

На правах рукописи

ВОЛКОВА Дарья Анатольевна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В КОРЕ БОЛЬШИХ
ПОЛУШАРИЙ КРЫС ПРИ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ РАЗНОЙ
СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ**

03.03.01 – «физиология»

03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2012

Работа выполнена в лаборатории функциональной нейробиологии (заведующий лабораторией – кандидат биологических наук Михаил Михайлович Свинов) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (директор – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор Павел Милославович Балабан).

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ

Николай Степанович Косицын

кандидат биологических наук, **Михаил Михайлович Свинов**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, заведующий лабораторией нейробиологии сна и бодрствования Института Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН,

Владимир Борисович Дорохов

доктор биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной нейробиологии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,

Мария Анатольевна Александрова

Ведущая организация: Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра Высшей нервной деятельности.

Защита состоится «19» декабря 2012г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.044.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Автореферат разослан «__» ноября 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук



В.Н. Иерусалимский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы:

Нейродегенеративные процессы включают в себя процессы нарушения структуры и функции нервной ткани, а также гибель нейронов. Механизмы нейродегенеративных процессов еще до конца не изучены (Pereira C. et al., 2012). Задачей нашего исследования было проследить морфологические и функциональные перестройки при нейродегенерации на примере ишемии различной степени тяжести. В нашей работе мы уделили особое внимание нейронам коры головного мозга больших полушарий крыс, в частности верхним слоям коры больших полушарий головного мозга крыс. I слой коры больших полушарий представляет собой нейропил, состоящий в основном из дистальных дендритов пирамидных нейронов II-III слоев и части пирамид V слоя и оканчивающихся на них синапсов. Известно, что поверхностные слои коры страдают при неврологических и некоторых психических заболеваниях (Rita R. Romito-DiGiacomo et al., 2007; Jennifer I. Luebke et al., 2010). В предыдущих исследованиях было показано, что гипоксическое состояние мозга, вызванное передозировкой общих анестетиков, приводило к функциональному «выключению» коры, связанному с набуханием дистальных дендритов и формированием «пористого» нейропила в I слое коры. (Свинов, Косицын, 1990, 1991). Однако такое общее воздействие глубокого наркоза могло приводить к отключению и других систем мозга, в частности, главной системы, осуществляющей неспецифическую активацию всего мозга, - ретикулярной формации. Поэтому в данной работе мы локально и обратимо выключали исследуемую область коры больших полушарий головного мозга с целью исследования коррелятов между ЭЭГ-изменениями и как прогрессирующими патологическими, так и обратимыми морфологическими изменениями, происходящими в коре больших полушарий.

Нейродегенеративные процессы являются ключевыми в развитии ряда заболеваний, в частности, инсульта (ишемического и геморрагического), болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера и др. Следует отметить, что в структуре общей статистики заболеваемости в Российской Федерации заболевания, связанные с нейродегенеративными перестройками в ЦНС, занимают около 10% («Заболеваемость населения России в 2010 году.» Статистические материалы. <http://www.minzdravsoc.ru/docs/mzsr/stat/118>). Их особая социальная значимость определяется высокой степенью инвалидизации трудоспособного населения, а используемое в настоящее время лечение является весьма дорогостоящим (например, в

США на лечение болезни Альцгеймера ежегодно тратится более 50 миллиардов долларов) и малоэффективным (Centers for Disease Control and Prevention (2010). CDC Features: Alzheimer's disease. <http://www.cdc.gov/Features/Alzheimers/>). Важным аспектом является ранняя диагностика нейродегенеративных заболеваний. Учитывая тот факт, что нейродегенерация по ее морфологическим проявлениям начинается с дистальных отделов отростков нейронов, в нашем исследовании мы уделили особое внимание электрофизиологическим коррелятам при данной морфологической перестройке.

Цель исследования:

Структурно-функциональный анализ нейродегенеративных перестроек в коре больших полушарий при действии фокальной ишемии разной степени тяжести.

Задачи исследования:

1. Разработать методы, позволяющие локально и обратимо выключать различные структуры коры больших полушарий головного мозга.
2. Проанализировать динамику структурных изменений, происходящих в коре больших полушарий головного мозга крыс при ишемии разной степени тяжести.
3. Проследить взаимосвязь структурных изменений в коре больших полушарий головного мозга крыс после ишемического воздействия разной степени тяжести и электрофизиологических показателей: электрокортикограммы (ЭКоГ) и вызванных потенциалов (ВП).

Положения, выносимые на защиту:

1. При слабой локальной ишемии через 4 часа наблюдался отек поверхностных слоев коры (I-III), и особенно дистальных дендритов I слоя, который сохранялся в течение первых суток, а через 48 часов после ишемического воздействия обнаруживался лишь отек дистальных дендритов I слоя, что говорит об обратимости морфологических изменений при слабом ишемическом воздействии.
2. Функциональное выключение поверхностных слоев коры методом фотохимического тромбирования приводит к изменению дельта-колебаний в ЭКоГ, что выражается в усилении мощности в области дельта ритма, особенно его нижнего диапазона (0,5 -1 Гц) и в более раннем появлении дельта-

колебаний в ЭКоГ, после введения общего анестетика, по сравнению с интактными областями коры. При этом амплитуда вызванного потенциала не претерпевала значительных изменений.

3. При усилении ишемического воздействия появляются темные нейроны, что коррелирует с прогрессивным снижением амплитуды ВП и снижением мощности ЭКоГ по всем частотам.

Научная новизна работы:

Был разработан метод локального фотохимического тромбирования, который позволяет обратимо выключать различные области коры больших полушарий головного мозга крыс. Впервые было показано, что обратимые эдематозные изменения в верхних слоях коры, вызываемые слабым ишемическим воздействием, не сопровождаются выраженными морфологическими перестройками тел нейронов. Вышеописанные изменения в верхних слоях коры не вызывают значительных изменений амплитуды ВП и мощности частот ЭКоГ, кроме дельта ритма, в особенности его нижнего диапазона (0,5-1 Гц), мощность которого наоборот увеличивалась. Также было показано, что при локальной ишемии поверхностных слоев коры появление низкочастотной активности в ЭКоГ, вызванное введением общего анестетика, происходит раньше, чем в симметричной области коры контралатерального повреждению полушария мозга.

Практическая значимость работы.

Результаты нашей работы могут быть применены как в ранней медицинской диагностике нейродегенеративных заболеваний (при помощи методов регистрации ЭЭГ и ВП), так и в понимании значения данных структурных перестроек в поверхностных слоях головного мозга при патологии (гипоксии, ишемии). Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры высшей нервной деятельности МГУ и факультета психологии Международного славянского института.

Апробация работы:

Материалы диссертации были представлены на XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2008); Пятом междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии», школа-семинар «Инновационные технологии в диагностике и лечении заболеваний нервной

системы» (Судак, Украина, 2008); Межвузовской студенческой научной конференции «Инновационные технологии в научно-исследовательской деятельности» (Москва, 2008); XV международной конференции по нейрокибернетике. (Ростов-на-Дону, 2009); XVI международной конференции по нейрокибернетике. (Ростов-на-Дону, 2012); V международной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Павла Дмитриевича Харченко и 65-летию НИИ физиологии имени академика Петра Богача «Психофизиологические и висцеральные функции в норме и патологии» (Украина, Киев, 2010); XXI съезде физиологического общества имени И.П. Павлова (Калуга, 2010); Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2010» (Москва, 2010) и на научных конференциях молодых ученых Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН в 2008, 2009, 2010, и 2011 гг.

Диссертация апробирована на совместном заседании Лаборатории функциональной нейроцитологии и Лаборатории нейробиологии сна и бодрствования Института 27 июня 2012 года.

Публикации:

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 2 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК.

Объем и структура работы:

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 102 страницах машинописного текста, содержит 24 рисунка, 2 таблицы и 1 схему. Список цитируемой литературы включает 158 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект и методы исследования

Эксперименты проводили на 47 крысах-самцах линии Вистар массой 250-300 г. Эксперименты осуществляли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского Сообщества (86/609/ЕС) и одобренных Комитетом по медицинской этике в соответствии с положением Института ВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

Были проведены следующие серии экспериментов:

1. В первой серии экспериментов регистрировали и анализировали ЭЭГ и ВП до и через 4 часа после слабого ишемического воздействия. Далее производился морфологический анализ состояния неокортекса в области воздействия. (9 животных);
2. Во второй серии экспериментов регистрировали и анализировали ЭЭГ и ВП до и через 4 часа после сильного ишемического воздействия. Далее производился морфологический анализ состояния неокортекса в области воздействия. (8 животных);
3. В третьей серии экспериментов гистологически и электронномикроскопически исследовали динамику эдематозных изменений в коре больших полушарий крыс через 4, 24 и 48 часов после слабого ишемического воздействия (25 животных);
4. В четвертой серии экспериментов анализировали динамику ЭЭГ при наркотическом засыпании через 24 часа после слабого фотохимического тромбирования. Животных анестезировали золетилом (50 мг/кг) (5 животных).

3.1. Схема эксперимента:

Эксперимент с забором материала для морфологических исследований и с регистрацией электрофизиологических показателей (**1, 2 серии экспериментов**) проводился в несколько этапов:

1. День 1: Трепанация черепа над областью воздействия под уретановым наркозом (1,2 г/кг) и постановка электродов крысе;
2. День 2:

- Регистрация ЭКоГ, регистрация ВП в сенсомоторной коре в области представительства передней конечности на электрокожное раздражение передней конечности (контроль);
 - Фотохимическое тромбирование (длина волны – 535 нм, диаметр области - 2 мм, мощность светового потока для создания ишемического очага в поверхностных слоях - 0,6 мВт/мм² и 1,5 мВт/мм² для создания ишемического очага во всех слоях коры, длительность воздействия 75 секунд);
 - Регистрация ЭКоГ, регистрация ВП в сенсомоторной коре в области представительства передней конечности на электрокожное раздражение передней конечности (опыт);
 - Перфузия через 4 часа после фотохимического тромбирования.
3. День 3: Проводка экспериментального материала для исследования в световом и электронном микроскопе;
4. День 4: Его окрашивание (метод Ниссля для окрашивания пластиковых срезов, метод Гольджи).

Схема **третьей** серии экспериментов:

1. День 1: Трепанация черепа над областью воздействия под золетилловым наркозом (50 мг/кг);
2. День 2:
 - Фотохимическое тромбирование (длина волны – 535 нм, диаметр области – 2 мм, мощность светового потока для создания ишемического очага в поверхностных слоях - 0,6 мВт/мм², длительность воздействия 75 секунд);
 - Перфузия через 4 часа после фотохимического тромбирования;
3. День 3: Перфузия через 24 часа после фотохимического тромбирования.
4. День 4: Перфузия через 48 часов после фотохимического тромбирования.
5. День 5: Проводка экспериментальных участков коры для микроскопических исследований.
6. День 6: Окрашивание (метод Ниссля для окрашивания пластиковых срезов).

Четвертая серия экспериментов проводилась по следующей схеме:

1. День 1:
 - Трепанация черепа над областью воздействия под золетилловым наркозом (50 мг/кг);
 - Постановка электродов;

- Фотохимическое тромбирование (длина волны – 535 нм, диаметр области – 2 мм, мощность светового потока для создания ишемического очага в поверхностных слоях - 0,6 мВт/мм², длительность воздействия 75 секунд).
2. День 2:
- Запись ЭКоГ производилась после внутрибрюшинного введения золетила (50 мг/кг);
 - Перфузия через 21 час после фотохимического тромбирования.
3. День 3: Проводка экспериментальных участков коры для микроскопических исследований.

1. Операция.

В случае острого эксперимента в первый день эксперимента животные анестезировались уретаном (уретан, 1,2 г/кг). В случае хронического эксперимента использовался золетиловый наркоз 50 мг/кг. Крысы крепились в стереотаксическом приборе. Над черепом кожа рассекалась, мышцы сепарировались от кости, костную ткань очищали от крови, поверхность черепа отшлифовывали и выравнивали. После этого производилась трепанация черепа над сенсомоторной областью (представительство передней лапы) экспериментальной области коры больших полушарий лапы (координаты: L=3 мм, A=1 мм от брегмы по атласу Paxinos G. et al). Диаметр трепанационного отверстия – 3 мм. В правом полушарии трепанационное отверстие располагалось симметрично. Затем устанавливались имплантанты из плексигласа со встроенными биполярными хлорсеребряными электродами диаметром 0,3 мм и полем для фотохимического тромбирования. После наложения имплантантов с электродами они были зафиксированы с помощью протакрила. Края скальпа подрезались, и накладывался шов.

2. Фотохимическое тромбирование.

Фотохимическое тромбирование проводили на второй день эксперимента, т.е. после установки имплантантов, регистрировали ЭКоГ и ВП. Фотохимическое тромбирование производили в сенсомоторной коре в области представительства передней лапы (координаты: L=3 мм, A=1 мм от брегмы по атласу Paxinos G. et al., 1998).

Крысы крепились в стереотаксическом приборе, сначала производилась регистрация ЭКоГ, затем над областью предполагаемого поражения регистрировали ВП в ответ на электрокожное раздражение конечности, а также в отдалении от зоны ишемического воздействия и в симметричных точках контралатерального полушария. Далее животному внутривенно (через бедренную вену) вводился светочувствительный краситель бенгаловый розовый из расчёта 7,5 мг/кг. После этого к имплантанту крепился пластиковый световод, пропускающий свет зеленого лазера диаметром 2 мм. Через 2 минуты после введения бенгалового розового производилась засветка лазером (длина волны – 535 нм, диаметр области – 2 мм, мощность светового потока для создания ишемического очага в поверхностных слоях - 0,6 мВт/мм² и 1,5 мВт/мм² для создания ишемического очага во всех (слоях коры) длительностью 75 секунд.

3. Регистрация электрокортикограммы (ЭКоГ).

Регистрация ЭКоГ проводилась во второй день эксперимента до фотохимического тромбирования (контроль), а также через 4 часа после фотохимического тромбирования. С

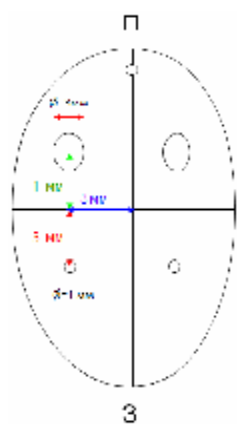


Схема 1. Расположение регистрирующих электродов на поверхности черепа крысы.

помощью кабеля регистрирующие электроды были подключены к аналоговому изолятору стимула Linear Isolator DL360 (NBLab, Россия), который соединялся с

усилителем NBL140 (NBLab, Россия). Эти устройства

были скоммутирова

ны с компьютером. Запись проводилась по 4 каналам: первый канал – левое полушарие (область воздействия) с координатами 0,5 мм от брегмы и 3 мм от медиальной линии, второй – интактная область в правом полушарии, расположенная

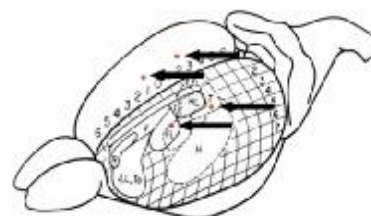


Рис.1. Координаты электродов, установленных над соматосенсорной областью коры больших полушарий крысы. Моторные зоны – сплошные линии, соматосенсорная область – пунктир; FL – передняя лапа, T – туловище. Точками обозначены места расположения электродов (в правом полушарии - симметричные точки).

симметрично первому (Рис. 1). Третий и четвертый каналы были отставлены каудально симметрично от первых двух каналов на 4 мм (Схема 1.).

При помощи программы EEGlab анализировали спектры мощности ЭЭГ, затем логарифмированные значения потенцировали и проводили подсчет мощности ЭЭГ с шагом 1 Гц. Полученные данные по каждому полушарию сравнивали до и после ишемического

воздействия, а затем данные по экспериментальному и контрольному полушариям сравнивали между собой. Анализировали отрезки ЭЭГ длительностью 9 минут.

Статистическая обработка результатов производилась в среде Statistica 6.0 для Windows по методу ANOVA с post-hoc анализом по U-критерию Манна-Уитни. Сравнение полученных результатов до и после воздействия производилось по критерию Вилкоксона для непараметрических данных, разброс данных на рисунках – стандартное отклонение.

4. Регистрация ВП.

Запись производилась во второй день эксперимента до фотохимического тромбирования (контроль), а также через 4 часа после фотохимического тромбирования в условиях уретанового наркоза. В качестве стимулирующих электродов использовались четыре хлорсеребряных электрода шириной 0,3мм и длина 1мм, соединённые с аналоговым изолятором стимула Linear Isolator DL360 (NBLab, Россия). Такие электроды устанавливались подкожно на обеих передних лапах предварительно наркотизированного уретаном (1,2 г/кг) животного. Соматосенсорные ВП регистрировались по 4 каналам, по которым записывалась ЭЖоГ. С помощью кабеля регистрирующие электроды были подключены к двухканальной системе сбора данных (усилитель с аналого-цифровым преобразователем) для биологических исследований NBL140. Во время регистрации животное находилось в экранированной камере.

После усиления и фильтрации (фильтр нижних частот – 0,1 Гц) электрическая активность мозга подавалась на аналого-цифровой преобразователь. После аналого-цифрового преобразования с частотой 10 кГц сигнал в цифровом виде записывался на персональный компьютер. Сбор данных и анализ ВП производился с помощью программного обеспечения DigiScore и AhoScore 9.0.

ВП регистрировались в ответ на стимуляцию правой и левой лап попеременно, прямоугольными импульсами тока силой 0,6 мА, длительностью 0,03мс с частотой 1 Гц.

Минимальное (как правило от 300-400 мкВ) и максимальное напряжение тока подбирались индивидуально.

Для анализа ВП, регистрируемых от сенсомоторной коры, было произведено усреднение 50 предъявлений стимула. Далее были подсчитаны латентные периоды и амплитуда компонентов.

Статистическая обработка результатов производилась в среде Statistica 6.0 для Windows по методу ANOVA с post-hoc анализом по U-критерию Манна-Уитни. Сравнение полученных результатов до и после воздействия производилось по критерию Вилкоксона для непараметрических данных, разброс данных на рисунках – стандартное отклонение.

5. Морфологический анализ.

Оценку силы инсультного повреждения, динамику нейродегенеративных процессов производили на фронтальных срезах мозга. Для этого после регистрации ЭКоГ и ВП наркотизированных животных (уретан, 1,2 г/кг) перфузировали растворами для электронной микроскопии: 1,5% глутаральдегида и 1% формалина на 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,4) и для световой микроскопии: 4% раствором параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере (рН=7,4). Далее мозг крыс обезживали и заливали в аралдит. Полутонкие срезы получали на ультратоме LKB-IV (Швеция) толщиной 1 мкм, окрашивали их по методу Ниссля для последующего анализа состояния нейронов и нейропиля всех слоев коры в световом микроскопе, и для точного выхода на нужный слой коры для электронномикроскопического исследования. Окрашивание полутонких пластиковых срезов производили на предметных стеклах в капле раствора 0,5% метиленовой сини и 1% буры. Также производили окрашивание по методу Гольджи.

Для электронной микроскопии мозг обезживали, заключали в аралдит. Затем затачивали пирамиду на уровне 1-го слоя коры, делали ультратонкие срезы толщиной 40-80 нм. Контрастирование полученных срезов проводилось растворами уранилацетата и лимоннокислого свинца, приготовленного по Рейнольдсу. Затем они были проанализированы в электронном микроскопе JEM-100B (Япония).

6. Методы статистического анализа морфологических данных

Полученные морфологические данные были сведены в электронные таблицы Excel, статистический анализ проводили с использованием программ “Microsoft office Excell 2003” и “Statistica 6.0”. Все значения даны в виде: $m \pm SEM$ (средн.знач.+ст.ош.средн).

Сравнение между группами (сильное и слабое ишемическое воздействие) при анализе данных гистологических исследований проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых групп. Значение $p < 0.05$ принималось как статистически значимое.

Результаты

4.1. Структурно-функциональные изменения в коре больших полушарий крыс при слабом ишемическом воздействии.

4.1.1. Морфологический анализ.

Введение бенгалового розового в кровеносную систему животного с последующей засветкой участка коры больших полушарий мозга приводило к обратимому локальному фотохимическому тромбированию сосудов, происходящему, согласно электронно-микроскопическим исследованиям, за счет агрегации тромбоцитов. Метод фотохимического тромбирования сосудов в основном применяется для моделирования инсульта, приводящего к образованию некротических изменений в различных отделах ЦНС. Для избирательного функционального «выключения» поверхностных слоев коры мы подбирали параметры засветки (по мощности светового потока лазера) таким образом, чтобы изменения в нервной ткани не затрагивали клетки глубоких слоев коры.

В результате слабого воздействия ишемическая область выглядит бледнее вследствие вакуолизации нейропиля, состоящего из отростков нейронов и глии. Участок повреждения локализуется в поверхностных слоях коры. Такое локальное воздействие в основном приводило к структурным перестройкам дендритов поверхностных слоев коры.

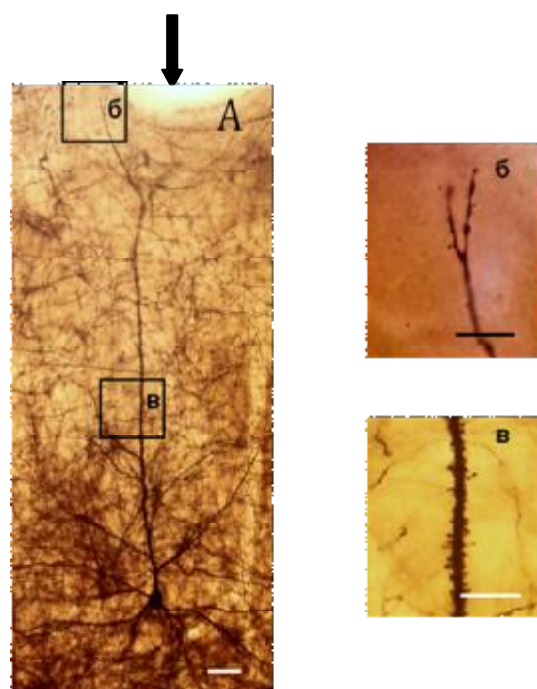


Рис.2. Варикозные расширения апикального дендрита пирамидной клетки, окрашенной по методу Гольджи. А - общий вид. Толстая стрелка - поверхность коры мозга. Шкала 10 мкм
Б - фрагмент дендрита на уровне плексиморфного слоя. Шкала 5 мкм.
В - фрагмент проксимального участка апикального дендрита с сохранными шипиками. Шкала 5 мкм

В некоторых случаях на фоне таких набухших дендритов происходил цитотоксический отек глиальных клеток и перичеселлюлярный отек сомы отдельных нервных клеток, редко встречались тела гиперхромных нейронов. Основная масса тел нейронов поверхностных слоев оставалась неповрежденной, в нижележащих слоях все нейроны были интактными.

Как уже было замечено, слабая локальная ишемизация коры больших полушарий в основном приводит к структурным модификациям дистальных дендритов I-III слоев, в результате чего на них формируются варикозные расширения, что отчетливо видно на срезах мозга, окрашенных по методу Гольджи (Рис.2). Данные структурные перестройки могут происходить вследствие нарушения структуры цитоскелета (Рис.4).

Проксимальные участки дендритов, находящиеся в III-V

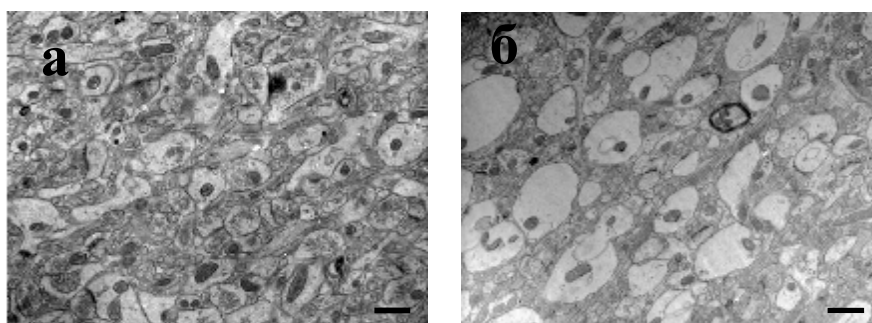


Рис.3. Варикозные расширения дендритов, электронная микроскопия, а) контрольная область коры, б) экспериментальная область коры с варикозностями. Шкала - 1μ.

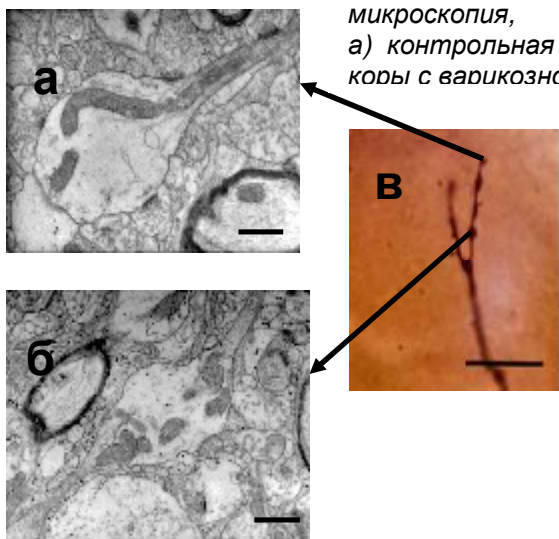


Рис.4. Варикозное набухание дендритов I слоя коры больших полушарий крыс. а), б) фотографии дендритов с электронного микроскопа. Шкала - 1μ. в) окраска по Гольджи, Шкала - 5μ

слоях, не обнаруживают каких-либо изменений: шипики остаются сохранными, их форма не видоизменяется.

Дендриты с варикозными расширениями не имеют правильного структурированного цитоскелета, но их митохондрии остались неповреждёнными (Рис 3, 4), что говорит о возможной обратимости данных изменений.

Отёчные дендриты напоминают конус роста, который определяет рост отростков нервных клеток в период эмбриогенеза. Вероятно, в основе процессов роста клетки и её противостояния стрессующим

воздействиям лежат одни и те же механизмы.

Таким образом, дистальные участки дендритов плексиморфного слоя коры являются наиболее реактивной и изменчивой частью нервной клетки, что выражается в

появлении на дендритном стволе варикозных расширений. Вероятно, что появление варикозностей на дендритах наряду с другими изменениями в них (например, исчезновение шипиков) может лежать в основе функционального "выключения" данных локусов нервной клетки.

Был проведен подсчет нормальных и патологических нейронов в области воздействия (площадь подсчета составляла 2 мм², подсчет велся в слоях I-VI при Ув. х5).

Из таблицы 1 видно, что при слабом ишемическом воздействии в области пенумбры преобладают нормальные нейроны, появляются потемневшие и темные нейроны, но нет пикнотических нейронов.

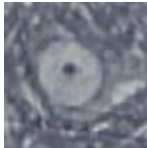
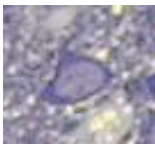


	Нормальные нейроны 	Потемневшие нейроны 	Темные нейроны 	Пикнотические нейроны 
Контроль	98.64 ± 2.4	1.36 ± 0.3	-	-
Слабое ишемическое воздействие	82.03 ± 5.4	11.97 ± 0.7*	5.98 ± 0.3*	-
Сильное ишемическое воздействие	60.88 ± 4.5*^	4.1 ± 0.2*^	13.56 ± 0.8*^	21.45 ± 1.0*^

Таблица 1. Соотношение типов патологических нейронов (в процентах) в области ишемического воздействия разной степени тяжести. Площадь подсчета составляла 2 мм², * - $p < 0.01$, сравнение контроля со слабым и сильным ишемическим воздействием, (N=17*10). ^ - $p < 0.01$, сравнение слабого с сильным ишемическим воздействием, (N=17*10). Сравнение между группами проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых групп с поправкой Бонферрони.

4.1.2. Электрофизиологический анализ.

Вызываемые слабым ишемическим воздействием отежные изменения в верхних слоях коры без выраженных морфологических перестроек тел нейронов, сопровождались

усилением мощности дельта-ритма ЭЭГ, но не происходило снижение мощности по всем частотам спектра ЭЭГ (Рис. 5.).

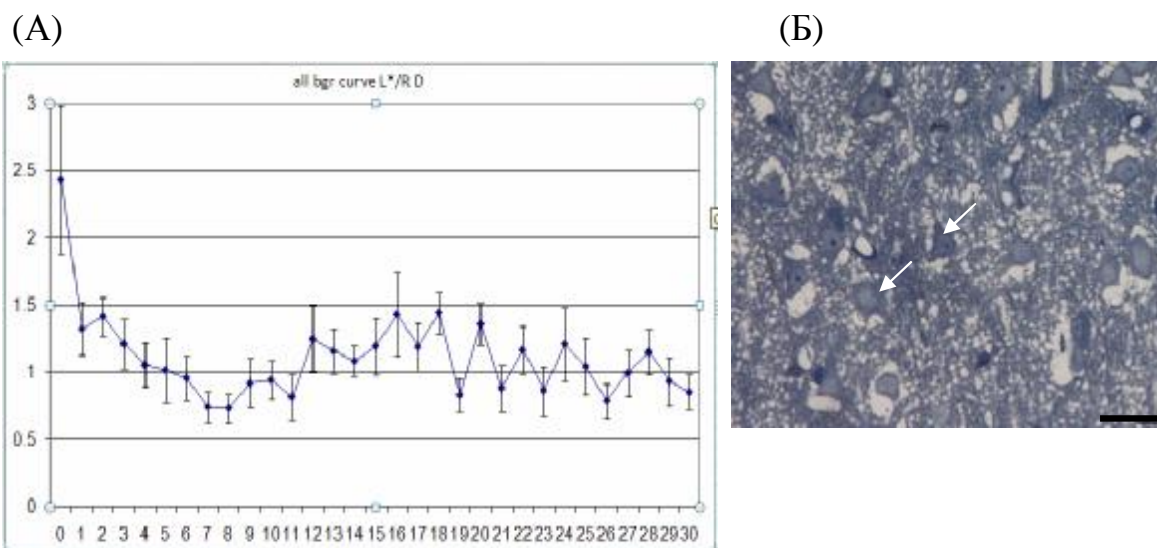


Рис. 5. (А) Мощность спектра ЭЭГ при фотохимическом тромбировании поверхностных слоев коры. (По оси Y - нормированное постишемическое значение мощности спектра ЭЭГ к предишемическому. По оси X - частоты Гц). (Б) Микрофотография II-III слоев коры больших полушарий головного мозга крысы, окраска по методу Ниссля, после слабого ишемического воздействия. Стрелками обозначены потемневшие нейроны. Шкала 20мкм.

Вышеописанные структурные изменения не вызывали статистически значимых снижений амплитуды ВП (Рис. 6.).

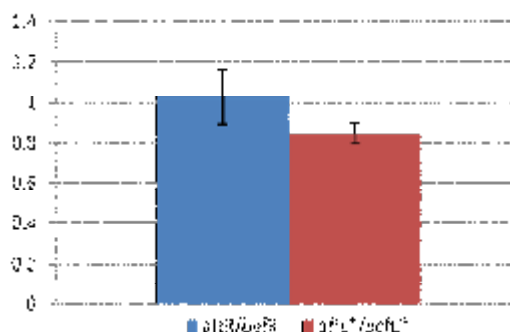


Рис. 6. Нормированные к контрольному уровню значения амплитуды ВП после слабого ишемического воздействия. Левый столбец – нормированная амплитуда ВП контрольного полушария, правый – нормированная амплитуда ВП экспериментального полушария. N=5.

4.2. Структурно-функциональные изменения в коре больших полушарий крыс при сильном ишемическом воздействии.

4.2.1. Морфологический анализ.

В результате сильного ишемического воздействия помимо формирования «пористого» нейропиля, набухшей микроглии и отечности сосудов на поверхности коры, в III-V слоях наблюдаются клетки с потемневшей цитоплазмой и пикнотические нейроны с ярко выраженным перичеселлюлярным отеком (Таблица 1).

4.2.2. Электрофизиологический анализ.

Анализ спектра ЭКоГ показал достаточно сильные различия между полушариями. Так в поврежденной области происходило снижение в диапазоне мощности всех частот ЭКоГ. (рис.7.А.).

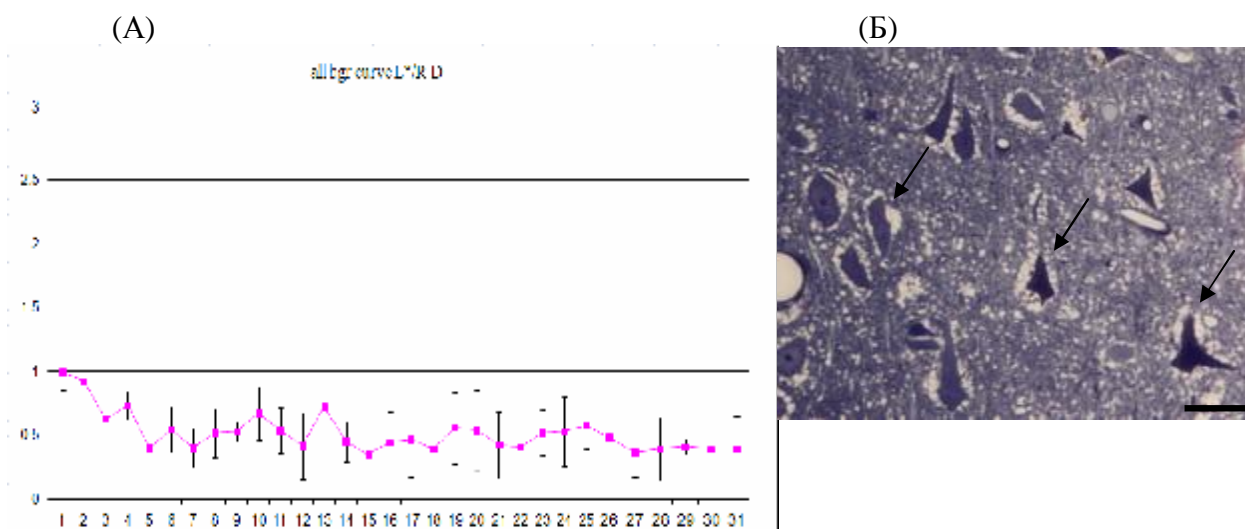


Рис. 7. (А) Мощность спектра ЭКоГ при фотохимическом тромбировании всех слоев коры. (По оси Y - нормированное постишемическое значение мощности спектра ЭКоГ к преишемическому. По оси X - частоты в Гц). (Б) Микрофотография II-III слоев коры больших полушарий головного мозга крысы, окраска по методу Ниссля, после сильного ишемического воздействия. Стрелками обозначены пикнотические нейроны. Шкала 20 мкм.

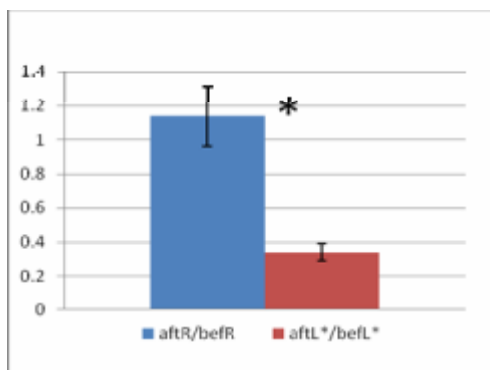


Рис. 8. Нормированные к контрольному уровню значения амплитуды ВП после **сильного** ишемического воздействия. Левый столбец – нормированная амплитуда ВП контрольного полушария, правый – нормированная амплитуда ВП экспериментального полушария. $P < 0,01$, $N = 5$.

Амплитуда вызванного потенциала после сильного ишемического воздействия уменьшилась по сравнению с доишемическим ВП (Рис. 8).

4.3.. Динамика структурных изменений в поверхностных слоях коры больших полушарий крысы в течение 48 часов после слабого локального ишемического воздействия

У животных через двое суток после слабого ишемического воздействия окраска тел нейронов была нормальной. Также у этих животных не наблюдались эдематозных изменений в нижних областях поверхностных слоев коры больших полушарий головного мозга, которые присутствовали лишь в виде варикозных расширений дендритов в I слое коры больших полушарий (Рис. 9). Также исследовали динамику площади эдематозных изменений в сенсомоторной коре больших полушарий крысы через 4, 24 и 48 часов после слабого локального ишемического воздействия. Подсчет площади отека велся на срезах коры головного мозга в области воздействия у 25 крыс, по 10 полей зрения при увеличении 20*10 на каждое животное. Из таблицы 2 видно, что через 24 часа после ишемического воздействия сохранялся отек верхних слоев коры, а уже через 48 часов наблюдался отек лишь дистальных дендритов. В этой серии экспериментов использовался гистологический материал, окрашенный по методу Ниссля.

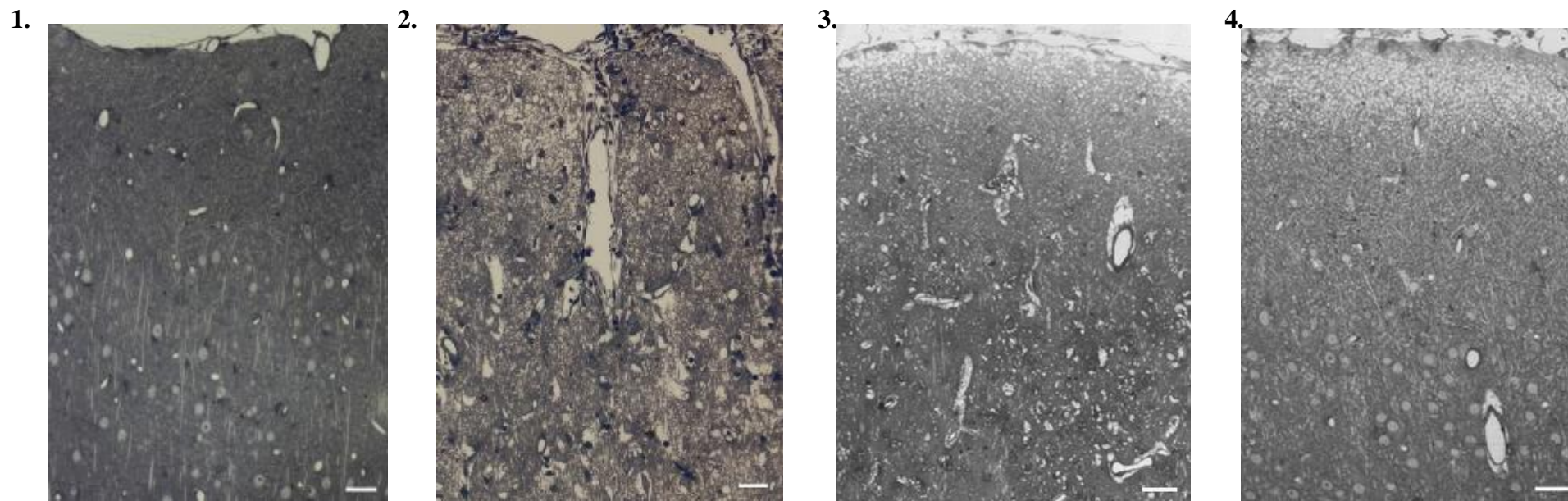


Рис. 9. Сенсомоторная кора больших полушарий крысы. Окраска по Нислю, увеличение 20*10, шкала 50мкм.
 1.Контроль. 2. 4 часа после слабого фотохимического тромбирования. 3. 24 часа после слабого фотохимического тромбирования. 4. 48 часа после слабого фотохимического тромбирования.

Норма, мм ²	4 часа, мм ²	24 часа, мм ²	48 часов, мм ²
0,00±0,00	1,03 ±0,21*	0,94±0,23*	0,42±0,11*^

Таблица 2. Изменение площади отека в сенсомоторной коре больших полушарий крысы через 4, 24 и 48 часов после слабого локального ишемического воздействия. N=25*10, * - $p < 0.01$ по сравнению с нормой по непараметрическому критерию Манна-Уитни для независимых признаков, ^ - $p < 0.01$ по сравнению с площадью отека через 4 часа после слабого ишемического воздействия по непараметрическому критерию Манна-Уитни для независимых признаков.

4.4. Динамика ЭЭГ при вхождении в наркоз.

В четвертой серии экспериментов анализировали динамику ЭЭГ при наркотическом засыпании через 24 часа после слабого фотохимического тромбирования. Такое воздействие вызывало стойкие эдематозные изменения нейропиля, которые сохранялись на протяжении 24 часов.

После введения общего анестетика золетила, появление низкочастотной активности (0,5-2 Гц) на ЭКоГ происходило раньше в области с “выключенными” поверхностными слоями, по сравнению с интактными областями коры (рис. 10). Как видно из рисунка 11 амплитуда низкочастотных колебаний (0,5-4 Гц) по первому каналу превышала почти в два раза таковую по второму каналу.

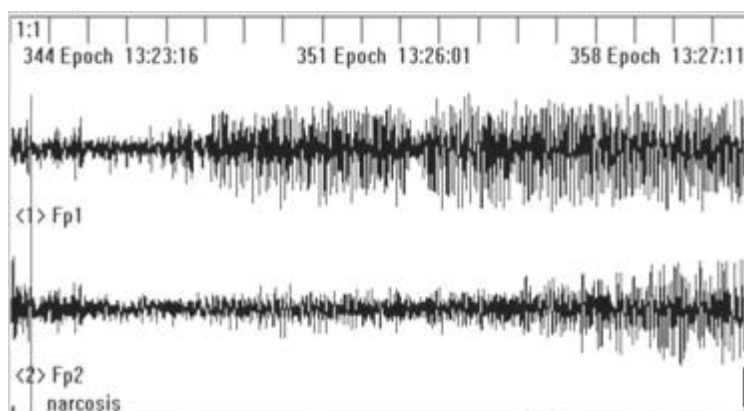


Рис. 10. Запись ЭЭГ после введения общего анестетика (отмечено вертикальной линией). Fp1 – левая сенсомоторная кора, область ишемического воздействия; Fp2 - симметричная, интактная область (правое полушарие). Метка – время введения общего анестетика. Калибровка - 200 мкв.

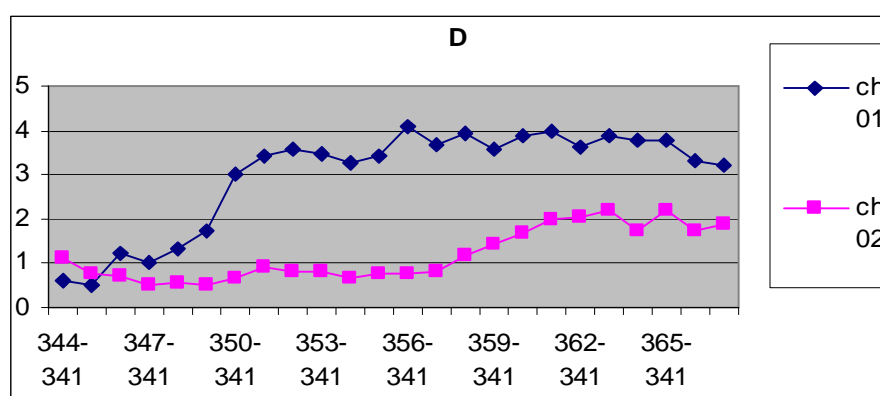


Рис.11. Изменение дельта – ритма после введения наркоза. Спектр мощности ЭКоГ в диапазоне дельта ритма, нормированный по отношению к преднаркотическому уровню. По оси абсцисс - эпохи анализа после введения наркоза, длина эпохи анализа – 10 с. По оси ординат - мощность ЭКоГ, нормированная по отношению к преднаркотическому уровню. Ch01 - левая сенсомоторная кора, область ишемического воздействия; Ch02 - симметричная область в правом полушарии.

Заключение

Известно, что поверхностные и нижние слои коры больших полушарий в функциональном отношении имеют свою определенную специфику, однако их конкретная роль и взаимодействие в процессе обработки информации и участие в генерации, в частности, определенных ритмов ЭЭГ до сих пор остается малоизученной. Методом фотохимического тромбирования сосудов в области сенсомоторной коры головного мозга крысы мы выключали верхние, а также все слои сенсомоторной коры для того, чтобы определить их вклад в работу головного мозга.

Нарушение каких физиологических механизмов вследствие ишемического инсульта ведут к усилению мощности дельта ритма, до сих пор остается неизвестным. Было сделано предположение, что увеличение медленноволновой активности может являться следствием деафферентации коры, причиной которой является ишемия в белом веществе (Edward Faught, 2012). Также появление дельта ритма после ишемии у человека связывали с необратимым повреждением корково-подкорковых связей (Mies et al., 1993; Fernandez-Bouzas et al., 2002; Finnigan et al., 2004; Jordan, 2004; Husain, 2006; Liebeskind, 2009; Sheorajpanday et al., 2009, 2010). В этих исследованиях площадь пораженной ишемическим инсультом ткани головного мозга велика, и, как правило, захватывала таламус и внутреннюю капсулу. Мы же выключали небольшую площадь ткани коры головного мозга крысы, не повреждая при этом белое вещество мозга, и предполагаем, что усиление мощности дельта ритма связано с функциональной деафферентацией проекций неспецифической активирующей системы мозга. Мы объясняем усиление мощности дельта ритма при слабом ишемическом воздействии морфологическими перестройками, связанными, в основном, с отечными изменениями в дистальных дендритах, в то время как, снижение мощности ритмов ЭЭГ при сильном ишемическом воздействии коррелирует с появлением пикнотических нейронов. Структурные изменения, вызванные локальной ишемизацией поверхностных слоев коры на раннем этапе развития нейродегенеративных процессов, направлены, по-видимому, на усиление тормозных, восстановительных процессов.

Ранее считалось, что увеличение мощности дельта ритма ЭЭГ и появление темных нейронов при экспериментальной ишемии у крыс - это признаки неблагоприятного прогноза течения заболевания. (Petra Henrich-Noack et al., 2007). Нами впервые было показано, что появление дельта ритма после экспериментального ишемического инсульта слабой степени тяжести в коре больших полушарий головного мозга крысы, не является

признаком плохого прогноза. В течение 48 часов нами наблюдалось восстановление структуры (исчезновение набухания дистальных отделов дендритов и потемневших нейронов) и функций экспериментального участка коры.

Ишемическое воздействие, по нашим данным, на поверхностные слои коры приводит также к усилению тормозных процессов, что выражается в облегчении входа в наркотический сон, другими словами в облегчении засыпания (и, следовательно, торможения). Так электрофизиологический анализ показал, что после введения общего анестетика (золетила), появление низкочастотной активности (0,5-2 Гц) на ЭЭГ происходит раньше в области с “выключенными” поверхностными слоями, по сравнению с интактными областями коры.

Известно, что ретикулярная формация оказывает активирующее действие на кору больших полушарий. К восходящей активирующей системе относятся ядра ретикулярной формации, к которым подходят коллатерали от восходящих сенсорных систем. Возникающие в этих ядрах нервные импульсы по полисинаптическим проводящим путям, проходя интраламинарные ядра таламуса, субталамические ядра к коре больших полушарий, оказывают на нее активирующее влияние. По данным Jones к средним слоям коры приходят специфические проекции от клеток, образующих ядерные структуры, тогда как клетки, диффузно распространённые по всему таламусу и не образующие ядерных структур, отдают проекции к поверхностным областям коры (Jones, 1998). Мы предполагаем, что механизм появления дельта ритма в поврежденном полушарии следующий: выключая поверхностные слои коры, мы функционально нарушаем проекции клеток таламуса в верхние слои коры, благодаря этому исчезает десинхронизация и появляется дельта активность.

Таким образом, варикозное расширение дистальных дендритов поверхностных слоёв коры приводит к усилению торможения в коре, что выражается, как в усилении дельта активности, так и в опережающем появлении в этой области дельта-волн при введении общих анестетиков. Усиление тормозных процессов происходит, по-видимому, за счёт ослабления активирующих влияний, приходящих в кору от неспецифических подкорковых систем.

Одной из характерных морфологических перестроек в верхних слоях коры при слабом ишемическом воздействии является набухание дистальных отделов дендритов. Известно, что именно с дистальных дендритов начинается нейродегенерация. На сегодняшний день нейродегенеративные заболевания широко распространены в мире и

очень часто встречаются в клинике. Локальная атрофия дистальных дендритов и их связей может наблюдаться на протяжении длительного времени без гибели нервной клетки. Атрофию дистальных дендритов пирамидных нейронов 2-3 слоя префронтальной коры больших полушарий наблюдали у крыс при действии кортикостероидов и стресса. При этом происходило уменьшение, как количества, так и протяженности отростков (Cook S.C. et al., 2004; Wellman C.L., 2001). Возрастные изменения в коре больших полушарий (обезьяны) заключаются не в гибели нейронов коры больших полушарий, как предполагалось ранее, а в истончении первого слоя коры больших полушарий, обусловленном дегенеративными изменениями дистальных дендритов и аксонов. Данные изменения приводили к дефициту в когнитивной сфере, который проявлялся, в частности, в ухудшении памяти (Peters A. Et al., 1994, 1996, 1998). Некоторые авторы не исключают, что при шизофрении возможна дегенерация в префронтальной коре мелких нейронов (Lewis D.A., 2002). Однако большинство исследователей сходится во мнении, что 5-10%-ное истончение префронтальной коры шизофреников обусловлено главным образом дегенерацией нейропиля: дистальных дендритов и их аксонных терминалей (Уранова Н. А. и др., 1989; Lewis D.A., 2002; Goldman-Rakic P.S. et al., 1997). Уменьшение размеров тел нейронов поверхностных слоев префронтальной коры, особенно нижнего 3 слоя (Goldman-Rakic P.S. et al., 1997), может быть обусловлено дегенеративными изменениями в нейропиле 1-2 слоев (Уранова Н. А. и др., 1989). Значительное повреждение дендритов без нейрональной гибели наблюдалось также при сублетальной гипоксии и активации глутаматных рецепторов (Park J.S. et al., 1996), введении β -амилоидного пептида (Ivins K.J. et al., 1998; White A.R. et al., 2001) и прионового пептида (White A.R. et al., 2001). Неврологические нарушения у больных с деменцией, обусловленной иммунодефицитом, вызванным вирусным заболеванием коррелирует с повреждением дендритов и аксодендротических связей (Masliah E. Et al., 1997), но не с гибелью нейронов (Adle-Biassette H. Et al., 1999; Everall I.P. et al., 1994).

В связи с этим результаты этой работы имеют не только значение в понимании роли верхних слоев коры в работе головного мозга, но и могут быть полезными в ранней медицинской диагностике нейродегенеративных заболеваний, так и в осознании значения данных структурных перестроек в поверхностных слоях головного мозга при патологии (гипоксии, ишемии).

С нашей точки зрения, вызываемые слабым ишемическим воздействием обратимые эдематозные изменения в верхних слоях коры, не сопровождающиеся

выраженными морфологическими перестройками тел нейронов, по-видимому, носят компенсаторный характер, направленный на определенные восстановительные процессы.

Выводы:

1. Разработан метод локального фотохимического тромбирования, который позволяет локально и обратимо выключать поверхностные слои коры больших полушарий головного мозга крыс и исследовать динамику обратимых изменений.
2. При слабой локальной ишемии через 4 часа наблюдался отек поверхностных слоев коры (I-III), и особенно дистальных дендритов I слоя, который сохранялся в течение первых суток, а через 48 часов после ишемического воздействия обнаруживался лишь отек дистальных дендритов I слоя, что говорит об обратимости морфологических изменений при слабом ишемическом воздействии.
3. Структурные изменения при локальной ишемии поверхностных слоев коры не вызывали снижение мощности частот ЭКоГ, но мощность дельта ритма, особенно его нижнего диапазона (0,5 -1 Гц), увеличивалась. Появление низкочастотной активности в ЭКоГ, вызванное введением общего анестетика, происходило раньше, чем в симметричной области коры контралатерального повреждению полушария мозга.
4. При слабой локальной ишемии поверхностных слоев амплитуда ВП не претерпевала значительных изменений в области воздействия по сравнению с амплитудой ВП в этой же области до ишемии.
5. При сильной локальной ишемии в области воздействия наблюдалось снижение в диапазоне мощности всех частот ЭКоГ и резкое снижение амплитуды ВП, что коррелировало с появлением темных нейронов в данной области.
6. Структурные изменения, вызванные локальной ишемизацией поверхностных слоев коры на раннем этапе развития нейродегенеративных процессов, направлены, по-видимому, на усиление тормозных, восстановительных процессов.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

1. А.Г. Малыгин, Н.С. Косицын, В.Д. Пономарева, Е.В. Голобородько, Д.А. Волкова, М.М. Свинов. Влияние диоксида углерода на импрегнацию серебром нервной ткани. *Биофизика*. 2011. Том 56, вып. 3, с 506-511.

2. Е.В. Голобородько, Д.А. Волкова, Н.С. Косицын, М.М. Свинов. Структурные перестройки и протекторное действие на различные локусы дендритов нейротрофических факторов, выделенных из орбы больших полушарий животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012. Том 154, №7, с.33-36.

Тезисы

1. Д.А. Волкова, Е.В. Голобородько. Структурно-функциональный анализ нейротекторного действия вытяжки из коры больших полушарий головного мозга животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт, XV Международный молодежный научный форум «Ломоносов» Тезисы конференции. МГУ. 2008. С.9
2. Д.А. Волкова, Е.В. Голобородько. Анализ механизма действия нейротрофических факторов при экспериментальной цереброваскулярной патологии. XI Конференция "Фундаментальная наука и клиническая медицина", тезисы. St. Petersburg, 2008. С.219.
3. М.М.Свинов, Е.В. Голобородько, А.Н. Макаренко, Д.А. Волкова, И.В. Назимов, Н.С. Косицын. Протекторное действие нейротрофических факторов, выделенных из коры больших полушарий животных, успешно перенесших экспериментальный геморрагический инсульт. Четвертый Международный Междисциплинарный IV Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым, Украина. 2008. С.265-266.
4. Н.С. Косицын, Е.В. Голобородько, Д.А. Волкова, М.М.Свинов. Структурные перестройки в поверхностных слоях коры больших полушарий, их функциональное значение и коррекция при гипоксическом воздействии на мозг. XV Международная конференция по нейрокибернетике Тезисы докладов. Ростов-на-Дону, 2009. Том 1. Секционные доклады, С. 24-26
5. А.Н. Макаренко, Н.С. Косицын, М.М.Свинов, Д.А. Волкова, А.Е. Кульчиков. Иммунокорригирующее действие нового антиинсультного средства «Церебрал» при инсульт-индуцированном иммунодефиците. V Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым, Украина. 2009. С. 151-152.
6. Н.С. Косицын, Д.А. Волкова, М.М.Свинов. Морфологические перестройки в дистальных дендритах как компенсаторная реакция при развитии нейродегенеративных процессов. XXI Съезд физиологического общества имени И.П. Павлова. Калуга. 2010. Тезисы докладов. С.305.
7. Н.С. Косицын, Е.В. Голобородько, Д.А. Волкова, М.М. Свинов. Функциональное значение структурных перестроек в поверхностных слоях коры при их экспериментальной локальной ишемии. V Международная научная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения профессора Павла Дмитриевича Харченко и 65-летию НИИ физиологии имени академика Петра Богача «Психофизиологические и висцеральные функции в норме и патологии». Украина, Киев, 2010. С.81.

8. Д.А. Волкова, Н.С. Косицын, Е.В. Голобородько, Н.А. Логинова, М.М. Свинов. Морфологические перестройки и их электрофизиологические корреляты при моделировании локальной ишемии разной степени тяжести в сенсомоторной коре крыс. VIII Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым, Украина. 2012. С.121-122.
9. Н.А. Логинова, Д.А. Волкова, Н.С. Косицын, М.М. Свинов. Влияние стимуляции анодом постоянного тока на структурные и функциональные изменения после инсульта, вызванного фотохимическим тромбированием. VIII Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Крым, Украина. 2012. С.252-253.
10. Д.А. Волкова, Н.С. Косицын, Е.В. Голобородько, Н.А. Логинова, М.М. Свинов. Структурно-функциональные изменения при моделировании локальной ишемии разной степени тяжести в сенсомоторной коре крыс. XVI Международная конференция по нейрокибернетике. Материалы конференции. Ростов-на-Дону, 2012. Том 1. Секционные доклады, С. 8-10.