

© М. М. Шертаев, У. К. Ибрагимов, С. Х. Икрамова, Ф. Т. Якубова, К. У. Ибрагимов

DOI: [10.15293/2226-3365.1501.07](https://doi.org/10.15293/2226-3365.1501.07)

УДК 616.058 + 616.538.19

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

М. М. Шертаев, У. К. Ибрагимов, С. Х. Икрамова, Ф. Т. Якубова (Ташкент, Узбекистан),
К. У. Ибрагимов (Санкт-Петербург, Россия)

Противоречивость данных об особенностях метаболизма нейроцитов, факторах апоптоза в мозговых тканях в динамике ишемии-реперфузии, а также сложность прогнозирования эффективности реабилитации у больных инсультом определили целесообразность проведения морфологических исследований при экспериментальной ишемии головного мозга в различные сроки после реперфузии. Модель нарушения мозгового кровообращения воспроизводилась путем временного клипирования правого ствола безымянной артерии на 40 минут у крыс-самцов. Вивисекция животных проводилась спустя 1, 6, 24 часа, а также на третьи и седьмые сутки после реперфузии. Гистологические препараты изучали световой микроскопией после окраски гематоксилин эозином, иммуногистохимические исследования Vcl-2 проводили набором DAKO Citomation LСАВ-2 (Дания). Установлено, что при экспериментальной окклюзии-реоксигенации головного мозга морфологические нарушения нарастают во времени после реперфузии. Наибольшие изменения обнаружены через шесть часов после реперфузии, когда появляются первые признаки апоптоза в виде реакции розеткообразования моноклональных меченых Vcl-2 клеток вокруг нейрона, а на седьмые сутки апоптотическая гибель нейроцитов сменяется некротическим процессом, о чем свидетельствует зона некротического расплавления и независимое расположение Vcl-2 клеток в образцах. Морфологические изменения в тканях головного мозга проявляются в основном в виде отека, хроматолиза и достигают отчетливой выраженности через 24 часа после реперфузии, характеризуясь острым набуханием тел многих нейронов, распылением тигроида

Шертаев Мухаметамин Маметжанович – кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой медицинской биологии и генетики, Ташкентский педиатрический медицинский институт.

Ибрагимов Уткур Кудратович – доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии, Ташкентский педиатрический медицинский институт.

E-mail: zr-khaybullina@rambler.ru

Икрамова Сурайё Хакимовна – кандидат биологических наук, ассистент кафедры медицинской биологии и генетики, Ташкентский педиатрический медицинский институт.

Якубова Фарида Темуровна – старший преподаватель кафедры медицинской биологии и генетики, Ташкентский педиатрический медицинский институт.

Ибрагимов Кудрат Уткурович – врач-интерн кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет.

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

и базофилией ядер. Эти признаки являются неблагоприятными и могут рассматриваться как предикторы некроза, развивающегося на седьмые сутки в мозговых тканях после окклюзии-реперфузии.

Ключевые слова: экспериментальная ишемия мозга, факторы апоптоза, *Bcl-2*, хроматин, некроз.

Высокие показатели летальности и инвалидизации больных инсультом обуславливают особую актуальность проблемы. В Европе заболеваемость инсультом составляет 220 случаев на 100 000 населения в год. Распространенность инсульта приближается к 600 на 100 000 населения, из них 360 (т. е. 60 %) – со стойким дефектом, и только около 15 % больных возвращаются к прежнему до инсультному уровню жизни [1].

Противоречивость данных об особенностях метаболизма нейроцитов, факторах апоптоза в мозговых тканях в динамике ишемии-реперфузии [2–3], а также сложность прогнозирования эффективности реабилитации у больных инсультом [4–5] определили целесообразность проведения морфологических исследований при экспериментальной ишемии головного мозга в различные сроки после реперфузии. Результаты этих исследований позволят, в определенной степени, представить взаимосвязь морфологических изменений в тканях головного мозга в различные сроки ишемии-реперфузии, выделить лимитирующие звенья в системе факторов апоптоза, что может стать предпосылкой для разработки патогенетически обоснованных путей повышения эффективности способов реабилитации.

Целью настоящего исследования стал морфологический анализ тканей головного мозга в различные сроки после экспериментальной ишемии-реперфузии.

Методы исследования.

Работа проведена на крысах-самцах весом 120–130 г, находящихся на стандартном рационе вивария. Модель нарушения мозго-

вого кровообращения воспроизводилось путем временного клипирования правого ствола безымянной артерии. Продолжительность клипирования была в течение 40 мин, затем клипсу устранили и ушивали рану. Оперативное вмешательство проводили с применением эфирного наркоза. Вивисекция животных проводилась спустя 1, 6 и 24 часа, на третьи и седьмые сутки после реперфузии. В каждой опытной группе было по 8–9 животных. Контролем служили животные, которым вскрывали область шеи, препарировали безымянную артерию с последующим ушиванием операционного поля (ложнооперированные животные) ($n = 9$). Для исключения влияния суточных ритмов декапитацию животных проводили в одно и то же время суток – в 9–10 часов утра.

Для морфологического изучения фрагменты тканей головного мозга объемом 0,2–0,3 мм³ фиксировали в 12 % растворе формалина по общепринятой методике [6]. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином – эозином. Иммуногистохимические исследования *Bcl-2* проводили набором *DAKO Citomation LCAB-2* (Дания) моноклональными первичными мышиными и кроличьими антителами к *Bcl-2*, содержащими стрептолизин-биотин (*LCAB*), предназначенными для качественного определения в парафиновых срезах с помощью светооптической микроскопии при окраске гематоксилин-эозином. Светооптические микрофотографии получали на микроскопе «N-800M» с использованием цифровой камеры, сопряженной с оптической системой микроскопа с помощью специального адаптера.

Полученные результаты.

Гистопатологические изменения в коре левых височных долей крыс после перенесенной экспериментальной ишемии имели определённую динамику развития во времени.

При пережатии у крыс левой сонной артерии наблюдались изменения, характерные для патологической картины кислородной недостаточности, так как сравнительно слабое развитие у крыс артериального круга большого мозга не создаёт достаточного кровоснабжения. Патологические изменения нервных клеток при гипоксии характеризовались, прежде всего, полиморфизмом. Началом структурных изменений нервных клеток при гипоксии-реоксигенации стало наличие хроматолиза различной степени через один час после восстановления кровотока по левой сонной артерии после ее пережатия. Повреждения нейронов начинались с появления периферического, центрального или сегментарного хроматолиза. Первые признаки хроматолиза обнаруживались в отдельных нервных клетках и сосудах в образцах коры, правой и левой височной области головного мозга крыс. Выявление начальных проявлений отёка мозга характеризовалось набуханием и увеличением в размерах, бледностью окрашивания нервных клеток, появлением бледных межклеточных полей нейроглии (рис. 1).

При исследовании коры височных долей головного мозга крыс через один час после реперфузии с помощью моноклональных меченых *Vcl-2* клеток реакции розеткообразования не обнаружено, что указывает на отсутствие активации апоптоза в этот период (рис. 2).

Рисунок 1

Кора правой височной области головного мозга крыс через один час после окклюзии – реперфузии

Примечание. Окраска гематоксилин-эозином.

Увеличение: об. 40, ок. 10.

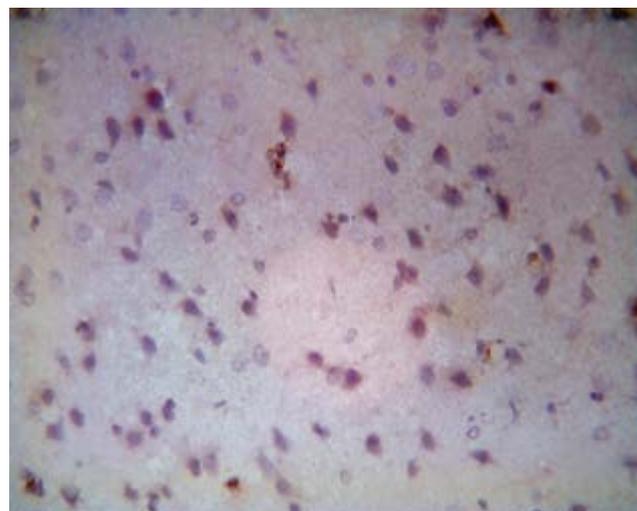
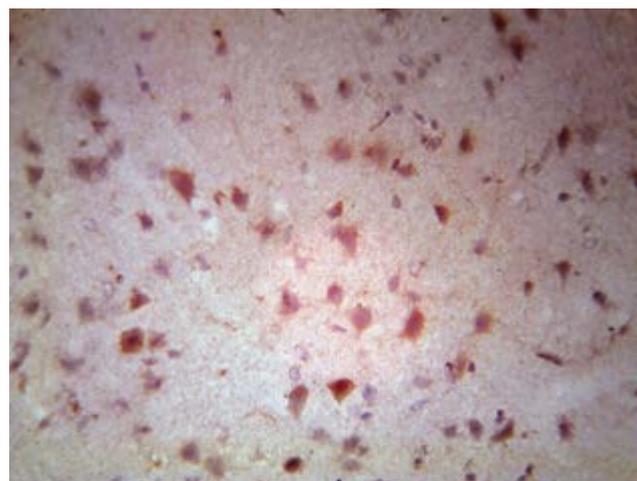


Рисунок 2

Кора левой височной области головного мозга крыс через один час после окклюзии – реперфузии

Примечание. Реакции взаимодействия Vcl-2 меченых моноклональных антител с клетками не наблюдается. Окраска гематоксилин-эозином.

Увеличение: об. 40, ок. 10.



Через шесть часов после окклюзии – реперфузии проявления хроматолиза достигали отчётливой выраженности, морфологические изменения становились более распространёнными и резкими, отмечалось острое набухание

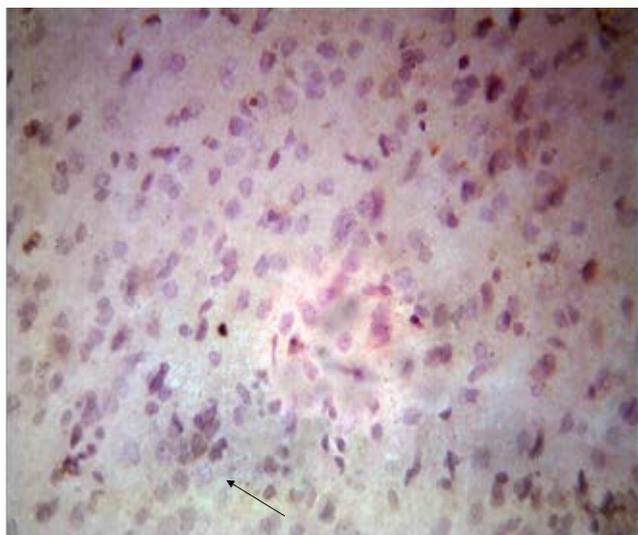
тел многих нейронов, распыление тигроида и базофилия ядер. Хроматолиз, как показатель реактивных изменений нервных клеток, отражает нарушения обмена функциональных белков [7], наблюдающегося в первые шесть часов после реоксигенации.

При исследовании коры височных долей головного мозга крыс с помощью моноклональных меченых *Bcl-2* клеток через шесть часов после окклюзии – реперфузии в поле зрения светового микроскопа выявлялись единичные комплексы клеточного розеткообразования, где один нейрон окружён множеством *Bcl-2* клеток (рис. 3), что указывает на начало развития апоптотической гибели клеток мозга.

Рисунок 3

*Единичный нейрон в окружении множества моноклональных меченых *Bcl-2* клеток через шесть часов после окклюзии – реперфузии*

Примечание. Окраска гематоксилин-эозином.
Увеличение: об. 40, ок. 10.



В течение 24–36 часов после реперфузии хроматолиз продолжал нарастать, в процесс вовлекались структурные белки клеток, распад которых выявлялся светооптически в виде

инкрустаций, продуктов распада цитоплазмы, интенсивно окрашенных базофильных глыбок, которые формировались в течение первых суток после окклюзии – реперфузии и заканчиваются появлением клеток теней и картинами нейронофагии.

Как известно, повреждение структурных белков и липидов клетки включает в себя и изменения липопротеинов клеточных мембран, что свидетельствует об ещё большем нарушении электролитного и водного баланса клетки [8]. В результате этого, уже начиная с ранних стадий процесса, хроматолиз нередко сочетался с гидропическими изменениями, что выражалось в вакуолизации различной степени, увеличении размеров клетки, округлении её контуров, иногда с явлениями острого или соатовидного набухания тел нервных клеток.

Хроматолиз и гидропические изменения цитоплазмы в первые 24 часа после перенесённой гипоксии сопровождались морфологическими признаками компенсаторно-восстановительных реакций, которые выражались в гипертрофии и гиперхромности эктопированного к ядерной мембране ядрышка, перинуклеарном гиперхроматозе.

Через 24 часа после реперфузии в исследуемых образцах имелся тотальный тигролиз и гиперхроматоз ядер в преобладающем большинстве нейронов, «инкрустация» клеток, кариоцитолит, «клетки-тени». Одни нейроны имели соатовидную цитоплазму, другие были тотально темноокрашенными, тела их были узкие, вытянутые. Во многих нейронах имелась центральная тинкториальная ацидофилия.

Наблюдалась дистония сосудистых стенок, утолщение и огрубление аргирофильных волокон, периваскулярные отёки и нередко мелкие периваскулярные кровоизлияния. Гипоксические нейроны с инкрустациями характеризовались наличием интенсивно окрашенных базофильных зёрен по периферии клетки,

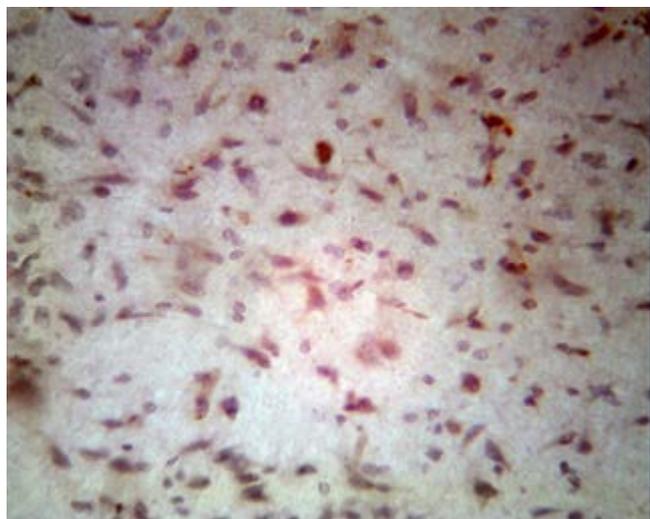
иногда по краю цитоплазмы имелась более тёмная базофильная каёмка.

Исследование коры височных долей головного мозга крыс с помощью моноклональных меченых *Vcl-2* клеток через 24 часа после окклюзии – реперфузии показало наличие в поле зрения светового микроскопа хаотичного распределения *Vcl-2* клеток, отсутствие их концентрирования вокруг нейроцитов и отсутствие связи с ними (рис. 4). Как результат этого, ожидалась резко отрицательная динамика с появлением очагового некроза.

Рисунок 4

Хаотичное распределение Vcl-2 позитивных клеток вне их связи и расположения вокруг нейронов через 24 часа после окклюзии – реперфузии

Примечание. Окраска гематоксилин-эозином.
Увеличение: об. 40, ок. 10.



Через трое суток наблюдалось изменение морфологической картины. С одной стороны, можно было отметить некоторые признаки восстановления – снова начинал окрашиваться расплывённый на мелкие глыбки тигроид, светлее становились ядра нейронов. С другой – продолжалось нарастание патологических процессов, появление вакуолизации,

темноокрашенность некоторых нейронов, уменьшение в размерах нейрональных клеток. Инкрустации нередко сочетались с появлением в клетках различных зернистостей, что проявлялось бледностью цитоплазмы, количество несвязанных *Vcl-2* клеток было незначительным (рис. 5). Известно, что пикнотичные ядра могут значительно дольше обнаруживаться на фоне цитоплазмы, постепенно превращающейся в тень, в виде гиперхромных, неправильной формы, распадающихся на мелкие зёрна и глыбки, угловатых образований [9–10].

Рисунок 5

Обеднение нейрональными клетками с незначительным количеством несвязанных Vcl-2 клеток коры через трое суток после окклюзии – реперфузии

Примечание. Окраска гематоксилин-эозином.
Увеличение: об. 40, ок. 10.

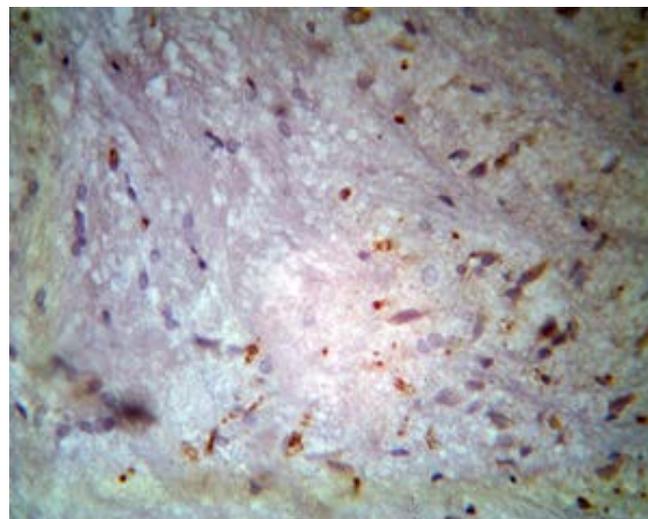
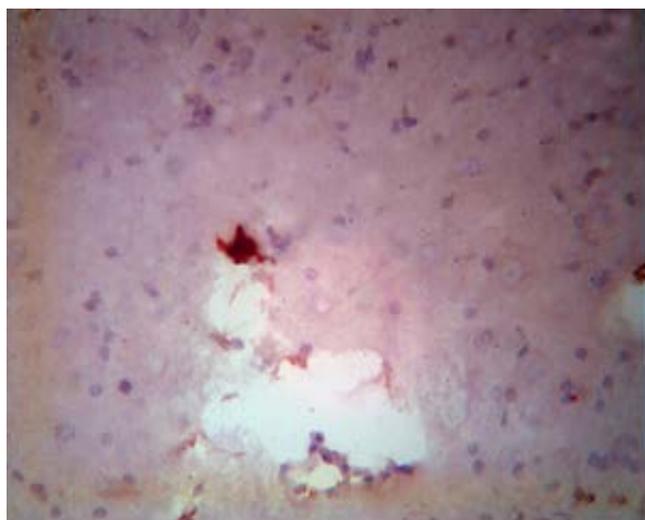


Рисунок 6

Зона некротического расплавления левой височной области головного мозга крысы на седьмые сутки после окклюзии – реперфузии

Примечание. Независимое расположение *Bcl-2* клеток. Окраска гематоксилин-эозином.
Увеличение: об. 40, ок. 10.



Усиление выраженности вакуолизации с образованием некротических полостей в зонах

максимальной ишемии и зоны опустошения характеризовали происходящие морфологические процессы на седьмые сутки (рис. 6).

Заключение

При экспериментальной окклюзии-реоксигенации головного мозга наблюдающиеся изменения нарастают во времени после реперфузии. Наибольшие изменения обнаружены через шесть часов после реперфузии, когда появляются первые признаки апоптоза, а на седьмые сутки апоптотическая гибель нейроцитов сменяется некротическим процессом, о чем свидетельствует зона некротического расплавления и независимое расположение *Bcl-2* клеток в образцах. Морфологические изменения в тканях головного мозга проявляются в основном в виде отека, хроматолиза и достигают отчётливой выраженности через 24 часа после реперфузии, характеризуясь острым набуханием тел многих нейронов, распылением тигроида и базофилией ядер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Назиров Ф. Г., Ибадов Р. А., Абролов Х. К. Принципы нейропротекторной терапии острых нарушений мозгового кровообращения: методические рекомендации. – Ташкент, 2011. – 40 с.
2. Бизенкова М. Н., Чеснокова Н. П., Неважжай Т. А. Активация процессов липопероксидации – эфферентное звено дезинтеграции клеточных структур при острой гипоксической гипоксии // Успехи современного естествознания. – 2007. – № 7. – С. 65–68.
3. Болдырев А. А. Окислительный стресс и мозг // СОЖ. – 2005. – № 8 (4). – С. 4–9.
4. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. – М.: Медицина, 2001. – 326 с.
5. Кухтевич И. И. Ишемический инсульт. – М.: Медицина, 2006. – 170 с.
6. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Медицина, 1962. – 648 с.
7. Ибрагимов У. К., Хайбуллина З. Р. Апоптоз: учебное пособие для магистров и клинических ординаторов. – Ташкент, 2007. – 81 с.
8. Ibragimov U. K. Hypoxi-ishemic encephalopathy in children // The 2th World Congress of Neonatology. 6th – 9th January. 2010, Luxor, Egypt, p. 18.
9. Muresanu D. F. Neurotrophic factors // Bucuresti: Libripress. 2003, 268 p.
10. Sloviter R. Apoptosis: a guide for perplexed // Trends Pharmacol Sci. 2009, № 23, pp. 19–24.

DOI: [10.15293/2226-3365.1501.07](https://doi.org/10.15293/2226-3365.1501.07)

Shertaev Muhametamin Mametjanovich, Candidate of Biological Science, the Head of Medical Biology and Genetics Department, Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent, Uzbekistan.

Ibragimov Utkur Kudratovich, doctor of medicine, professor, Biological Chemistry Department, Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent, Uzbekistan.

E-mail: zr-khaybullina@rambler.ru

Ikramova Suraye Khakimovna, Candidate of Biological Science, Assistant, Medical Biology and Genetics Department, Tashkent pediatric medical institute, Tashkent, Uzbekistan.

Yakubova Farida Temurovna, Assistant, Medical Biology and Genetics Department, Tashkent pediatric medical institute, Tashkent, Uzbekistan.

Ibragimov Kudrat Utkurovich, intern-doctor, Pathology Department with course of Judicial Medicine, Saint Petersburg State Pediatrician Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation.

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

MORPHOLOGICAL CHANGES IN BRAIN TISSUES AFTER EXPERIMENTAL ISCHEMIA

Abstract

Discrepancy of the data about neuronal metabolism, factors of apoptosis in brain tissues after ischemia-reperfusion, and also difficulty of evaluation prediction value of rehabilitation efficiency at patients with an insult have determined urgency of problem and expediency of realization of morphological researches at an experimental ischemia of a brain in various terms after reperfusion. Model of brain blood circulation disturbances was reproduced by clipping the right trunk of an anonymous artery for 40 minutes at rats. Morphological investigation was done after 1, 6, 24 hours and 3 and 7 days after reperfusion. Histological preparations studied by light microscopy after hematoxylin eosin treatment, immunohistochemical researches of Bcl-2 was done by "DAKO Citomation LCAB-2" (Denmark). It is established, that at experimental occlusion-reperfusion at brain observed changes are accrue in time after reperfusion. The greatest changes are found out in 6 hours after reperfusion when first attributes of apoptosis were established. There is reaction of socked formation around neuron by Bcl-2 labeled monoclonal antibodies. At the 7th day there were no apoptosis in brain tissues, but there was necrotic destruction. Necrotic process characterizes with the zone of fusions and independent arrangement Bcl-2 positive cells in the samples. Morphological changes in brain were shown as a hypostasis, chromatolisis, which achieved maximal expressiveness at 24 hours after reperfusion, characterized by swelling of neurons, dispersion of tigroid and nuclear basophylia. These attributes are adverse and can be examined as predictors of necrosis, developing on 7 day in brain after occlusion-reperfusion.

Keywords

an experimental ischemia of a brain, factors of apoptosis, Bcl-2, chromatolisis, necrosis.

REFERENCES

1. Nazirov F. G., Ibadov R. A., Abrolov H. K. *Principles of neuroprotection at acute brain blood flow circulation disturbances*. The manual. Tashkent, 2011.
2. Bizenkova M. N., Chesnokova N. P., Nevajjav T. A. Activation of lipoperoxidation as afferent part of cellular structures disintegration at hypoxic hypoxia. *Successes of modern natural sciences*. 2007, no. 7, pp. 65–68. (In Russian)
3. Boldirev A. A. Oxidative stress and a brain. *SEJ*, 2005, no. 8, pp.4–9.
4. Gusev E. I., Skvortsova V. I. *Ischemia of a brain*. Moscow, Medicine Publ., 2001, 326 p. (In Russian)
5. Kuhtevich I. I. *An ischemic insult*. Moscow, Medicine Publ., 2006, 170 p. (In Russian)
6. Piers E. *Gistohimija*. Moscow, Medicine Publ., 1962, 648 p. (In Russian)
7. Ibragimov U. K., Khaibullina Z. R. *Apoptosis*. The manual. Tashkent, 2007.
8. Ibragimov U. K. Hypoxi-ischemic encephalopathy in children. *Materials of the 2th World Congress of Neonatology*. -6th – 9th January. 2010, Luxor, Egypt, p. 18.
9. Muresanu D. F. Neurotrophic factors. *Bucuresti: Libripress*. 2003, 268 p.
10. Sloviter R. Apoptosis: a guide for perplexed. *Trends Pharmacology Sci.*, 2002, no. 23, pp. 19–24.