

© А. В. Дробленков, М. В. Мониц, Э. И. Валькович, 2014  
УДК 611.815.018.8:616-005.4-085:599.323.4

*А. В. Дробленков<sup>1</sup>, М. В. Мониц<sup>2</sup> и Э. И. Валькович<sup>1</sup>*

## РАННИЕ РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АСТРОЦИТОВ ПАРАНИГРАЛЬНОГО ЯДРА СРЕДНЕГО МОЗГА ПОСЛЕ ПЕРЕДНЕМОЗГОВОЙ ИШЕМИИ И ВОЗДЕЙСТВИЯ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРА РОПРЕНА У КРЫС

<sup>1</sup> Кафедра гистологии и эмбриологии (зав. — проф. Э. И. Валькович), Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет; <sup>2</sup> кафедра фармакологии (зав. — проф. П. Д. Шабанов), Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Исследование посвящено выявлению морфологических эквивалентов церебропротекторного влияния полипренольного препарата «Ропрена» на астроциты паранигрального ядра среднего мозга, расположенные за пределами фокуса передне-мозговой ишемии у крыс. У половозрелых крыс (n=8) под наркозом воспроизводили ишемию переднего мозга путем билатеральной окклюзии общих сонных артерий. Четверем из них после операции ежедневно внутривентриально вводили церебропротектор ропрен в дозе 11,6 мг/кг. Контролем служили ложноперированные животные. Через 7 сут эксперимента животных декапитировали. Иммуногистохимическим методом исследовали астроциты передней вентральной части паранигрального ядра среднего мозга путем выявления глиального фибриллярного кислого белка. Определяли количество астроцитов, площадь сечения их тел, длину главных отростков, расстояние между их телами и стенкой капилляра. Установлено, что ропрен подавляет гипертрофическую реакцию астроцитов, их миграцию в направлении сосудистой стенки и, по-видимому, стимулирует размножение этих клеток.

**Ключевые слова:** головной мозг, паранигральное ядро, астроциты, ишемия, ропрен

Эффективность лекарственных препаратов обычно определяется по результатам функциональных и биохимических тестов у крыс после перевязки общих сонных артерий [3]. В этом случае глобальной ишемии мозга страдают все его отделы, но стволовые — в меньшей степени. Кровоснабжение мозга поддерживается за счет двух позвоночных артерий, и животные выживают в течение 2–4 нед, если их не подвергать стрессорным воздействиям. Воздействие лекарств на мозг, в частности, полипренольного препарата «Ропрена», дающего церебропротекторный эффект, в данной модели не исследовалось. Хотя ропрен зарегистрирован и позиционирован, прежде всего, как гепатопротектор, у него обнаружены психоактивирующие свойства, антидепрессантная активность, способность влиять на обмен дофamina в структурах мозга (стриатуме и прилежащем ядре) [2]. Особый интерес вызывает установление специфики постишемических изменений клеток астроцитов среднего мозга после коррекции ропреном, поскольку сведения о реактивных изменениях этих клеток в области ненарушенного кровоснабжения отсутствуют.

Цель данного исследования — выявить морфологические эквиваленты церебропротекторного влияния полипренольного препарата «Ропрена» на астроциты паранигрального ядра среднего мозга, расположенного в области ненарушенного кровоснабжения в модели передне-мозговой ишемии у крыс.

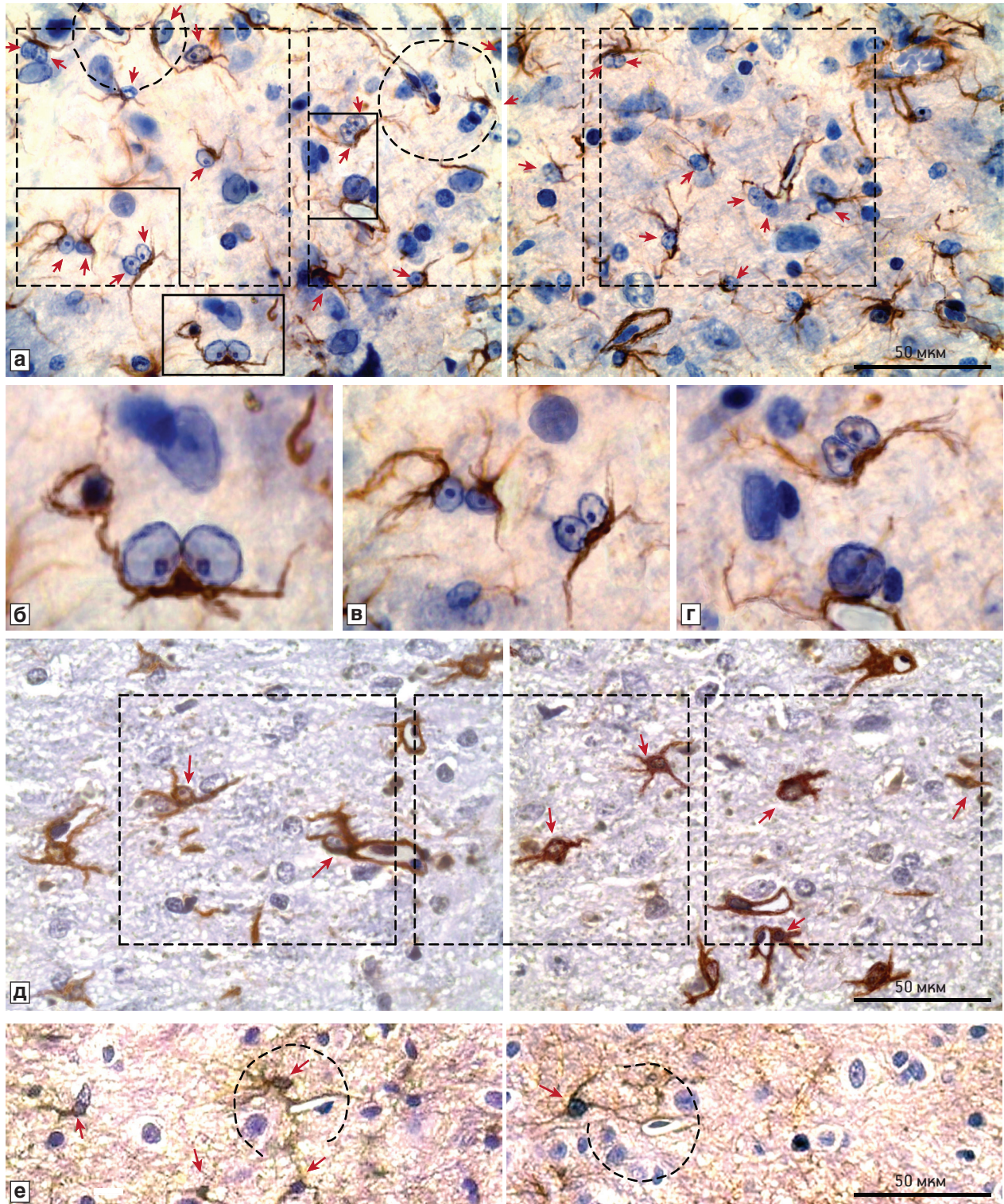
Материал и методы. Объектом исследования был головной мозг половозрелых крыс линии Вистар. Крысам первой группы (n=4) под наркозом производили билатеральную окклюзию общих сонных артерий. Другим животным (n=4) после воспроизведения острой ишемии мозга ежедневно внутривентриально вводили ропрен в количестве 11,6 мг/кг и объеме 1,2 мл на крысу. Контролем служили ложноперированные животные (n=4). Через 7 сут эксперимента животных декапитировали, головной мозг фиксировали в 9% растворе формалина. В гистологических срезах передней вентральной части паранигрального ядра выявляли глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), используя мышиные антитела, клон GA-5 (Biocare medical, США) в разведении 1:250. Вторичные биотинилированные антитела применяли из набора VECTASTAIN ABC, США. После проявления связанных антигенов диаминобензидином (DAB) срезы докрашивали гематоксилином Карацци. В трех последовательных квадратах площадью по 0,01 мм<sup>2</sup> на срезах мозга у каждого животного определяли количество астроцитов, площадь сечения их тел, длину главных отростков,

### Сведения об авторах:

*Дробленков Андрей Всеволодович* (e-mail: droblenkov\_a@mail.ru), *Валькович Эрнест Иванович*, кафедра гистологии и эмбриологии, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2;

*Мониц Максим Викторович*, кафедра фармакологии, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6





Строение и расположение астроцитов в паранеогенном ядре среднего мозга крыс через 7 сут экспериментальной ишемии на фоне терапии ропреном (а–г), без медикаментозной коррекции (д) и в контроле (е).

б–г — части рисунка а (очерчены в нем сплошными линиями). Пунктиром очерчена площадь исследования, равная  $0,01 \text{ мм}^2$ . Центр окружности (пунктир) радиусом  $20 \text{ мкм}$  совмещен со стенкой кровеносного капилляра, ближайшей к телу астроцитов (стрелки). Реакция на глиальный фибриллярный кислый белок астроцитов с докраской гематоксилином. б–г — об.63, ок.10

расстояние между их телами и стенкой капилляра в пределах окружности радиусом  $20 \text{ мкм}$ , оценивали особенности строения данных клеток. Морфометрию проводили с помощью программы ImageScope (Россия). Определяли средние

значения и их стандартную ошибку ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ). Различия считали значимыми при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования.** У ложно-оперированных крыс ядра астроцитов, чаще зани-



**Характеристика астроцитов паранигрального ядра среднего мозга крыс через 7 сут экспериментальной ишемии при коррекции ропреном на площади 0,01 мм<sup>2</sup> ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )**

Группа животных	Количество астроцитов при реакции на GFAP	Расстояние астроцитов до стенки капилляра, мкм	Площадь тел астроцитов, мкм <sup>2</sup>	Длина отростков, мкм
Ложнооперированные	4,1±0,5	10,6±1,6	39,3±2,9	12,4±1,1
После ишемии	3,3±0,4	2,7±1,6	65±5	8,3±0,6
После ишемии и терапии ропреном	7,1±0,7*	13,3±1,2*	59,2±2,8**	14,2±1,0*

\* Различия по сравнению с показателями у крыс после ишемии значимы при  $P < 0,05$ ; \*\* различия по сравнению с показателями у ложнооперированных крыс значимы при  $P < 0,05$ .

Примечание. GFAP — глиальный кислый фибриллярный белок.

мающие центральное положение в телах клеток площадью сечения  $38 \pm 3$  мкм<sup>2</sup>, были окружены густой равномерной сетью GFAP. В тонких главных отростках астроцитов и периваскулярных астроцитарных мембранах этот белок был также распределен равномерно. По отношению к капиллярам тела астроцитов располагались на разном расстоянии (рисунок, таблица).

После 7 сут гипоксии увеличение площади тел астроцитов ( $P < 0,05$ ) было обусловлено гипертрофией их цитоплазмы, равномерно и интенсивно экспрессирующей GFAP и окружающей неизменное ядро. В некоторых клетках ядро было расположено слегка эксцентрично. Отростки были утолщены и укорочены (в 1,6 раза;  $P < 0,05$ ). Периваскулярные глиальные мембраны были утолщены. Они так же, как тела и отростки клеток, равномерно экспрессировали GFAP. Большинство тел астроцитов находились в непосредственной близости от стенки капилляров; расстояние между ними сократилось в 3,6–7,3 раза ( $P < 0,05$ ).

Через 7 сут переднемозговой ишемии и коррекции ропреном тела астроцитов были более крупными, чем в контроле, и часто располагались попарно, тесно прилежало друг к другу, имели ровный рельеф сближенных поверхностей и были похожи по строению на клетки, недавно завершившие телофазу митоза. Ядрышки большинства клеток были крупными, ядерный хроматин был преимущественно деспирализован. Отростки астроцитов и периваскулярные астроцитарные мембраны выглядели разволокненными. GFAP<sup>+</sup>-позитивный материал клеток был расположен в области основания осевых отростков и в одном из участков цитоплазмы. Во многих астроцитах, объединенных в пары, GFAP концентрировался в соседних участках цитоплазмы и имел вид общей утолщенной сети. Количество клеток по сравнению с их числом в контроле и эксперименте без воздействия ропрена было увеличено ( $P < 0,05$ ). Расстояние между телами астроцитов и стенкой капилляров по сравнению с контролем

значимо не изменилось. Данный параметр оказался в 7,8–4,9 раза больше, чем после ишемии без медикаментозной коррекции. Площадь сечения тел астроцитов в условиях коррекции ишемии ропреном значимо не отличалась от таковой при ишемии без воздействия ропрена, но была в 1,2–1,5 раза больше, чем в контроле ( $P < 0,05$ ). Длина осевых отростков клеток по сравнению с контролем, при ишемии и терапии ропреном значимо не изменилась (см. таблицу).

**Обсуждение полученных данных.** Несмотря на то, что в настоящем исследовании была использована модель фокальной гипоксии переднего мозга, выключаяющая его основные функции [4], полученные нами данные свидетельствуют о значительном спектре изменений астроцитов паранигрального ядра. В цитоплазму клеток поступают компоненты плазмы крови из действующего капиллярного русла срединных среднемозговых артерий и через артериальный круг большого мозга — токсичные продукты реакций глутамат-кальциевого каскада, образующиеся в фокусе ишемии [1] (передний мозг). По-видимому, компенсаторное накопление гликогена и увеличение продукции промежуточных филаментов астроцитов в зоне пенумбры [5], так же как и выявленную нами гипертрофическую реакцию клеток, определяет воздействие данных токсикантов. Миграция тел астроцитов в направлении стенки капилляров связана с содержанием густой сети микрофиламентов, распределенных вблизи плазмолеммы тел и отростков этих клеток [6].

Установленные церебропротекторные и энергосберегающие свойства ропрена в дозах 4,3 и 11,6 мг/кг (устранение метаболического ацидоза, повышение содержания креатинфосфата и АТФ) [2] могут обусловить выявленные морфологические признаки коррекции препаратом астроцитов в раннем постгипоксическом периоде, имеющие компенсаторно-приспособительный характер.

Таким образом, ропрен, воздействующий в концентрации 11,6 мг/кг на астроциты, располо-

женные за пределами фокуса ишемии, подавляет их гипертрофическую реакцию, миграцию в направлении сосудистой стенки и, по-видимому, стимулирует размножение этих клеток.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е. И. и Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. М., Медицина, 2001.
2. Шабанов П. Д., Зарубина И. В. и Soultanov Vagif S. К механизму действия полипренолов при ишемии головного мозга. Мед. академ. журн., 2011, т. 11, № 2, с. 24–31.
3. Шабанов П. Д., Султанов В. С., Лебедев А. А. и др. Защитные эффекты полипренолов на модели подострого гепатоза с энцефалопатией у крыс. Мед. академ. журн., 2010, т. 10, № 2, с. 50–57.
4. Ginsberg M. D. and Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, 1989, v. 20, p. 1627–1642.
5. Kajihara H., Tsutsumi E., Kinoshita A. et al. Activated astrocytes with glycogen accumulation in ischemic penumbra during the early stage of brain infarction: immunohistochemical and electron microscopic studies. *Brain Res.*, 2001, v. 909, № 3, p. 92–101.
6. Racchetti G., D'Alessandro R. and Meldolesi J. Astrocyte stellation, a process dependent on Rac1 is sustained by the regulated exocytosis of enlargeosomes. *Glia*, 2012, v. 60, issue 3, p. 465–475.

Поступила в редакцию 07.10.2013

### EARLY REACTIVE CHANGES OF THE ASTROCYTES IN THE MIDBRAIN PARANIGRAL NUCLEUS AFTER FOREBRAIN ISCHEMIA AND CEREBROPROTECTOR ROPREN ADMINISTRATION IN RATS

*A. V. Droblenkov<sup>1</sup>, M. V. Monid<sup>2</sup> and E. I. Valkovich<sup>1</sup>*

The aim of this study was to detect morphological equivalents of cerebroprotective effect of polyprenol drug Ropren on the astrocytes of the midbrain paranigral nucleus (PNN) which are located outside the focus of forebrain ischemia in rats. In mature rats (n=8) the cerebral ischemia was reproduced under the narcosis by bilateral occlusion of both carotid arteries. Four rats received daily intraperitoneal injections of 11.6 mg/kg of cerebroprotector Ropren. Sham-operated animals served as a control. The animals were decapitated at experimental day 7. Astrocytes of anterior ventral portion of midbrain PNN were studied using an immunocytochemical method demonstrating glial fibrillary acidic protein. The number of astrocytes, their cell body profile area, the length of their major processes and the distance between their cell bodies and capillary wall were measured. It was found that Ropren suppressed astrocyte hypertrophic reaction, their migration towards the vascular wall and presumably stimulated the proliferation of these cells.

**Key words:** *brain, paranigral nucleus, astrocytes, ischemia, Ropren*

<sup>1</sup> Department of Histology and Embryology, St. Petersburg State Pediatric Medical University; <sup>2</sup> Department of Pharmacology, S. M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg