

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.8-092+616.8-005

Сергеева С.П.¹, Шишкина Л.В.², Литвицкий П.Ф.¹, Бреславич И.Д.², Виноградов Е.В.²

Изменения структуры нейронов и астроцитов серого вещества головного мозга при его острой локальной ишемии у человека

¹ — ГБОУ ВПО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² — ФГБУ «Научно-исследовательский институт нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России, 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., д. 16

Цель исследования. Выявление закономерности изменений структуры нейронов и астроцитов коры головного мозга при его острой локальной ишемии у человека. **Методы.** Образцы тканей головного мозга 9 человек, умерших в результате острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу в бассейне левой средней мозговой артерии брали из трех зон: 1 — непосредственно прилежащей к очагу некроза, 2 — отдаленной от нее на 5—10 см, 3 — региона контрлатерального полушария — симметричного очагу ишемии. Срезы окрашивали по Нисслю и гематоксилином-эозином. Непрямым иммунопероксидазным иммуногистохимическим методом выявляли белки GFAP, MAP-2, NSE, p53. **Результаты.** В зоне мозга, непосредственно прилежащей к очагу некроза, выявлены выраженные изменения числа и структуры астроцитов и нейронов, характерные для воспаления. В зоне, граничащей с очагом некротической ткани (в 5—10 см от нее), а также в контрлатеральном полушарии, симметричном очагу ишемии, обнаружены признаки апоптоза нейронов и астроцитов, а также сокращение расстояния между ними. Учитывая данные литературы, можно считать, что указанный феномен является признаком нейропластических процессов, активирующихся в условиях локального ишемического повреждения головного мозга. **Заключение.** Полученные фактические данные свидетельствуют о том, что при локальной ишемии мозга в нем происходят характерные структурные изменения как в области прямого его поражения, так и в ткани контрлатерального полушария. Эти изменения можно расценивать как признак системной активации в мозге нейропластических процессов.

Ключевые слова: нейроны; астроциты; головной мозг; локальная ишемия.

Для цитирования: Сергеева С.П., Шишкина Л.В., Литвицкий П.Ф., Бреславич И.Д., Виноградов Е.В. Изменения структуры нейронов и астроцитов серого вещества головного мозга при его острой локальной ишемии у человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 4—8.

Для корреспонденции: Сергеева Светлана Павловна, канд. мед. наук, каф. патофизиологии, ГБОУ ВПО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», e-mail: svetlanapalna@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.07.2016

Sergeeva S.P.¹, Shishkina L.V.², Litvitskiy P.F.¹, Breslavich I.D.², Vinogradov E.V.²

Structure changes of human brain gray matter neurons and astrocytes in acute local ischemic injury

¹ — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8-2 Trubetskaya st., Moscow, 119991, Russia

² — N.N. Burdenko Scientific Research Neurosurgery, 16 4th Tverskaya-Yamskaya, Moscow, 125047, Russia

The purpose to identify key morphological features of the Astrocytes and Neurons in the acute local cerebral ischemia human cortex. **Subjects and methods:** Left middle cerebral artery ischemic stroke died persons (n = 9) brain tissue samples from 3 zones: 1st — contiguous to the tissue necrotic damage site zone, 2nd — 5—10 cm distant from the previous one, 3rd — the damage site symmetrical zone of the contralateral hemisphere. For GFAP, MAP-2, NSE, p53 detection indirect immunoperoxidase immunohistochemical staining method has been used. Also, the samples were Nissl and Hematoxylin-Eosin stained. **Results.** The most pronounced changes in the quantity and morphological structure of astrocytes and neurons are found in directly adjacent to the necrotic core region of the left middle cerebral artery ischemic stroke brain. This indicates the prevalence of the inflammation processes around the area of nerve tissue ischemic destruction. Morphological changes of neurons and astrocytes, apoptosis, enhanced neuron-astrocyte interaction found in the area bordering on necrotic core (5—10 cm from it), as well as ischemic hearth symmetrical sites of the contralateral hemisphere. This

interaction is essential for the neuroplasticity realization in the local ischemic brain injury. **Conclusion.** The results obtained were shown the nerve tissue morphological characteristics changes occur in local cerebral cortex ischemic injury not only in the lesion, but also in the contralateral hemisphere. These changes are probably related to the implementation of neuroplasticity.

Keywords: astrocytes; neurons; ischemic injury.

For citation: Sergeeva S.P., Shishkina L.V., Litvitskiy P.F., Breslavich I.D., Vinogradov E.V. Structure changes of human brain gray matter neurons and astrocytes in acute local ischemic injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 4–8. (in Russ).

For correspondence: Svetlana P. Sergeeva, MD, PhD, Associate Professor of the Department for Pathophysiology of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8-2 Trubetskaya st., Moscow 119991, Russia; e-mail: svetlanapalna@mail.ru

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Sergeeva S.P., <http://orcid.org/0000-0002-0083-1213>

Breslavich I.D., <http://orcid.org/0000-0002-9321-9102>

Received 01.07.2016

Введение

При повреждении головного мозга одним из наиболее быстро и динамично реагирующих глиальных пулов является астроцитарный, а наиболее уязвимыми элементами — нейроны [1]. В ряде исследований показано, что даже при локальном ишемическом повреждении нейроны подвергаются апоптозу во всех областях головного мозга, хотя и в разной мере. Предполагается, что астроциты непосредственно участвуют в этом процессе [2]. Астроциты, по мнению отдельных исследователей, играют фундаментальную роль в патогенезе повреждений головного мозга, ассоциированных с гибелью нейронов. Тяжесть повреждения нервной ткани связана с невозможностью обеспечения астроцитами эссенциальных метаболических потребностей нейронов [3]. Так, в нормально функционирующей нервной ткани и при ее повреждении астроциты участвуют в регуляции внеклеточного уровня ионов и нейротрансмиттеров, а также в системе антиоксидантной защиты мозга [4], нивелируют токсическое действие избытка глутамата, препятствуя развитию эксайтотоксического каскада [5, 6], обеспечивают восстановление и контроль проницаемости гематоэнцефалического барьера, продуцируют факторы роста [7]. Доказано, что астроциты играют существенную роль в системном ответе организма на повреждение. С учетом этого, именно астроциты являются объектом для поиска воздействий, повышающих выживаемость нейронов и эффективность репаративных процессов в них при повреждении [8, 9].

Цель исследования — выявление закономерности изменений структуры нейронов и астроцитов коры головного мозга при его острой локальной ишемии у человека.

Методика

Образцы ткани головного мозга, взятые при аутопсии 9 человек, чья смерть наступила в период от 2 до 6 сут. после острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу в бассейне левой средней мозговой артерии. Аутопсийный материал получали в патологоанатомическом отделении ГКБ № 36 г.Москвы не позднее чем через 24 ч после момента смерти пациента. Работа, в рамках которой проводилось настоящее исследование, одобрена Межвузовским этическим комитетом. В каждом случае образцы ткани брали из 3 зон головного мозга: 1 — прилежащей непосредственно к очагу некротизированной ткани, 2 — отдаленной от предыдущей на 5–10 см, 3 — зоны контрлатерального полушария — симметричной очагу ишемии. Образцы тканей фиксировали в 10%-м забуференном растворе формалина. После отмывания фиксатора в проточной воде выполняли стандартную гистологическую проводку образцов. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Leica RM2125RT (Германия) и размещали их на предметных стеклах с полилизинным покрытием Vision biosystems plus slides (Великобритания).

Выявление белков GFAP, p53, NSE, MAP-2 проводили непрямым иммунопероксидазным методом. Для иммунофенотипирования использовали моноклональные антитела к указанным белкам человека фирмы Vision biosystems novocastra (Великобритания), пероксидазную детекционную систему Peroxidase Detection System for Novocastra производства «Leica Microsystems» (Германия). Визуализация реакции осуществлялась ДАВ-хромогеном. Иммуногистохимические реакции осуществляли согласно прото-

колам, прилагаемым к используемым антителам. Производили высокотемпературную антигенную демаскировку. Для предотвращения эндогенной пероксидазной активности остывшие препараты промывали в растворе ТРИС-буфера (рН 7,54-7,58), обрабатывали 0,3% раствором перекиси водорода на метаноле (1:1). Фоновое контрастирование срезов осуществляли гематоксилином Майера. Полученные препараты изучали с помощью светового микроскопа «Axio Scope A1», Carl Zeiss (Германия) с использованием цифровой фотокамеры «Canon PowerShot», программного обеспечения AxioVision LE, Carl Zeiss (Германия). Контроль специфичности реакции проводили с помощью неиммунной сыворотки, антител к виментину («Dako», Дания). Часть серийных срезов окрашивали кризильным фиолетовым по методу Ниссля и гематоксилином — эозином. С использованием 25-узловой морфометрической сетки (с шагом 10 мкм), вмонтированной в окуляр микроскопа, при увеличении окуляра x10, объектива x90 проводили подсчет нейронов (MAP-2, по Нисслю) и астроцитов (GFAP) с учетом количества их реактивно измененных форм по методу С.Б. Стефанова. Затем вычисляли относительное содержание реактивно измененных нейронов и астроцитов. Вариационно-статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Значимыми считали различия при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При изучении срезов, окрашенных по Нисслю и гематоксилином — эозином, при увеличении x100 обнаружено снижение общего количества нейронов и глиальных элементов; отмечены диффузные «запус-

тения» участков коры мозга во всех исследуемых зонах. При этом изменения в зоне 1 были наиболее выражены. Среди выявленных при увеличении (x900) изменений нейронов преобладали гомогенизация и инкрустация цитоплазмы, тигролиз, деформация и сморщивание ядер, кариоцитоллиз с образованием клеток-«теней», хроматолиз, перемещение ядра на периферию клетки и его набухание, смещение ядрышка к периферии ядра; перицеллюлярный отек. Выраженность указанных изменений достигала максимума в зоне 1, однако и в двух других зонах также наблюдались сходные изменения.

Во всех исследованных зонах мозга выявлены признаки нарушения регионарного кровотока: венозная гиперемия и стаз, агрегация эритроцитов и периваскулярный отек. Выраженность указанных изменений была наибольшей в зоне 1. При этом в очаге некроза и в зоне 1 наблюдалась лейкоцитарная инфильтрация. В зонах 2 и 3 изменения были сопоставимы между собой.

При непрямом иммунопероксидажном иммуногистохимическом определении белков GFAP, MAP-2, NSE, p53 в различных зонах мозга при его острой локальной ишемии обнаружены закономерные изменения. В зоне 1 при реакции GFAP выявлено увеличение числа астроцитов, их выраженный интра- и перицеллюлярный отек, набухание и фрагментация их отростков. При реакции MAP-2 и NSE обнаружены признаки гомогенизации цитоплазмы нейронов, их интра- и перицеллюлярный отек, деформация и сморщивание ядер, кариоцитоллиз с образованием клеток-«теней», хроматолиз, набухание и перемещение ядра на периферию клетки. Важно, что в этой зоне, по сравнению с другими, интенсивность окрашивания обоих белков была наименьшей, а количество p53-позитивных клеток — наибольшим.

В зоне 2 выявлены признаки отека как астроцитов, так и нейронов, а также накопление жидкости в перицеллюлярном пространстве. При этом выраженность отека была значительно меньшей, чем в зоне 1. Наблюдалась также тенденция к увеличению числа расположенных периваскулярно астроцитов с признаками их отека и утратой отростков (рис. 1).

В отдельных участках зоны 2 обращает на себя внимание уменьшение расстояния между отдельными группами нейронов и астроцитами по сравнению с другими участками этой зоны (рис. 2). В указанных участках интенсивность окрашивания MAP-2 и NSE отдельных нейронов была более выраженной (рис. 3), а также наблюдалось большее число p53-позитивных клеток в сравнении с участками с менее выраженной нейрон-астроцитарной кооперацией.



Рис. 1. Периваскулярное расположение в зоне 2 астроцитов, их отек, отсутствие отростков (указаны стрелочками). Реакция GFAP, увеличение X200.

В участках мозга зоны 3 также выявлены характерные изменения как в нейронах, так и в астроцитах, однако степень их была меньшей по сравнению с другими зонами. Вместе с тем, в этих участках наблюдались признаки усиления нейрон-астроцитарной кооперации со свойственными для зоны 2 изменениями: уменьшением расстояния между отдельными группами нейронов и астроцитами, большей интенсивностью реакций MAP-2 и NSE в отдельных нейронах, а также обнаружением р53-позитивных клеток.

При морфометрическом анализе при окраске по Нисслю (контроль — MAP-2) выявлено, что относительное содержание морфологически измененных нейронов было наибольшим в зоне 1 (100%) и минимальным в зоне 3 (61%). В зоне 2 содержание нейронов с измененной формой и структурой составило 89%. При реакции GFAP обнаружено, что относительное содержание реактивно измененных астроцитов составило в зоне 1 — 100%, в зоне 2 — 45%, в зоне 3 — 14%. Эти факты позволяют утверждать, что при ишемическом в большей мере, как и при травматическом [1], повреждении мозга наиболее уязвимым элементом нервной ткани являются нейроны. Существует прямая зависимость между степенью и характером морфологических изменений нейронов и астроцитов. Так, в зоне 1, вокруг очага некротически измененной ткани (в условиях гипоксии, субстратного дефицита, лейкоцитарной инфильтрации — что по данным литературы считается признаками воспаления) активированные астроциты и микроглия являются основными продуцентами избытка цитокинов. Известно, что их токсический эффект весьма велик в отношении нейронов прилежащих участков нервной ткани [10], в том числе, судя по нашим данным, и зоны 2.

В зонах 2 и 3 мозга признаком активации адаптивных реакций можно считать более выраженную реакцию MAP-2 и NSE отдельных нейронов. Показано, что MAP-2 играет важную роль в развитии пластических процессов в дендритах нейронов, обеспечивая, в том числе, и изменения в синаптическом аппарате [11]. Иммуноцитохимическая реакция на NSE (2-фосфо-D-глицерат гидролаза) считается индикатором нейрональной активности. Показано, что повышение интенсивности метаболизма в нейронах сопровождается увеличением активности этого фермента в их цитоплазме [12]. В зонах 2 и 3 мозга, где наблюдались описанные выше процессы, отмечалось также максимальное количество р53-позитивных клеток. В этих клетках выявлена повышенная степень прокрашивания участков локализации фермента NSE, из чего можно сделать заключение, что эти клетки представляют собой именно нейроны. Мы полагаем, что они, по каким-либо причинам, не способ-

ны к реализации процессов нейропластичности и элиминируются в связи с активацией апоптоза. На дублирующих срезах при реакции GFAP наблюдаются признаки усиленной кооперации нейронов и астроцитов. В связи с этим, а также учитывая данные литературы [9, 13—15], можно сделать вывод о непосредственном участии астроцитов в реализации указанных процессов.

Таким образом, зоне мозга, непосредственно прилежащей к очагу ишемического некроза в наибольшей мере выражены изменения числа и структуры астроцитов и нейронов, свойственные для воспаления. В зоне мозга, граничащей с очагом некротической ткани (в 5—10 см от нее), а также в отдаленных от нее участках контрлатерального полушария, симметричной

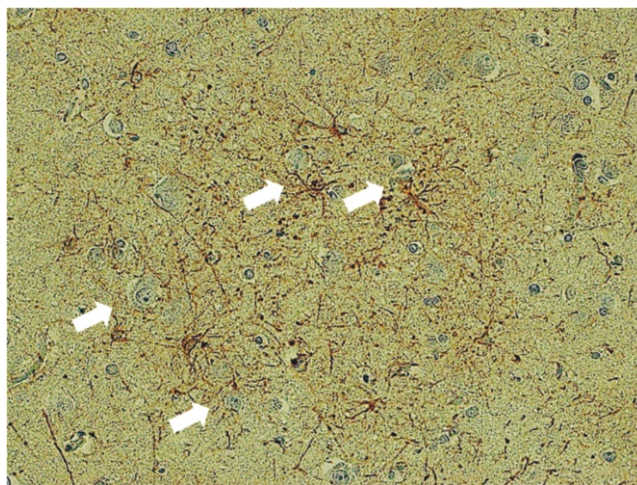


Рис. 2. Уменьшение расстояния между астроцитами и нейронами в зоне 2 (указаны стрелочками). Реакция GFAP, увеличение X400.

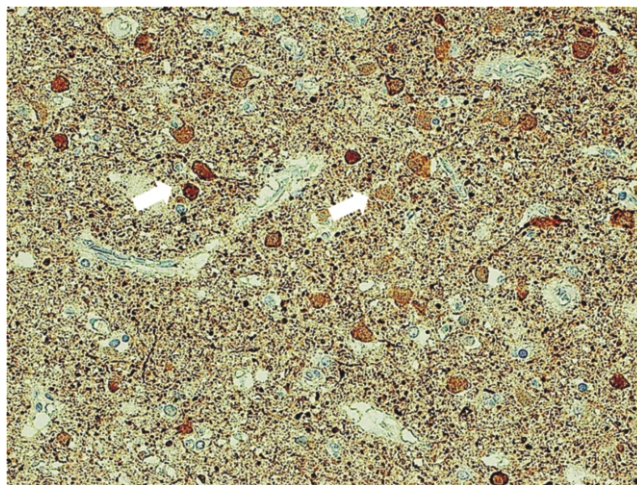


Рис. 3. Неравномерная интенсивность реакции MAP-2 в зоне 2 (указаны стрелочками два нейрона с разной интенсивностью реакции). Реакция MAP-2, увеличение X400.

очагу ишемии, развиваются характерные изменения структуры нейронов и астроцитов (их набухание и отек перивентрикулярного пространства, утрата отростков астроцитов), активируется процесс их апоптоза, наблюдается сокращение расстояния между нейронами и астроцитами. Учитывая это, а также данные литературы, есть основания допускать, что сближение нейронов и астроцитов в обеих указанных зонах мозга при его локальной ишемии является одним из признаков активации, в этих условиях, нейропластических процессов в нем. Нейроны, неспособные к такой перестройке, элиминируются путем апоптоза.

References

1. Floyd., Candace L., and Bruce G. Lyeth. Astroglia: important mediators of traumatic brain injury. *Progress in brain research* 2007; 161: 61-79.
2. Ouyang Y.B., Voloboueva L.A., Xu L.J., Giffard R.G. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *The Journal of neuroscience*. 2007 Apr 18; 27(16): 4253-60.
3. Greve M.W., Zink B.J. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. 2009; 76(2): 97-104.
4. Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain. *European Journal of Biochemistry*. 2000; 267(16): 4912-6.
5. Schousboe A., Waagepetersen H.S. Glial modulation of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Current topics in medicinal chemistry*. 2006; 6(10): 929-34.
6. Miao Y., Qiu Y., Lin Y., Miao Z., Zhang J., Lu X. Protection by pyruvate against glutamate neurotoxicity is mediated by astrocytes through a glutathione-dependent mechanism. *Molecular biology reports*. 2011; 38(5): 3235-42.
7. Chen Y., Swanson R.A. Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2003; 23(2): 137-49.
8. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010; 119(1): 7-35.
9. Dhandapani K.M., Hadman M., De Sevilla L., Waide M.F., Mahesh V.B., Brann D.W. Astrocyte Protection of Neurons role of transforming growth factor- β signaling via a c-jun-ap-1 protective pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(44): 43329-39.
10. Kaur G., Han S.J., Yang I., Crane C. Microglia and central nervous system immunity. *Neurosurgery Clinics of North America*. 2010; 21(1): 43-51.
11. Johnson G.V., Jope R.S. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *Journal of neuroscience research*. 1992; 33(4): 505-12.
12. Yardimoglu M., Ilbay G., Dalcik C., Dalcik H., Ates N. Immunocytochemistry of neuron specific enolase (NSE) in the rat brain after single and repeated epileptic seizures. *International Journal of Neuroscience*. 2009; 118(7): 981-93.
13. Verkhatsky A., Nedergaard M., & Hertz L. Why are astrocytes important? *Neurochemical research*. 2015;40(2): 389-401.
14. Haydon P.G., Nedergaard M. How do astrocytes participate in neural plasticity? *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015; 7(3): a020438.
15. Choudhury G.R., & Ding S. Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiology of disease*. 2016; 85: 234-44.

Сведения об авторах:

Шишкина Людмила Валентиновна, канд. мед. наук, патологоанатомическое отделение, ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, e-mail: lshishkina@nsi.ru

Литвицкий Петр Францевич, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, каф. патофизиологии, ГБОУ ВПО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», e-mail: litvicki@mma.ru

Бреславич Илья Дмитриевич, патологоанатомическое отделение, ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России

Виноградов Евгений Викторович, патологоанатомическое отделение, ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России