

**ДИНАМІКА СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН КОРИ ВЕЛИКОГО
МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ****ННЦ «Інститут біології», КНУ ім. Тараса Шевченка (м. Київ)***** НМУ ім. О. О. Богомольця (м. Київ)**

Дослідження виконано як фрагмент комплексної науково-дослідної роботи кафедри гістології та ембріології НМУ ім. О. О. Богомольця «Органи нервової, імунної та сечостатевої системи в умовах експериментального пошкодження», № державної реєстрації 0112U001413.

Вступ. Інсульт – одне з найпоширеніших захворювань у людей середнього і літнього віку. Рівень смертності в економічно розвинених державах від порушень мозкового кровообігу посідає 3 місце, поступаючи лише онкологічним та кардіоваскулярним захворюванням. Кількість ішемічних інсультів за останні 10 років і в Україні постійно зростала, збільшившись в 1,5 рази [3]. Значна кількість пацієнтів після інсульту залишаються інвалідами, а у 25-30% спостерігаються важкі прояви неврологічного дефіциту [1,6]. Летальність хворих, які перенесли гострий ішемічний інсульт впродовж першого місяця захворювання, складає від 20 до 40%. Повторний інсульт у цієї категорії осіб протягом першого року (після первинного) розвивається лише у 2% пацієнтів, але в наступні 5 років зростає до 25-30%, причому більшість хворих (60-70%) залишаються інвалідами [2,4].

Таким чином, вивчення гострої недостатності мозкового кровообігу (ГМК) різної етіології, і, особливо, динаміки її розвитку є надзвичайно актуальною проблемою. За останні два десятиліття суттєво зросла кількість нових даних присвячених вивченню цереброваскулярної патології. В той же час дослідження, спрямовані на вивчення структурно-функціональних основ діяльності окремих клітинних утворень мозку в динаміці, представлені поодинокими працями [2].

Мета дослідження полягала у вивченні структурних порушень, що розвиваються в цереброкортексі щурів на різних етапах відтворення геморагічного інсульту [ГІ].

Об'єкт і методи дослідження. Досліді проведено на 80 щурах-самках (середня маса $214,1 \pm 10,2$ г), що були розділені на 6 груп. Першу групу склали інтактні тварини ($n=10$), другу псевдооперованих ($n=10$), наступні чотири тварини із інсультом із різним терміном розвитку патології (1, 3, 7 і 15 днів після інсульту) ($n=60$). Утримання тварин

та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Псевдооперованим тваринам здійснювали операційний доступ до мозкового черепа через отвір в правій тім'яній кістці щурів відповідно до діаметру канюлі. Проте на відміну від оперованих тварин не здійснювали введення канюлі із мандреном у тканину мозку. Рану зашивали наглухо поліамідними нитками 2 USP (Олімп, Україна) і обробляли 5% спиртовим розчином йоду.

Модель гострого ГІ полягала у відтворенні локальної посттравматичної гематоми в ділянці внутрішньої капсули (capsula interna, CI) правої півкулі головного мозку щурів [5].

Моделювання інтрацеребральної гематоми аутокров'ю у наркотизованих тварин (1% розчин тіопентал-натрію, 60 мг/кг, внутрішньочеревино) здійснювали в результаті механічного руйнування тканини CI (capsula interna dextra, $L=3,5-4,0$; $H=6,0$; $AP=0,6-1,0$) [9]. В ділянку CI за допомогою стереотаксичного приладу (СТМ-3, Росія) вводився підготовлений мандрен-ніж, а безпосередній процес моделювання здійснювався 4-6 обертовими рухами відхиленого мандрена-ножа із наступним введенням в зону деструкції 0,15-0,2 мл аутокрові тварин. Після проведення оперативного втручання і комплексу послідовних інсультів модулюючих маніпуляцій рану в ділянці мозкового черепа зашивали наглухо поліамідними нитками 2 USP (Олімп, Україна), цю ділянку обробляли 5% спиртовим розчином йоду [4].

Через 1, 3, 7 і 15 днів після моделювання локального гострого ГІ в ділянці CI дослідним щурам вводили летальну дозу тіопентал-натрію (1% розчин, 200 мг/кг внутрішньочеревино) і здійснювали забір тканини головного мозку для подальшого гістологічного дослідження. Після виконання стандартних підготовчих методик отримували зрізи головного мозку товщиною 10 мкм, що фарбувались стандартними розчинами гематоксиліну та еозину. Морфометричні дослідження проводили із використанням

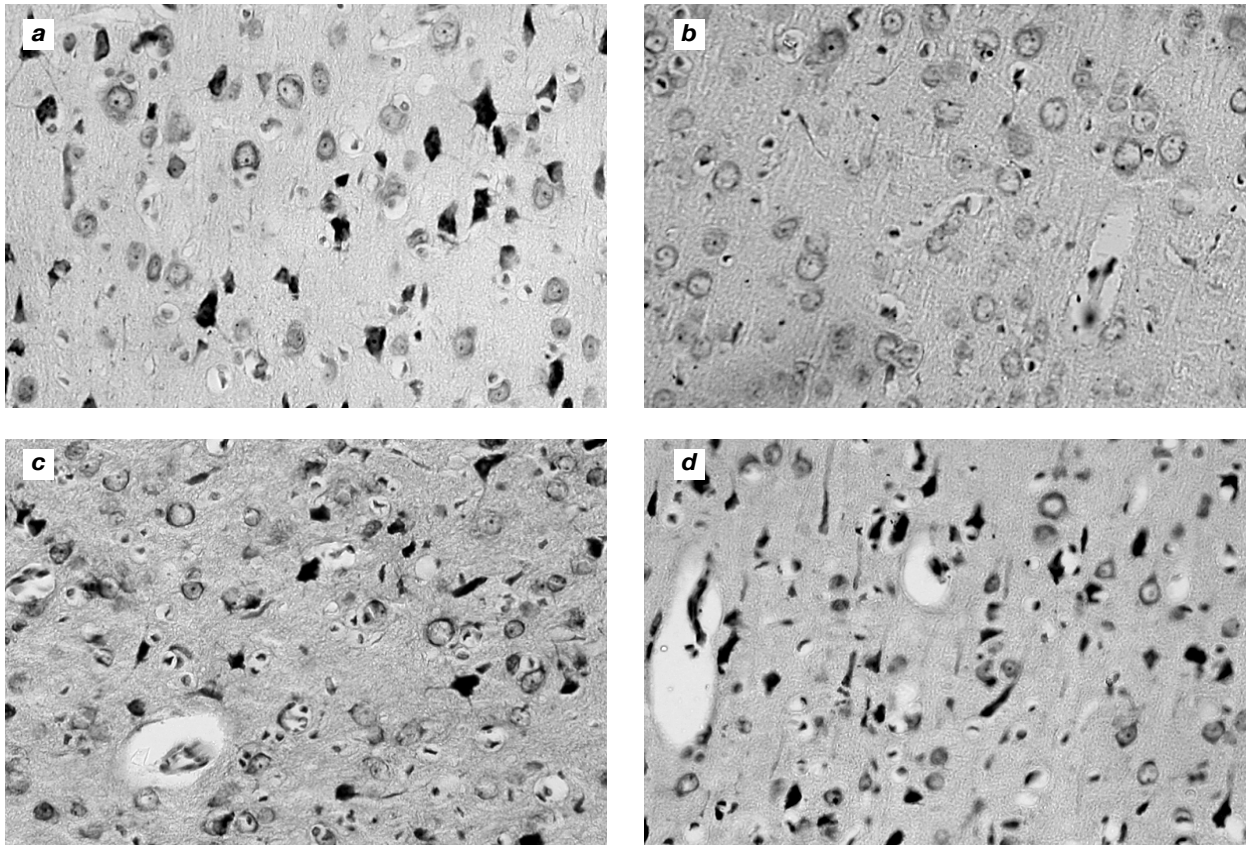


Рис. Сенсомоторний цереброкортес щурів при моделюванні гострого ГІ: а – 1 доба після інсульту, б – 3 доба, с – 7 доба, d – 15 доба; (забарвлення за Ніслем, Об. 40, ок. 12). Збільшення нейродегенерації та набряку тканини мозку впродовж експерименту.

мікроскопу Olympus BX51 (Японія). Кількісний аналіз структурних змін, що відбуваються в сенсомоторному цереброкортесі головного мозку щурів полягав у вимірюванні середньої площі ядер, тіл нейронів, загальної кількості нейронів на одиницю площі (1мм²) та кількість загинувших нейронів. Достовірність різниці між різними групами тварин оцінювали із використанням t-критерію Стюдента та Вілкоксона, у програмах MS Excel 2007 та Statistica 6. 0. Достовірними вважались такі результати, що за рівнем значимості дорівнювали або були більше 95% ($P < 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення. Після проведеного експерименту було досліджено фронтальні зрізи головного мозку щурів із застосуванням сучасних гістологічних та статистичних методів. Згідно загальноприйнятого уявлення [1, 8] інсульт називають гостре порушення мозкового кровообігу, що триває більше 24 год. і супроводжується неврологічною симптоматикою. При цьому в головному мозку розвиваються значні структурні порушення у вигляді інфаркту мозку, крововиливу тканину мозку, шлуночки, або субарахноїдальний простір [3,4,6,9]. В ході нашого експериментального дослідження при вивченні фронтальних зрізів головного мозку дослідних щурів було виявлено оформлену інтрацеребральну гематому в ділянці правої СІ згідно стереотаксичних координат. Проникнення крові в бічні шлуночки не відмічено. При детальному

морфологічному вивченні ділянок сенсомоторної кори великих півкуль головного мозку виявлено значні порушення, особливо, в ділянці локалізації гематоми. В тканині навколо інтрацеребральної гематоми спостерігалась картина формування гліального рубця (виражений гліоз), відзначалась значна інфільтрація ділянки моделювання ГІ лейкоцитами.

На гістологічних препаратах фронтальних зрізів головного мозку інсультних тварин через 1 день після моделювання інтрацеребральної гематоми спостерігається поліморфний характер змін нейронів: гідропс одних і пікноз інших нейронів (рис.). Зустрічаються окремі зморщені гіперхромні нейрони із деформованими нейритами. Відзначаються ознаки набухання і значний перинейритний набряк.

У пірамідних нейронах чітко виражені явища центрального і периферичного тигролізу. Ядра пірамідних нейронів відрізняються між нейронами, в одних клітинах реєструється набряк та гіпертрофія ядра, а в інших – деформація, зморщування і, навіть де-струкції ядер.

Морфометричне дослідження структурних змін пірамідних нейронів V шару сенсомоторного неокортексту показало достовірне збільшення середньої площі нейронів та ядер в обох дослідних півкулях головного мозку. Середня площа нейронів в іпсилатеральній та контралатеральній півкулі склала відповідно $322,6 \pm 11,1$ мкм² і $310,6 \pm 9,4$ мкм², тобто на

Таблиця 1

Динаміка нейродегенеративного процесу кори великого мозку

№	Група	Іпсілатеральна півкуля		Контралатеральна півкуля	
		Загальна кількість нейронів, мм ²	Кількість загиблх нейронів, %	Загальна кількість нейронів, мм ²	Кількість загиблх нейронів, %
1	Інтактні	693,5±10,6	1,8±0,1	693,5±10,6	1,8±0,1
2	Псевдо-оперовані	654,8±5,0 a	5,0±0,2 a	686,4±9,7	2,7±0,1 a
3	ГІ, 1 день	657,9±4,1 a	9,0±0,5 a,b	656,1±6,4 a,b	6,4±0,3 a,b
4	ГІ, 3 день	633,1±3,5 a,b,c	6,8±0,3 a,b	638,0±3,3 a,b,c	5,7±0,1 a,b
5	ГІ, 7 день	603,9±4,2 a,b,c	10,9±0,4 a,b,c	611,1±2,5 a,b,c	7,8±0,2 a,b
6	ГІ, 15 день	582,3±5,9 a,b,c	7,5±0,3 a	608,6±3,6 a,b	4,7±0,2 a,b,c

Примітка: а – достовірно по відношенню до інтактних тварин ($p < 0,05$); b – достовірно по відношенню до псевдооперованих тварин ($p < 0,05$); c – достовірно по відношенню до попереднього періоду інсульту ($p < 0,05$).

більше 10-13%. Відповідно до цього середня площа ядер нейронів склала $200,2 \pm 8,0$ мкм² і $176,0 \pm 7,4$ мкм², тобто збільшилась на 15% і 30%. Середня кількість нейронів в іпсілатеральній півкулі становить $657,9 \pm 4,1$ клітин/мм², а в контралатеральній – $656,1 \pm 6,4$ клітин/мм², що достовірно менше в середньому на 5% в порівнянні із інтактними тваринами (табл. 1).

Через 3 доби після моделювання геморагічного інсульту ступінь розвитку ішемічного ушкодження клітинних утворень головного мозку тварин був значно більшим. Кількість загиблх, ішемізованих та набряклих нейронів суттєво зросла. Навколо нейронів відзначається виражений перицелюлярний набряк. Ядра пірамідних нейронів часто характеризуються ектопічним розташуванням ядерця, а у деяких зовсім відсутні. Присутні групи гліальних клітин з гіперхроматозом ядер. Кількість цих клітин навколо нейронів візуально збільшилась, що вказує на розвиток гліозу. Середня площа нейронів в іпсілатеральній та контралатеральній півкулі склала відповідно $355,3 \pm 14,2$ мкм² і $353,2 \pm 11,4$ мкм², тобто більше на 10-13% в порівнянні із 1-денний періодом дослідження. Середня кількість нейронів в достовірно зменшилась на 4-6%.

У неокортексі дослідних щурів через 7 днів після моделювання геморагічного інсульту відмічено гострий набряк тканини мозку, збільшення кількості дегенерованих нейронів, що вказує на загострення патологічного процесу впродовж періоду дослідження.

У інсультній півкулі (іпсілатеральній) більшість нейронів знаходяться в стані гострого набряку, набухання тіл і ядер клітин (рис.). Реєструється значна кількість нейронів з деформованими ядрами і з ознаками деструкції (аутолізу). Відзначається гострий перицелюлярний набряк, особливо навколо апікальних і базальних дендритів. Спостерігаються також периваскулярні набряки із стазом формених елементів в кровоносних капілярах.

Гліальні клітини також характеризуються значними структурними змінами. В корі великих півкуль спостерігається значна кількість гліоцитів із пікнозом ядер. Навколо клітин також спостерігається перицелюлярний набряк. У деяких тварин гострий набряк тканини кори мозку надає нервовій тканині губчастої морфології. Середня площа нейронів в іпсілатеральній та контралатеральній півкулі склала відповідно $433,6 \pm 16,0$ мкм² і $397,0 \pm 10,6$ мкм², тобто більше на 20% і 12% в порівнянні із 3-денний періодом дослідження. При цьому площа ядер пірамідних нейронів достовірно збільшилась на 12% і 20% в залежності від локалізації гематоми. Середня кількість нейронів в іпсілатеральній півкулі зменшилась до $603,9 \pm 4,2$ клітин/мм², а в контралатеральній – $611,1 \pm 2,5$ клітин/мм², що достовірно менше від попереднього терміну дослідження в середньому на 5%.

Через 15 днів після моделювання ГІ в іпсілатеральній півкулі відзначається значна кількість дегенерованих нейронів, а в деяких ділянках неокортексу зустрічаються ділянки некрозу тканини мозку. Морфологічно більшість пірамідних нейронів та гліальних клітин перебувають в стані пікнозу, що свідчить про значні функціональні порушення в іпсілатеральній півкулі. В контралатеральній півкулі порушення мали дещо інший характер: нервові клітини мали гіпертрофований набряклий вигляд, зустрічаються окремі клітини з ознаками аутолізу. Спостерігається гострий перицелюлярний набряк та периваскулярний набряк, ангіонекроз. Результати морфометричного дослідження пірамідних нейронів V шару сенсомоторного неокортексу через 15 днів після ГІ підтверджують морфологічні ознаки гострого набряку тканини мозку. Середня площа нейронів в іпсілатеральній та контралатеральній півкулі склала відповідно $379,8 \pm 13,1$ мкм² і $343,8 \pm 14,5$ мкм², що дещо менше в порівнянні із 7-денним терміном спостереження (табл. 2).

Таблиця 2

Зміни морфометричних параметрів нейронів V шару кори великого мозку

№	Група	Іпсілатеральна півкуля		Контралатеральна півкуля	
		Площа нейрона	Площа ядра	Площа нейрона	Площа ядра
1	Інтактні	284,1±8,0	153,5±5,9	284,1±8,0	153,5±5,9
2	Псевдо-оперовані	296,3±8,5	197,1±7,1 а	292,2±9,7	180,2±6,5 а
3	ГІ, 1 день	322,6±11,1 а,б	200,2±8,0 а	310,6±9,4 а,б	176,0±7,4 а
4	ГІ, 3 день	355,3±14,2 а,б,с	205,9±9,9 а	353,2±11,4 а,б,с	163,2±10,0 б
5	ГІ, 7 день	433,6±16,0 а,б,с	225,0±10,0 а,б,с	397,0±10,6 а,б,с	204,3±7,7 а,б,с
6	ГІ, 15 день	379,8±13,1 а,б,с	210,0±12,4 а	343,8±14,5 а,б,с	163,8±7,9 б,с

Примітка: а – достовірно по відношенню до інтактних тварин ($p < 0,05$); б – достовірно по відношенню до псевдооперованих тварин ($p < 0,05$); с – достовірно по відношенню до попереднього періоду інсульту ($p < 0,05$).

Зменшення цього параметру можна пояснити тим, що на 15 день відбулась повна деструкція великих нейронів і в статистичну вибірку нами обрані всі інші нейрони. Загибель нейронів суттєво відобразилась на показнику щільності клітин в неокортексі. Зокрема, середня кількість нейронів в іпсілатеральній півкулі становить $582,3 \pm 5,9$ клітин/мм², а в контралатеральній – $608,6 \pm 3,6$ клітин/мм², тобто достовірно менше в іпсілатеральній півкулі на 5% в порівнянні із попереднім терміном дослідження.

Висновки. Таким чином, проведене дослідження показало, що в перші 3 доби розвитку експериментального ГІ відбуваються початкові процеси (ініціальні) патологічного процесу, що з 7 по 15 добу вже є необоротними і спричиняють значну загибель нервових клітин та набряку тканини мозку.

Окрему увагу слід звернути на порушення в контралатеральній півкулі, оскільки в роботах інших

дослідників [2,4,7] цим порушенням не приділяють достатньої уваги. В нашому експериментальному дослідженні встановлено суттєві морфологічні зміни в контралатеральній півкулі, що характеризуються гідропічним ураженням нейронів, загибеллю та набряком тканини мозку і одночасною активацією пірамідних нейронів. Ці зміни свідчать про генералізований характер патологічного процесу при інсульті і компенсаторній активації контралатеральної півкулі головного мозку, внаслідок гострого порушення мозкового кровообігу, і є надзвичайно важливим для розуміння патогенезу даної патології.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження в цьому напрямку полягають з детальним аналізі факторів ризику первинного і повторного інсультів, що допоможе у вирішенні питань прогнозування наступних епізодів патології і поліпшенні результатів вторинної профілактики.

Література

1. Виленский Б. С. Инсульт / Борис Сергеевич Виленский. – С. -Пб. : Мед. информ. агенство, 1995. – 288 с.
2. Виленский Б. С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение. 2-е изд., доп. / Борис Сергеевич Виленский. – С. -Пб. : Фолиант, 2002. – 397 с.
3. Зозуля А. І. Лікування оклюзивно-стенотичних процесів внутрішньої сонної артерії / Андрій Іванович Зозуля // Збірник наукових праць співробітників КМАПО ім. П. Л. Шупика. – 2004. – Кн. 1, Вип. 13. – С. 194–197
4. Крайнева В. А. Нейропротективные свойства фобазола при повторном моделировании геморрагического инсульта у старых крыс / В. А. Крайнева, С. Б. Середенин // БЭБиМ. – 2010. – Т. 149(2). – С. 165–168.
5. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных / [Макаренко А. Н., Косицын Н. С., Пасикова Н. В., Свинов М. М.] // ЖВНД. – 2002. – Т. 52(6). – С. 765–768.
6. Внутрішньошлуночкові крововиливи в структурі геморагічних інсультів / [Поліщук М. Є., Данацко В. В., Зозуля І. С. та ін.] // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2002. – Вип. 1 (40). – С. 69–74.
7. Ромоданов А. П. Мозговой геморрагический инсульт / А. П. Ромоданов, Г. А. Педаченко. – К. : Здоров'я, 1971. – 228 с.
8. NAP, a Femtomolar-Acting Peptide, Protects the Brain Against Ischemic Injury by Reducing Apoptotic Death / [Leker R. R., Teichner A., Grigoriadis N. et al.] // Stroke. – 2002. – Vol. 33(4). – P. 1085–1092.
9. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed. / Paxinos G., Watson C. – Acad. Press : SanDiego, 1986. – 920 p.

УДК 616. 831. -005. 1-085: 615. 361

ДИНАМІКА СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН КОРИ ВЕЛИКОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Ефремова В. А., Савосько С. І., Макаренко О. М.

Резюме. Досліджено особливості патологічних змін в корі головного мозку щурів на різних етапах розвитку експериментального геморагічного інсульту. Аналіз морфологічних та статистичних даних показав, що розвиток гострого набряку тканини мозку реєструється на 3 добу, а з 7 по 15 день розвиваються некротичні процеси в корі мозку. На 15 день експерименту середня кількість нейронів в контралатеральній корі мозку зменшилась на 12%, а в іпсилатеральній на 16%.

Ключові слова: геморагічний інсульт, нейродегенерація, набряк мозку.

УДК 616. 831. -005. 1-085: 615. 361

ДИНАМИКА СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГЕМОРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Ефремова В. А., Савосько С. И., Макаренко А. Н.

Резюме. Исследованы особенности патологических изменений в коре головного мозга крыс на разных этапах развития экспериментального геморрагического инсульта. Анализ морфологических и статистических данных показал, что развитие острого отека ткани мозга регистрируется на 3 сутки, а с 7 по 15 день развиваются некротические процессы в коре головного мозга. На 15 день эксперимента среднее количество нейронов в контралатеральной коре мозга уменьшилась на 12%, а в ипсилатеральной на 16%.

Ключевые слова: геморрагический инсульт, нейродегенерации, отек мозга.

UDC 616. 831. -005. 1-085: 615. 361

Dynamics of Structural Changes that Develop in Rats Cerebral cortex under Hemorrhagic Stroke Modeling

Iefremova V. A., Savosko S. I., Makarenko A. N.

Summary. The aim of the study was structural changes that develop in rats cerebral cortex at different stages of hemorrhagic stroke modeling.

Experiments conducted on rats, 80 females (average weight $214,1 \pm 10,2$ g), which were divided into 6 groups. The first group consisted of intact animals ($n = 10$), the second pseudooperated ($n = 10$), the rest four groups were rats at different stages of hemorrhagic stroke modeling. Pseudooperated animals exercised operational access to the brain and the skull hole in the right parietal bone of rats according to the diameter of the cannula. However, unlike the operated animals, they did not commit the introduction of the cannula with mandren-knife in brain tissue.

Modeling of intracerebral hematoma with autoblood in anesthetized animals (1% solution of thiopental sodium, 60 mg/kg, ip) was performed by mechanical tissue destruction of the CI [9]. In the zone of the CI with using stereotaxic instrument (STM-3, Russia) and prepared mandren-knife was carried out 4-6 rotating movements declined mandren-knife and following injection into the zone of destruction 0. 15-0. 2 ml of animal's autoblood.

After 1, 3, 7 and 15 days after hemorrhagic stroke modeling in the area of CI rats carried out by sampling the brain for subsequent histological examination.

Morphometric studies consisted in measuring the average area of nuclei bodies of neurons, the total number of neurons per unit area (1mm^2) and the number of dead neurons. Comparing the morphological changes in the cerebral hemispheres of rats 7 days after hemorrhagic stroke modeling should emphasize on the acute necrotic processes in ipsilateral hemisphere, while in the contralateral hemisphere, these processes are less observed. The average area of neurons in the contralateral and ipsilateral hemisphere amounted to $317,4 \pm 7,9$ mkm^2 and $341,1 \pm 13,6$ mkm^2 , that is significantly more than in intact animals and pseudooperated. The average number of neurons in ipsilateral hemisphere decreased to $608,9 \pm 3,1$ cells/ mm^2 , and contralateral – $622,6 \pm 2,4$ cells/ mm^2 .

After 15 days of hemorrhagic stroke modeling morphological changes in the cerebral cortex of rats characterized by exacerbation of nervous tissue edema and death of nerve cells. During this period, a significant difference between ipsi- and contralateral hemispheres was not observed. In both hemispheres of the brain recorded significant edema swelling and a large number of degenerated cells. Nerve cells have hypertrophied swollen appearance; there are a significant number of cells with signs of autolysis and degradation of neurite. The average area of neurons in the contralateral and ipsilateral hemisphere amounted to $379,8 \pm 13,1$ mkm^2 and $343,8 \pm 14,5$ mkm^2 . The death of neurons significantly reflected in terms of density of cells in the neocortex. In particular, the average number of neurons in the ipsilateral hemisphere was $582,3 \pm 5,9$ cells/ mm^2 , and contralateral – $608,6 \pm 3,6$ cells/ mm^2 that is significantly less than in 7 days after modeling and group of animals with ischemic stroke.

Study showed that special attention should be paid to irregularities in the contralateral hemisphere, as in the works of other such violations do not pay enough attention. In our research, we found out significant morphological changes in contraateral hemisphere, characterized damage of neurons, loss and swelling of brain tissue and the simultaneous activation of pyramidal neurons.

Key words: hemorrhagic stroke, swelling of brain tissue, neurodegenerative processes.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 28. 04. 2013 р.