

О.В. Кирик¹, Е.Г. Сухорукова¹, Т.Д. Власов² и Д.Э. Коржевский¹

СЕЛЕКТИВНАЯ ГИБЕЛЬ НЕЙРОНОВ СТРИАТУМА КРЫСЫ ПОСЛЕ ТРАНЗИТОРНОЙ ОККЛЮЗИИ СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ

¹ Отдел общей и частной морфологии (руков. — академик РАМН В.А. Нагорнев) Института экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург; ² кафедра патологической физиологии (зав. — проф. Т.Д. Власов) Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова

Цель настоящего исследования состояла в определении наиболее чувствительной к ишемическому повреждению популяции нервных клеток конечного мозга крысы в условиях эксперимента, моделирующего транзиторную фокальную ишемию головного мозга. Установлено, что проведение 30-минутной ишемии левого полушария головного мозга приводит к значимому уменьшению популяции нейронов верхнемедиальной зоны стриатума. Данные изменения сопровождаются умеренной активацией астроцитарной глии.

Ключевые слова: головной мозг, фокальная ишемия, нейроны, стриатум, белок NeuN.

Раскрытие механизмов избирательной чувствительности и устойчивости нервных клеток различных формаций головного мозга к ишемическому повреждению должно способствовать разработке новых высокоэффективных подходов к профилактике и лечению таких социально значимых заболеваний, как цереброваскулярная болезнь и ишемический инсульт [1]. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в экспериментальных исследованиях ишемического поражения головного мозга, все еще остаются малоизученными клеточные реакции, развивающиеся в ранние сроки после непродолжительной ишемии, которые определяют избирательность повреждения нервных клеток.

Цель настоящего исследования — определение наиболее чувствительной к ишемическому повреждению популяции нервных клеток конечного мозга крысы в условиях эксперимента, моделирующего транзиторную фокальную ишемию головного мозга.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 29 половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Содержание животных и все экспериментальные манипуляции осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Индукцию ишемии производили при помощи эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии [4] под общей анестезией (тиопентал-натрий, 60 мг/кг). Продолжительность нарушения кровообращения в бассейне левой средней мозговой артерии в каждом случае составляла 30 мин, а время реперфузии — 48 ч. Контролем служили структуры правого (интактного) полушария конечного мозга животных экспериментальной серии. Материал фиксировали

в цинк-этанол-формальдегиде, обезжизняли и заливали в парафин обычным способом. Морфологическому исследованию подвергали серийные фронтальные срезы конечного мозга. Нейроны выявляли путем окрашивания толудиновым синим по Нисслю и с использованием иммуноцитохимической реакции на ядерный маркер нервных клеток — NeuN в соответствии с ранее опубликованным протоколом [2]. Для флуоресцентной микроскопии препараты окрашивали йодистым пропидием (BD PharMingen, США). Астроциты выявляли при помощи иммуноцитохимической реакции на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). После постановки иммуноцитохимических реакций часть срезов докрашивали астровым синим и квасцовым гематоксилином. Количественный анализ проводили на цифровых изображениях, полученных при помощи микроскопа Leica DM 1000 и цифровой камеры Leica DFC 280. Подсчитывали число NeuN-иммунопозитивных нейронов стриатума на площади 0,35–1 мм² отдельно в правом и левом полушарии головного мозга у всех исследованных животных с использованием программы ImageJ (NIH, США). О значимости различий судили по величине t-критерия.

Результаты исследования. 30-минутная ишемия левого полушария головного мозга, как правило, не приводит к развитию крупноочаговых повреждений (ишемического инфаркта, сопровождающегося деструкцией нервной ткани и развитием воспалительной реакции). Из исследованных 29 случаев односторонний ишемический инфаркт был зарегистрирован только у 5 животных. У остальных крыс наблюдалось преимущественно локальное поражение нейронов стриатума. Существенных изменений плотности популяции нейронов неокортекса зарегистрировано не было. В области исчезновения нейронов стриатума сохранялись глиальные элементы и

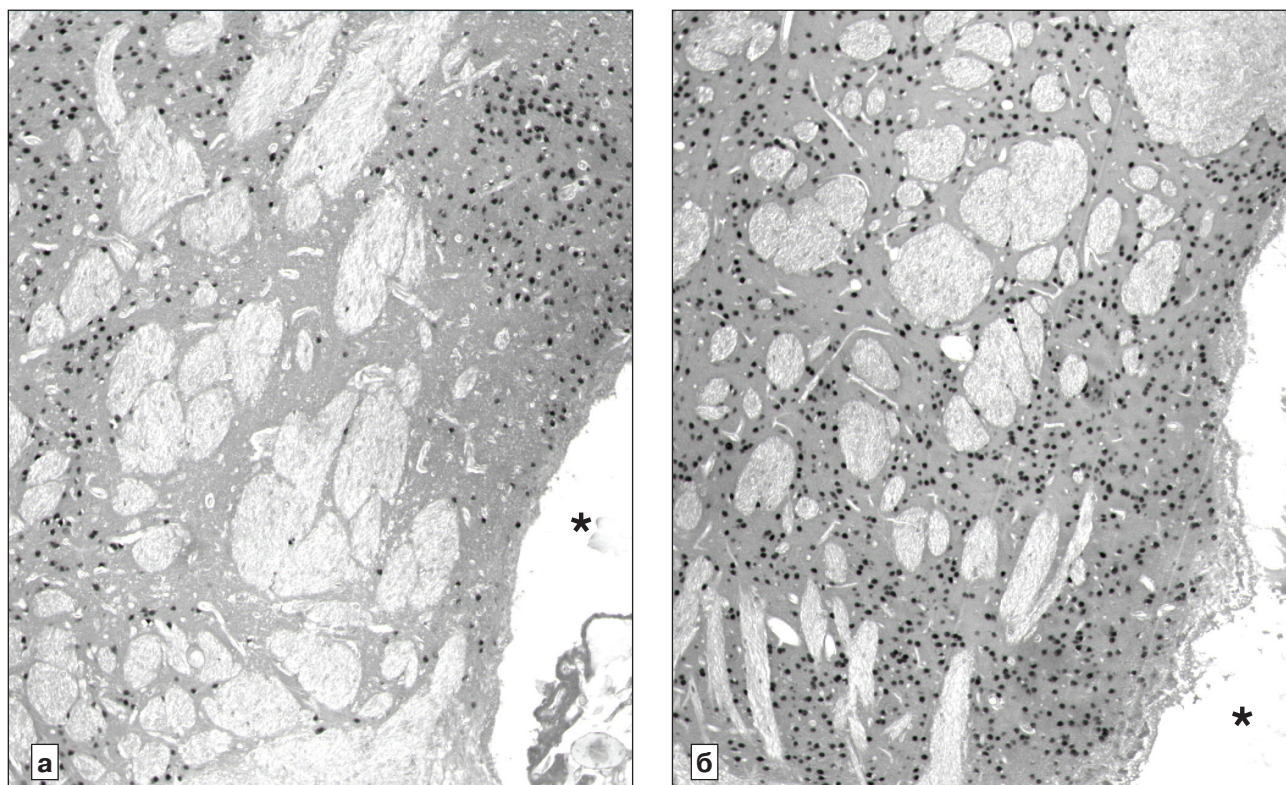


Рис. 1. Участки левого (а) и правого (б) стриатума крысы через 48 ч после транзитной окклюзии левой средней мозговой артерии.

Иммуноцитохимическая реакция на ядерный антиген нервных клеток (NeuN) с докраской астровым синим. Звездочка — просвет бокового желудочка. Об. 10, ок. 10.

наблюдалось расширение кровеносных сосудов. В стриатуме ишемизированного полушария наблюдалась умеренная активация астроцитарной глии, о чем свидетельствовало локальное увеличение интенсивности реакции на глиальный белок GFAP. Наиболее чувствительной к повреждению оказалась верхнемедиальная зона стриатума, расположенная вблизи стенки бокового желудочка (рис. 1). В этой зоне наблюдалось значимое ($P < 0,001$) сокращение популяции NeuN-иммунопозитивных нейронов ($15,7 \pm 2,3$; в контроле — $76,8 \pm 2,6$ на $100\,000\text{ мкм}^2$) и встречались отдельные ядра неидентифицируемых клеток с периферической и полулунной конденсацией хроматина, свидетельствующей о возможности развития апоптоза, а также типичные апоптозные тельца (рис. 2).

Обсуждение полученных данных. Данные проведенного исследования свидетельствуют о том, что выбранный режим ишемии более «мягкий» по сравнению с обычно используемой 90-минутной ишемией, приводящей у крыс линии Вистар к развитию инсульта [5]. Обнаруженное локальное уменьшение популяции нейронов стриатума указывает на их избирательную чувствительность к повреждающему фактору (ишемии). Наличие апоптозных телец и изменение струк-

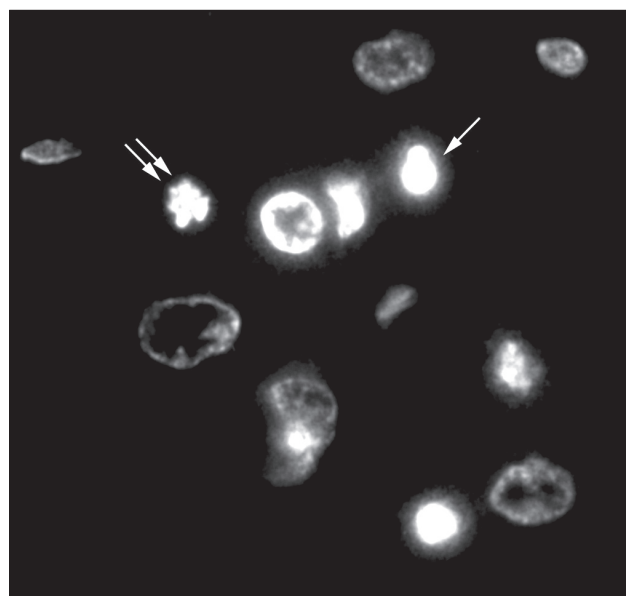


Рис. 2. Ядра клеток в ишемизированном (левом) стриатуме крысы.

Стрелка — апоптозное тельце; две стрелки — ядро клетки с отчетливо выраженной конденсацией хроматина. Флуоресцентная микроскопия. Окраска йодистым пропидием. Об. 100, ок. 10.

туры ядра части клеток в зоне исчезновения нейронов позволяет предполагать, что возможным механизмом гибели нейронов стриатума является

ся апоптоз. Отсутствие нейронального маркера NeuN в ядре и цитоплазме погибающих клеток не противоречит этому предположению, поскольку известно [3], что ядерный белок NeuN исчезает из поврежденных и погибающих пирамидных нейронов гиппокампа. Более определенно высказаться о механизме гибели нейронов стриатума и происхождении апоптозных телец можно будет при использовании специфических методов детекции апоптоза и других нейрональных маркеров.

Таким образом, умеренное ишемическое повреждение нервной ткани конечного мозга крысы, наблюдаемое при транзиторной окклюзии средней мозговой артерии, проявляется селективной гибелью части нейронов стриатума. Чувствительность нейронов различных участков этой формации мозга к повреждению различна, а присутствие в зоне повреждения погибающих клеток с характерной для апоптоза конденсацией хроматина и наличие апоптозных телец заставляют предполагать программированный характер гибели этих клеток.

Авторы выражают благодарность ЗАО «Вертекс» в лице генерального директора Е.В. Ковалёвой и директора по науке О.С. Весёлкиной за содействие в выполнении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И. и Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М., Медицина, 2001.
2. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Зинькова Н.Н. и др. Иммуноцитохимическое выявление нейронов головного мозга с помощью селективного маркера NeuN. Морфология, 2005, т. 128, вып. 5, с. 76–78.
3. Коржевский Д.Э., Хожай Л.И., Гилерович Е.Г. и др. Современные морфологические методы оценки деструктивных процессов, развивающихся в головном мозге в ответ на повреждающие воздействия. В кн.: Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга. М., Информкнига, 2006, с. 139–142.
4. Longa, E.Z., Weinstein P.R., Carlson S. and Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 1989, v. 20, № 1, p. 84–91.
5. Walberer M., Stolz E., Müller C. et al. Experimental stroke: ischaemic lesion volume and oedema formation differ among rat strains (a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rats using MRI). Lab. Anim., 2006, v. 40, № 1, p. 1–8.

Поступила в редакцию 29.09.08

SELECTIVE DEATH OF THE STRIATUM NEURONS IN RATS AFTER THE TRANSIENT OCCLUSION OF THE MIDDLE CEREBRAL ARTERY

O.V. Kirik, Ye.G. Sukhorukova, T.D. Vlasov and D.E. Korzhevskiy

The aim of the present investigation was to determine the neuronal population of rat telencephalon that was most sensitive to ischemic damage under the experimental condition of transient focal cerebral ischemia. It was found that 30-minute ischemia of the left hemisphere resulted in a significant decrease of neuronal population in the dorsomedial part of caudatoputamen. Local neural cell death was accompanied by a moderate activation of the astrocytes.

Key words: brain, focal ischemia, neurons, striatum, NeuN-protein.

Laboratory of the Functional Neuromorphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Department of Pathophysiology, I.P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg.