; 16: 1093-107.
22. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 2009; 16: 3-11.

Сведения об авторах:

Степанов Александр Сергеевич, аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, Омский государственный медицинский университет; e-mail: ctepan55@yandex.ru;

Авдеев Дмитрий Борисович, канд. ветеринарных наук, доцент каф. безопасности жизнедеятельности, медицины катастроф, Омский государственный медицинский университет, e-mail: avdeev86@inbox.ru;

Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, Омский государственный медицинский университет, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru;

Степанов Сергей Степанович, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, Омский государственный медицинский университет, e-mail: serg_stepanov@mail.ru