

УДК 616.831.31-001.35-005.4-092-092.9

Т.І. Кметь

РАННЯ ТА ВІДСТРОЧЕНА РЕАКЦІЯ КЛІТИН КОРИ СКРОНЕВОЇ ЧАСТКИ ВЕЛИКИХ ПІВКУЛЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ НА ІШЕМІЧНО-РЕПЕРФУЗІЙНЕ ПОШКОДЖЕННЯ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. Встановлено, що після 20-хвилинної каротидної ішемії з одноденною реперфузією достовірно зменшується щільність нервових клітин кори скроневої частки півкуль головного мозку. На 12-ту добу експерименту суттєво зростає щільність і частка клітин кори скроневої частки з ознаками апоптозу за рахунок зниження числа нейронів та, особливо, гліоцитів.

Ішемічно-реперфузійне ураження кори досліджуваної частки головного мозку спричиняє найбільш виражене порушення морфометричних параметрів нервових клітин як у ранньому, так і в пізньому періоді ішемії-реперфузії.

Ключові слова: головний мозок, каротидна ішемія-реперфузія, нейрони, глія, апоптоз.

Вступ. Однією з актуальних проблем медицини є цереброваскулярні захворювання, які посідають друге місце в структурі загальної смертності населення України, причому 70-80 % випадків припадає на гострі порушення мозкового кровообігу за ішемічним типом [4]. Пусковою ланкою ішемічної загибелі клітин кори великих півкуль головного мозку є енергетичний дефіцит, який ініціює глутамат-кальцієвий каскад – вивільнення збуджуючих аміноацетичних нейротрансмітерів – аспартату та глутамату й внутрішньоклітинне накопичення іонів кальцію [7, 11]. Процеси, які починаються в ранні терміни ішемії (зміни метаболізму глутамату та кальцію, оксидативний стрес, гіперпродукція NO), індукують віддалені наслідки ішемії – реакцію геному із включенням генетично-запрограмованих молекулярних механізмів, дисфункцію астроцитарного та мікрогліального пулів, розвиток імунних змін та ініціацію нейроапоптозу [2, 6, 8, 12]. Нейрогліальні взаємовідносини в різних шарах кори великих півкуль зазнають суттєвих змін у постішемічному періоді пошкодження головного мозку [1]. На сьогодні добре вивчені також морфофункціональні зміни в корі фронтальної частки півкуль головного мозку за умов ішемії-реперфузії [3], однак ступінь реагування на дане втручання окремих клітин (нейронів, глії) скроневої частки, а також процеси апоптозу залишаються невивченими.

Мета дослідження. Вивчити в динаміці вплив неповної глобальної ішемії мозку з подальшою реперфузією різної тривалості на показники морфофункціонального стану клітин кори скроневої (слухової) частки великих півкуль мозку щурів.

Матеріал і методи. Дослідження проведені на шестимісячних білих нелінійних щурах-самцях трьох експериментальних груп: 1. Контрольні тварини; 2. Щури, яким моделювали 20-хвилинну двобічну каротидну ішемію з одноденною реперфузією; 3. Щури, яких виводили з експерименту на 12-ту добу після моделювання 20-хвилинної двобічної каротидної ішемії. Експериментальні втручання здійснювали відповідно

до основних положень GLP (1981 р.) Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р.; Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Неповну глобальну ішемію мозку моделювали 20-хвилинним кліпсуванням загальних сонних артерій [5], після чого кровотік по цих судинах відновлювали. Для вивчення ранніх наслідків ішемії-реперфузії мозку частину тварин виводили з експерименту через 1 годину після завершення реперфузійного періоду, а відстрочених – на 12-ту добу. Моделювання каротидної ішемії та декапітацію здійснювали під каліпсоловим наркозом (75 мг/кг маси тіла). Мозок виймали на холоді, користуючись атласом стереотаксичних координат [10], забирали кору скроневої частки півкуль головного мозку, фіксували її в 10 % розчині Буена впродовж 24 годин і після стандартної гістологічної проводки заливали в парафінові блоки, з яких готували гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Зображення кори мозку вивчали в спектрі люмінесценції на флуоресцентному мікроскопі AXIOSKOP (Zeiss, Німеччина) та за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4722 (COHU Inc., США) вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Морфометричний аналіз клітин скроневої частки неокортексу здійснювали в автоматичному режимі за допомогою програми VIDAS-2,5 (Kontron Elektronik, Німеччина) [9]. Визначали наступні характеристики нервових, гліальних та апоптичних клітин: сумарну (кількість клітин на 1 мм² площі зрізу кори мозку) та відносну (%) щільність розподілу окремих класів клітин, їх площу (мкм²), коефіцієнти форми та елонгації.

Цифрові результати експериментальних досліджень опрацьовані на персональному комп'ютері у прикладних програмах «Statistica 6.0» та «SPSS 13». Статистичну значимість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента для незалежних вибірок. Дані представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

Результати дослідження та їх обговорення. Як свідчать дані, представлені в таблицях 1 та 2, 20-хвилинна каротидна ішемія головного мозку з наступною одноденною реперфузією має різнонаправлений вплив на різні класи клітин кори скроневої частки півкуль нової кори. Так, сумарна щільність розташування нервових клітин у ранньому постішемичному періоді вірогідно зменшилася на 9 % стосовно показників у контрольних тварин. Ці зміни в даному терміні спостереження пояснюються тенденцією ($p > 0,05$) до зростання на 22 % щільності апоптичних клітин, що підтверджується вивченням відсоткового співвідношення: відсоткова частка нейроцитів у цей період дослідження достовірно зменшилася на 6 %, проте частка апоптично змінених клітин, навпаки, зросла на 27 % стосовно контрольної групи шурів. Сумарна щільність та відсоткове співвідношення гліоцитів у ранньому постішемичному терміні достовірно не змінилися.

Таким чином, у ранньому ішемічно-реперфузійному періоді апоптичних змін зазнають нервові клітини кори скроневої частки півкуль головного мозку.

У пізньому постішемичному періоді (12-та доба) встановлено, що щільність нейроцитів зменшилася на 36 % стосовно такої в контрольних шурів і на 29 % – стосовно показника в ранньому терміні спостереження. Отже, загибель нервових клітин до даного терміну спостереження наростає. Сумарна щільність гліоцитів у цей термін також зменшилася в однаковій мірі (на 36 %), як стосовно показників у контролі, так і в ранньому постішемичному періоді. Таким чином, у корі скроневої частки загибель нервових клітин за умов ішемії-реперфузії головного мозку випереджає загибель гліальних. При дослідженні апоптичних клітин встановлено, що їх щільність вірогідно зросла в п'ять разів стосовно контролю та в чотири рази – відносно показника в ранньому терміні спостереження. Аналіз відсоткового співвідношення різних класів клітин кори скроневої частки півкуль головного мозку показав достовірне зниження частки нейроцитів на 33 % щодо показників у контролі та на 30 % – стосовно раннього постішемичного періоду. Відсоток гліаль-

них клітин вірогідно зменшився в 1,5 раза відносно контролю та в 1,6 раза – стосовно раннього терміну, а частка апоптичних клітин збільшилася як щодо показників у контролі, так і стосовно раннього терміну (у п'ять та чотири рази відповідно). Це дозволяє дійти висновку, що в пізньому ішемічно-реперфузійному періоді апоптичних змін зазнають нервові та більш суттєво – гліальні клітини. Таким чином, до 12-ї доби постішемичного періоду загибель клітин наростає і до даного терміну спостереження, ймовірно, цей процес не завершується.

У динаміці спостереження співвідношення сумарної щільності та частки нейронів і гліальних клітин має наступний вигляд: контроль – 2,66 та 2,79 відповідно; ранній постішемичний період – 2,45 та 2,5 відповідно; пізній – 2,65 та 2,84 відповідно), що свідчить про більш виражену загибель нейронів у ранньому постішемичному періоді та прогресуючу загибель глії в пізньому терміні ішемії-реперфузії головного мозку.

Аналіз морфометричних параметрів клітин кори скроневої частки півкуль головного мозку в ранньому постішемичному періоді показав, що площа нейроцитів вірогідно зменшилася на 10 % відносно показників у контрольних тварин, тоді як за даним показником гліальні та апоптичні клітини змін не зазнали.

У пізньому ішемічно-реперфузійному періоді (12-та доба) площа нейронів зменшилася на 23 % стосовно такої в контрольних шурів і на 15 % – стосовно показника в ранньому терміні спостереження. Досліджуваний показник апоптично змінених клітин, навпаки, вірогідно зріс на 20 % стосовно контролю і на 26 % – стосовно показника в ранньому терміні спостереження. Площа гліальних клітин даного відділу кори достовірних змін не зазнала.

В умовах раннього ішемічно-реперфузійного пошкодження кори скроневої частки півкуль головного мозку виявлено лише вірогідне зниження коефіцієнта елонгації нейроцитів на 4 % стосовно контрольної групи тварин.

У пізньому періоді ішемічно-реперфузійного ураження мозку коефіцієнти форми нервових та гліальних клітин вірогідно зменшилися на 4 % та

Таблиця 1

Щільність різних класів клітин у корі скроневої частки півкуль шурів з ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (на 1 мм²) (M±m)

Група спостереження	Класи клітин		
	Нервові	Гліальні	Апоптично змінені
Контроль	<u>900,83±12,48</u> 67,90±0,75	<u>338,88±11,80</u> 24,33±0,72	<u>106,48±6,97</u> 7,76±0,50
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	<u>821,43±16,60*</u> 64,36±1,06*	<u>334,99±12,35</u> 25,75±0,88	<u>129,87±9,07</u> 9,89±0,67*
Ішемія-реперфузія (12 діб)	<u>580,01±26,98*^</u> 45,54±2,16*^	<u>218,73±14,12*^</u> 16,03±0,91*^	<u>533,31±33,64*^</u> 38,43±2,16*^

Примітка. У чисельнику – сумарна щільність різних класів клітин на 1 мм² кори скроневої частки; у знаменнику – відсоток різних класів клітин; вірогідність різниці порівняно з: * – контролем; ^ – ішемією-реперфузією (20 хв/1 год)

Таблиця 2

Морфометричні параметри різних класів клітин кори скроневої частки півкуль шурів з ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M±m)

Група спостереження	Площа, мкм ²	Коефіцієнт форми	Коефіцієнт елонгації
Нервові клітини			
Контроль	102,14±1,40	0,781±0,002	0,695±0,003
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	92,07±1,33 p ₁ <0,01	0,776±0,003	0,666±0,003 p ₁ <0,001
Ішемія-реперфузія (12 діб)	78,45±2,01 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	0,747±0,007 p ₁ <0,01 p ₂ <0,01	0,721±0,005 p ₁ <0,01 p ₂ <0,001
Гліальні клітини			
Контроль	19,07±0,17	0,719±0,006	0,669±0,006
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	19,19±0,20	0,719±0,006	0,667±0,006
Ішемія-реперфузія (12 діб)	19,05±0,34	0,63±0,01 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001	0,63±0,01 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
Апоптичні клітини			
Контроль	32,10±1,75	0,704±0,008	0,59±0,01
Ішемія-реперфузія (20 хв / 1 год)	30,65±1,65	0,71±0,01	0,60±0,01
Ішемія-реперфузія (12 діб)	38,52±0,86 p ₁ <0,05 p ₂ <0,01	0,704±0,005	0,610±0,005

Примітка. – вірогідність різниці порівняно з: p₁ – контролем (p<0,05, p<0,01, p<0,001); p₂ – ішемією-реперфузією (20 хв/1 год) у контрольних тварин (p<0,05, p<0,01, p<0,001)

12 % відповідно щодо контролю та стосовно раннього терміну спостереження. На 12-ту добу ішемії-реперфузії головного мозку коефіцієнт елонгації нейронів вірогідно зріс на 4 % стосовно показника в контрольній групі шурів і на 8 % – стосовно раннього терміну спостереження. Даний показник гліальних клітин, навпаки, вірогідно зменшився на 6 % відносно контролю та стосовно раннього терміну.

Висновки

1. У ранньому ішемічно-реперфузійному періоді пошкодження головного мозку зменшується щільність розташування нервових клітин кори скроневої частки.

2. На 12-ту добу ішемічно-реперфузійного періоду щільність і частка клітин з ознаками апоптозу в корі скроневої частки зростає за рахунок зниження числа нейронів та, особливо, гліоцитів.

3. Ішемічно-реперфузійне ураження кори скроневої частки головного мозку спричиняє найбільш виражене порушення морфометричних параметрів нервових клітин як у ранньому, так і в пізньому періоді спостереження.

Перспективи подальших досліджень. Результати свідчать про перспективність дослідження ранніх та відстрочених змін морфофункціонального стану клітин кори скроневої частки великих півкуль головного мозку шурів за умов

поєднаної дії цукрового діабету та ішемії-реперфузії.

Література

- Актуальные проблемы изучения нейроглиальных взаимоотношений коры большого мозга человека в постшемическом периоде / А.В. Мьчик, С.С. Степанов, П.М. Ларионов [и др.] // Сиб. мед. ж. – 2012. – № 6. – С. 48-51.
- Галиця В.В. Вплив бензилового естеру 2-(3,4-дигідро-3-оксо-2Н-[1,2,4]-триазино[4,3-С]хіназолін-4-іл)-оцтової кислоти на морфофункціональні показники нейронів сенсомоторної зони кори в шурів із внутрішньомозковим крововиливом / В. В. Галиця // Вісн. Запоріз. нац. ун-ту. – 2008. – № 2. – С. 28-33.
- Кметь Т.І. Реакція клітин кори лобової частки великих півкуль головного мозку шурів на ішемічно-реперфузійне пошкодження / Т.І. Кметь // Бук. мед. вісник. – 2013. – Т. 17, № 4 (68). – С. 70-73.
- Зозуля І.С. Сучасний стан проблеми діагностики, перебігу, лікування гострих порушень мозкового кровообігу в поліклінічних умовах / І.С. Зозуля, Г.І. Лисенко, І.О. Латоха // Укр. мед. часопис. – 2011. – Т. 11-12, № 6. – С. 30-38.
- Скибо Г.Г. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга / Г.Г. Скибо // Патология. – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 22-30.
- Guo Z.H. The mechanisms of brain ischemic insult and potential protective interventions / Z.H. Guo, F.Li, W.Z. Wang // Neurosci Bull. – 2009. – Vol. 25, № 3. – P. 139-152
- Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective / L. Hertz // Neuropharmacology. – 2008. – № 55, № 3. – P. 289-309.

**РАННЯЯ И ОТСРОЧЕННАЯ РЕАКЦИЯ КЛЕТОК КОРЫ ВИСОЧНОЙ ДОЛИ
БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС НА ИШЕМИЧЕСКИ-
РЕПЕРФУЗИОННОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ**

Т.И. Кметь

Резюме. Установлено, что после 20-минутной каротидной ишемии с одночасовой реперфузией достоверно уменьшается плотность нервных клеток коры височной доли полушарий головного мозга. На 12-е сутки эксперимента существенно возрастает плотность и доля клеток коры височной доли с признаками апоптоза за счет снижения числа нейронов и, особенно, глиоцитов. Ишемически-реперфузионное повреждение коры исследуемой доли головного мозга вызывает наиболее выраженное нарушение морфометрических параметров нервных клеток как в раннем, так и в позднем периоде ишемии-реперфузии.

Ключевые слова: головной мозг, каротидная ишемия-реперфузия, нейроны, глия, апоптоз.

**EARLY AND DELAYED REACTION OF TEMPORAL LOBE CELLS OF RATS'
CEREBRAL HEMISPHERE TO ISCHEMIA-REPERFUSION LESION**

T.I. Kmet

Abstract. It has been established that brain cell density is significantly reduced in the temporal lobe after a 20-minute carotid ischemia and one-hour reperfusion. Density and fraction of carotid cells of the temporal lobe with signs of apoptosis increase significantly on the 12th day of the study, due to reducing the number of neurons and especially glial cells. Ischemia-reperfusion lesion of the cerebral cortex in the investigated lobe leads to the most expressed disorders of neuron's morphometric parameters both in the early and late period of ischemia-reperfusion.

Key words: brain, carotid ischemia-reperfusion, neurons, glia, apoptosis.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Ю.Є. Роговий

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 2 (70). – P. 41-44

Надійшла до редакції 29.01.2014 року