

УДК 612.822

© В.А. Єфремова, Н.В. Скрипник, О.М. Макаренко, 2012.

## СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНІ ПОРУШЕННЯ В ЦЕРЕБРОКОРТЕКСІ ССАВЦІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ГОСТРОЇ ТА ХРОНІЧНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ (ГЕМОРАГІЧНИЙ ВАРІАНТ)

**В.А. Єфремова, Н.В. Скрипник, О.М. Макаренко**

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології», кафедра цитології, гістології та біології розвитку, м. Київ.*

### STRUCTURAL AND MORPHOLOGICAL DISORDERS IN MAMMALIANS CEREBRAL CORTEX IN MODELING OF ACUTE AND CHRONIC CEREBRAL CIRCULATORY DISEASE (HEMORRHAGIC VERSION)

V.A. Efremova, N.V. Skrypnik, O.M. Makarenko

#### SUMMARY

Investigated morphological changes of pyramidal neurons and glial cells of cerebral cortex under acute and chronic cerebral circulatory disease in acute haemorrhagic stroke modelling with trofinotropin "Cerebral" treatment in acute period of stroke.

### СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧЕСКІЕ НАРУШЕНИЯ В ЦЕРЕБРОКОРТЕКСЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ (ГЕМОРАГИЧЕСКИЙ ВАРИАНТ)

В.А. Ефремова, Н.В. Скрипник, О.М. Макаренко

#### РЕЗЮМЕ

Исследовано морфологические изменения пирамидных нейронов и глиальных клеток III и V слоев цереброкортекса коры больших полушарий мозга при острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения в условиях моделирования острого геморрагического инсульта на фоне применения в остром периоде трофинотропина «Церебрала».

**Ключові слова:** геморагічний інсульт, трофінотропін, пірамідні нейрони, гліальні клітини.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я на сьогоднішній день у світі близько 9 млн людей страждають цереброваскулярними захворюваннями, основне місце серед яких займають інсульти. Геморагічний інсульт (ГІ, внутрішньочерепні геморагії, що виникають внаслідок набутих змін і (або) пороків розвитку кровоносних судин), в свою чергу, є однією з найбільш тяжких форм цереброваскулярної патології, яка супроводжується високою інвалідизацією та летальністю. Це і зумовлює гостру необхідність пошуку нових підходів до терапії цереброваскулярних патологій, в цілому, та ГІ, зокрема.

Одним із перспективних шляхів підвищення ефективності терапії багатьох захворювань ЦНС та цереброваскулярних патологій є введення в комплексні схеми лікування різних модифікаторів біохімічних реакцій, що мають пептидну природу (цитокінів, хемокінів тощо). Модифікатори такого типу відіграють важливу роль у механізмах виживання нейронів у разі ішемії, травми, розвитку нейродегенеративних захворювань й клітинної смерті. Одними з таких перспективних модифікаторів є група ендогенно-терапевтичних факторів, що продукуються клітинами мозку в постінсультному (посттравматичному) періоді - трофінотропіни чи нейротрофінотропні регуляторні чинники. Представником цієї групи модифікаторів є

трофінотропін «Церебрал» - полікомпонентний екстракт водорозчинних молекул, одержаних із тканини мозку тварин, що успішно перенесли ГІ. У ряді досліджень було показано, що даний препарат збільшує синтез і секрецію фактору росту нейронів в умовах експериментальної патології, не впливаючи на процеси у інтактних тварин, що свідчить про його нейроактивувальний ефект у гострому періоді ГІ [2, 3, 5]. Однак, і на сьогоднішній день залишається нез'ясованим до кінця вплив даного засобу на пірамідні нейрони та клітини глії у віддаленому періоді експериментальної геморагії.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі використана стандартизована модель експериментальної інтрацеребральної геморагії (інсульту), близька до гострого порушення мозкового кровообігу у людини за об'ємом та ступенем ураження ділянок мозку з локалізацією в області внутрішньої капсули і мінімальним пошкодженням неокортексу та інших відділів мозку. Певне обмежене пошкодження структур мозку досягається за допомогою локального механічного руйнування тканини мозку і кровоносних судин чотирма-шістьма обертальними рухами вигнутого мандрена-ножа, введеного у внутрішню капсулу. В результаті відбувається деструкція мозкової тканини з наступним крововиливом із пошкоджених

мандреном-ножом судин з локалізацією ГІ в області внутрішньої капсули [4, 6].

Дослідження складалося із 2 основних етапів: гострого (1-10 день відтворення експериментальної геморагії) та відтермінованого (7 місяців після моделювання гострого ГІ). Досліди були проведені на 24 статевозрілих кішках (13 самцях і 9 самках) вагою 1,9-3,3 кг, у яких в умовах тіопентал-натрієвого наркозу (60 мг/кг, внутрішньоочередово) моделювали гострий аутогеморагічний інсульт у внутрішній капсулі. Маніпуляції з тваринами та їхнє утримання здійснювалось згідно міжнародних правил [7].

Тварин було розділено на три групи: «контроль» (інтактні тварини), «інсульт» (моделювання гострого ГІ) та «інсульт+«Церебрал» (тварини цієї групи протягом гострого періоду (1-10 доба) один раз на добу отримували «Церебрал» інтраназально у дозі 0,1 мг/кг).

На перший та десятий день моделювання гострого ГІ, а також у відтермінований період (7 місяців після моделювання гострого ГІ) для гістологічного аналізу відбирали ділянки сенсомоторної кори великих півкуль головного мозку тварин, фіксували у 10%-му розчині формаліні, заливали у парафін, і виготовляли зрізи товщиною 6-7 мкм. Виготовлені зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином або толуїдиновим блакитним за Ніслем і досліджували на світлооптичному рівні (мікроскоп *Zeiss PrimoStar*, Німеччина). Морфометричну оцінку даних здійснювали з використанням цифрової камери *Tucsen TCA 5.0* при загальному збільшенні Ч400. Вимірювали площу та периметр перикаріону, діаметр та площу ядра пірамідних нейронів III та V шарів цереброкортексу півкуль головного мозку (розраховуючи при цьому ядерно-цитоплазматичне співвідношення), а також площу гліальних клітин цих шарів цереброкортексу.

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали методами варіаційної статистики [1] із використанням пакету програми *Statistica for Windows*. Усі експериментальні групи порівнювали з контрольною групою. Групу «інсульт+«Церебрал» додатково порівнювали з групою «інсульт». Вірогідність різниці між порівнюваними групами оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками  $P < 0,05$  [1].

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведений нами гістологічний аналіз стану нервових клітин при ГІ виявив різну реакцію різних клітинних елементів цереброкортексу в умовах експериментальної геморагії. Показано, що найбільш чутливими до гіпоксії є нейрони III і V шарів цереброкортексу кори великих півкуль головного мозку, і особливо, представництва рухового

аналізатора. В пірамідних нейронах на травму особливо активно і швидко реагує хроматофільна субстанція (базофільна речовина Ніссля). Її структурні зміни (деструкція) в одних клітинах проявляються у вигляді часткового, субтотального або центрального хроматолізу, а в інших – у вигляді повної дезорганізації із виникненням гіперхромії протоплазми.

Гістологічний аналіз в групі «інсульт+«Церебрал» показав, що на десяту добу моделювання гострого ГІ суттєво зменшився рівень перичелюлярних та периваскулярних набряків пірамідних нейронів III і V шарів неокортексу великих півкуль головного мозку. Проведений же морфометричний аналіз пірамід цих зон виявив цікаву динаміку: початкове збільшення з наступним зменшенням площі (1-а доба -  $141,12 \pm 6,02$  мкм<sup>2</sup>, 10-а доба -  $133,97 \pm 3,70$  мкм<sup>2</sup>) та периметру (1-а доба -  $49,99 \pm 1,43$  мкм, 10-а доба -  $47,01 \pm 0,91$  мкм) перикаріонів нейронів III шару неокортексу та відповідне зменшення з наступним збільшенням цих показників у пірамідах V шару неокортексу (1-а доба -  $133,89 \pm 3,19$  мкм<sup>2</sup>, 10-а доба -  $143,57 \pm 3,16$  мкм<sup>2</sup>; 1-а доба -  $41,76 \pm 0,74$  мкм, 10-а доба -  $49,37 \pm 0,75$  мкм). Подібну динаміку змін виявив морфометричний аналіз і діаметру та площі ядер пірамід як у III (1-а доба -  $9,18 \pm 0,11$  мкм, 10-а доба -  $8,95 \pm 0,14$  мкм; 1-а доба -  $61,50 \pm 0,99$  мкм<sup>2</sup>, 10-а доба -  $56,58 \pm 1,03$  мкм<sup>2</sup>) так і у V (1-а доба -  $8,55 \pm 0,03$  мкм, 10-а доба -  $8,97 \pm 0,03$  мкм; 1-а доба -  $55,06 \pm 1,09$  мкм<sup>2</sup>, 10-а доба -  $61,09 \pm 1,29$  мкм<sup>2</sup>) шарі цереброкортексу. Такі зміни морфометричних параметрів свідчать про підвищення активності клітин, що має забезпечувати їхню регенерацію за умов моделювання гострого ГІ, а також про нейропротекторні властивості препарату «Церебрал», його здатність впливати на активність процесів відновлення пірамідних нейронів III та V шарів цереброкортексу великих півкуль головного мозку в ході моделювання цереброваскулярної патології.

Отримані нами дані гістологічного аналізу показали, що при ГІ відбуваються зміни і в гліальних клітинах, що можуть набувати дистрофічного характеру, супроводжуватися зростанням осміофілії структур ядер та цитоплазми гліоцитів. Тоді як, під дією трофінотропіну «Церебрал» на 10-у добу моделювання гострого ГІ спостерігаються позитивні як кількісні, так і якісні зміни гліальних клітин III та V шарів цереброкортексу великих півкуль головного мозку. Перш за все, відбувається зростання площі гліоцитів від  $17,41 \pm 0,20$  мкм<sup>2</sup> на 1-у добу до  $26,47 \pm 0,26$  мкм<sup>2</sup> на 10-у добу, що свідчить про підвищення активності гліальних клітин і підтверджує їхню важливу роль у регенераційних процесах пірамідних нейронів.

У відтермінований період в групі «інсульт+«Церебрал» спостерігається відновлення нормальної морфології пірамідних нейронів III і V

шарів цереброкортексу великих півкуль головного мозку, порівняно з групою «інсульт», а також спостерігається позитивна динаміка змін проаналізованих морфометричних показників, порівняно з гострим періодом ГІ. Отримані результати підтверджують наявність нейропротекторного ефекту трофінотропіну «Церебралу».

Результати проведеного аналізу морфологічних та морфометричних показників гліальних клітин у відтермінованому періоді ГІ свідчать про активну участь цих клітин у відновних процесах. Динаміка змін їхніх показників наочно демонструє позитивний стимулюючий вплив терапії трофінотропіном «Церебралом»: площа гліоцитів III та V шарів цереброкортексу великих півкуль головного мозку у тварин в групі «інсульт+«Церебрал» достовірно вища за площу гліоцитів у групі «інсульт». Так, на сьомий місяць після моделювання гострого ГІ площа гліоцитів становила:  $17,12 \pm 0,19$  мкм<sup>2</sup> (контрольна група);  $18,24 \pm 0,22$  мкм<sup>2</sup> (група «інсульт») та  $23,65 \pm 0,24$  мкм<sup>2</sup> (група «інсульт+«Церебрал»»). Отримані результати свідчать про підвищення активності гліоцитів під впливом «Церебралу», що має сприяти швидшому відновленню нервової тканини після моделювання ГІ.

#### ВИСНОВКИ

Отримані результати досліджень свідчать про розвиток різких змін у нейронах та гліальних клітинах при інтрацеребральній геморагії. Так, у V шарі пірамідних клітин цереброкортексу великих півкуль головного мозку спостерігаються зміни дистрофічного характеру, що проявляються у зморщуванні більшості нейронів цієї групи, тоді як у III шарі пірамідних клітин, навпаки, здебільшого спостерігається гіпертрофія пірамід. В ході проведеного аналізу виявлена нейропротекторна та нейроактивуюча дія трофінотропіну «Церебралу» на нейрональні утворення цереброкортексу в умовах моделювання гострої недостатності мозкового кровообігу (геморагічний варіант) та хронічної недостатності мозкового кровообігу (відтермінований період); доведено, що антиінсультний трофінотропний засіб «Церебрал» має нейроно- і гліопротекторні властивості. Під його

впливом, зокрема, збільшується площа гліальних клітин, а також спостерігається явище гліозу, що відображається у збільшенні нейрогліального індексу як у III (до 1,1), так і у V (до 1,75) шарах цереброкортексу великих півкуль головного мозку на 10-й день моделювання гострого ГІ. Проведено порівняльний аналіз фармакопротекторної дії «Церебралу» в умовах моделювання гострої та хронічної недостатності мозкового кровообігу пірамідних нейронів різних шарів цереброкортексу. Дані аналізу відтермінованого етапу дослідження підтверджують ефективність застосування «Церебралу» у гострому періоді ГІ.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия / Е.Б. Владимирская // Клини. лабор. диагностика. - 2002. - № 11. - С. 25 - 32.
2. Держинський М.Е. Навчальний посібник для лабораторних занять з великого морфометричного спецпрактикума для студентів кафедри цитології, гістології та біології розвитку. / Держинський М.Е., Варенюк І.М. - Київ: Фітосоціоцентр. - 2006. - 83 с.
3. Макаренко О. Вивчення хімічного складу і біологічної активності препарату групи трофінотропінів – церебралу / О. Макаренко, Н. Карандеєва, І. Васильєва // Вісник Львів. Ун-ту. - 2005. - Вип. 40. - С. 10 - 15.
4. Макаренко А.Н. Метод моделювання локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у експериментальних животних / А.Н. Макаренко, Н.С. Косицын, Н.В. Пасикова, М.М. Свинов // Журн. высш. нерв. деят. - 2002. - Т. 52, № 6. - С. 756 - 768.
5. Макаренко А.Н. Нейроактивирующий механизм действия трофинотропина “Церебрал” / А.Н. Макаренко, И.Г. Васильева // Экспер. и клин. фармакол. - 2004. – Т. 67, № 4. - С. 12 – 15.
6. Макаренко А.Н., Косицын Н.С., Карпенко С.В., Мишина В.А. Способ моделирования геморрагического инсульта // Авт. свид. № 176751181А от 03.11.1990 г.
7. Guide for the Core and Use of Laboratory Animals. National Research Council. Washington: Nat. Acad. Press. - 2001. - 250 p.