

СТАТЬИ

УДК 616.831-005.4

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АСТРОЦИТОВ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ

Макарьева Л.М., Степанов С.С., Акулинин В.А.

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск,
e-mail: lyuba.mamontova.07@gmail.com, serg_stepanov@mail.ru, v_akulinin@outlook.com

Цель настоящего исследования – изучить пространственную организацию отростков астроцитов слоя I, III и V сенсомоторной коры (СМК) головного мозга крыс после необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий (ПОСА). Неполную глобальную ишемию головного мозга моделировали на белых крысах линии Wistar путём необратимой двусторонней ПОСА. Проводили сравнительную гистологическую, иммуногистохимическую и морфометрическую оценку соответствующих структур в норме ($n = 6$), через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ПОСА ($n = 30$). Использовали окраски по Ниссли и гематоксилин-эозином, иммуногистохимические реакции на GFAP. В ходе исследования установлен гетерохронный и гетероморфный характер изменений пространственной организации отростков астроцитов в разных слоях СМК. Через 1 сут после ПОСА происходило увеличение содержания реактивно измененных астроцитов с большим числом толстых отростков (гипертрофия отростков) с высокой очаговой плотностью распределения и усложнением фиброархитектоники. Эти изменения затрагивали и протоплазматические, и волокнистые астроциты СМК. Через 3 сут после ПОСА установлено максимальное содержание маркера GFAP во всех исследуемых слоях СМК: в слое I – 23,8%, в слое III – 20,9%, в слое V – 22,2%. Через 7 сут после ПОСА показатели лакунарности достигают максимальных значений за весь исследуемый период, фрактальная размерность в этот период статистически значимо снижается в сравнении с предыдущим сроком (Mann – Whitney U test; $p < 0,05$). В отдаленном периоде (через 14 и 30 сут) происходит увеличение фрактальной размерности и снижение лакунарности астроглиальной сети во всех исследуемых слоях СМК. Таким образом, при проведении фрактального анализа получена дополнительная количественная характеристика астроцитов, включающая площадь и форму распределения отростков астроцитов в пространстве. Согласно полученным результатам установлено, что пространственная реорганизация астроцитов, активация микроглиоцитов и олигодендроцитов способствовали выживанию нейронов в условиях ишемии.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, астроциты, иммуногистохимия, GFAP, фрактальный анализ, крысы Wistar

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN ASTROCYTES OF THE SENSORIMOTOR CORTEX OF WHITE RATS AFTER LIGATING THE COMMON CAROTID ARTERIES

Makareva L.M., Stepanov S.S., Akulinin V.A.

Omsk State Medical University, Omsk,

e-mail: lyuba.mamontova.07@gmail.com, serg_stepanov@mail.ru, v_akulinin@outlook.com

The aim of this study was to study the spatial organization of astrocyte processes in layers I, III, and V of the sensorimotor cortex (SMC) of the rat brain after irreversible bilateral ligation of the common carotid arteries (CCA). Incomplete global cerebral ischemia was modeled on white Wistar rats by irreversible bilateral PCA. A comparative histological, immunohistochemical and morphometric evaluation of the corresponding structures was carried out in the norm ($n = 6$), 1, 3, 7, 14 and 30 days after POCA ($n = 30$). Nissl and hematoxylin-eosin stains, immunohistochemical reactions for GFAP were used. The study established the heterochronous and heteromorphic nature of changes in the spatial organization of astrocyte processes in different layers of the SMC. One day after POCA, there was an increase in the content of reactive astrocytes with a large number of thick processes (process hypertrophy) with a high focal density of distribution and complication of fibroarchitectonics. These changes are present in both protoplasmic and fibrous SMC astrocytes. Three days after POCA, a high content of the GFAP marker was found in all cores of the SMC layers: 23.8% in residues I, 20.9% in residues III, and 22.2% in residues V. 7 days after POCA, lacunarity indicators reach their maximum values for the entire period of development, the fractal dimension in this period is found with age (Mann-Whitney U-test; $p < 0.05$). In the long-term period (after 14 and 30 days), there is an increase in the fractal dimension and a decrease in the lacunarity of the astroglial network in all the studied layers of the SMC. Thus, during the fractal analysis, an additional quantitative characteristic of astrocytes was obtained, including the area and shape of the distribution of astrocyte processes in space. According to the results obtained, it was found that the spatial reorganization of astrocytes, the activation of microgliaocytes and oligodendrocytes contributed to the survival of neurons under ischemia.

Keywords: cerebral ischemia, astrocytes, immunohistochemistry, GFAP, fractal analysis, Wistar rats

Астроциты участвуют во многих аспектах функционирования головного мозга, включая поддержание гомеостаза, развитие синапсов, поддержку нейронов, регуляцию мозгового кровотока, формирование и функцию гематоэнцефалического барьера

и контроль нейротрансмиттеров [1]. Регуляция функции синапсов обеспечивается выделением астроцитами глутаминергических трансмиттеров, которые поступают в межклеточное пространство. В качестве ведущего глутаминергического трансмиттера выступает глутамат, он активи-

вирует рецепторы NMDA, AMPA с целью быстрого обеспечения сигнала. Тем самым астроцит принимает участие в пластической регуляции синаптических процессов [2]. Установлено, что морфология астроцитов влияет на пространственные отношения не только с нейронами, но и с олигодендроцитами, сосудистыми клетками и другими астроцитами [3–5].

Любое, в том числе и ишемическое, повреждение головного мозга затрагивает астроциты. Установлено наличие прямой зависимости между степенью и характером морфологических изменений нейронов и астроцитов. Эффекты при активации астроглии двулики и могут быть направлены на защиту страдающей ткани головного мозга или на деструкцию поврежденных нейронов и стать причиной необратимых повреждений [6]. Нарушение функций астроцитов в условиях повреждения головного мозга является результатом окислительного стресса, деструкции митохондрий, нейровоспаления и глутаматной токсичности [2]. Реакция астроцитов может иметь отличительные особенности при разных патофизиологических вариантах ишемии головного мозга. Согласно литературным данным, изучена реорганизация астроцитов при разных экспериментальных моделях церебральной ишемии [1, 7]. Однако при субтотальной ишемии после необратимой двусторонней ПОСА пространственная организация отростков астроцитов СМК головного мозга подлежит более детальному изучению, поэтому цель настоящего исследования – изучить пространственную организацию отростков астроцитов слоя I, III и V СМК головного мозга крыс после необратимой двусторонней ПОСА.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрена этическим комитетом университета (протокол № 123 от 09 октября 2020 г.). В качестве экспериментальных животных использовали белых крыс линии Wistar массой 250–300 гр. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями Международного комитета по работе с лабораторными животными, поддержанными ВОЗ, директивой Европейского парламента № 2010/63/EU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей».

Неполную глобальную ишемию головного мозга моделировали путем необратимой двусторонней ПОСА. Животных наркотизировали введением Zoletil 100 (10 мг/кг, внутримышечно). Контролем служили ин-

тактные крысы без манипуляций на общих сонных артериях (n = 5). Через 1, 3, 7, 14 и 30 сут животных выводили из эксперимента. Под наркозом (Zoletil 100) сосудистое русло мозга промывали введением 100–125 мл раствора 0,9% NaCl и Фрагмина (5000 единиц) в левый желудочек сердца и фиксировали перфузией 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4) через аорту под давлением 90–100 мм рт. ст. в течение 15 мин. Через 1,5–2 ч вскрывали черепную коробку, бережно извлекали головной мозг и помещали его в аналогичный фиксатор. Материал хранился в холодильнике при температуре + 4 °С. Через 1 сут полученный материал заключали с помощью автомата «STP 120» в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы (толщиной 4 мкм) готовили с помощью микротомма HM 450 (Thermo) на уровне СМК: 1,2 – (-3,0) мм от Брегмы [8].

Общую качественную оценку нервной ткани и идентификацию нейронов проводили на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, тионином по методу Ниссля. Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах, помещенных на маркированные предметные стекла. Использовали мышинные моноклональные антитела к GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок астроцитов (MA5-12023) – мышинные моноклональные антитела, разведение 1–2 µg/mL (США). Для визуализации использовали набор реагентов на основе полимера NovoLink и пероксидазы NovoLink Polymer Detection System (Великобритания).

Препараты приготовлены в соответствии с инструкциями фирмы производителя реагентов, фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1.4×1.4 µm), изображение сохраняли в файлах с расширением tiff (2592×1944 пикселей), затем в Photoshop CC размерность увеличивали (до 3780×2835 пикселей/см, разрешение 600 пикселей/дюйм). Для достижения максимальной контрастности и четкости мелких отростков астроцитов в Photoshop CC проводили коррекцию изображения с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость). Дальнейшее морфометрическое исследование астроцитов проводили на масках 8-битовых черно-белых изображений (объектив ×40) с использованием программы ImageJ 1.53. Фрактальный анализ полученных изображений осуществляли с помощью плагина FracLac 2.5 (Box Counting Sampling Methods).

Определяли относительную площадь GFAP-положительного материала в поле зрения (по 80 полей зрения на каждый срок), фрактальную размерность (показатель заполнения пространства фрактальной структурой) и лакунарность (мера неоднородности заполнения пространства фрактальной структурой) для нейронов и астроцитов. Уменьшение фрактальной размерности свидетельствует об упрощении структуры клеток (например, о разрушении отростков), увеличение – об усложнении структуры (гипертрофия и разветвление отростков). Чем выше лакунарность, тем больше в поле зрения обнаруживалось асимметричных зон без хромогена (GFAP-негативных структур). Повышение показателя лакунарности выше контроля свидетельствовало о мелкоочаговом повреждении цитоскелета нейронов или астроцитов. Снижение показателя лакунарности свидетельствовало о гипертрофии и равномерном разветвлении отростков [9].

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями (Mann – Whitney U-test, ANOVA Kruskal-Wallis) с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft). Количественные данные в исследовании представлены: медиана (*Me* – 50% квартиль, *Q2*), интерквартильный разброс (*Q1-Q3* – 25–75%

квартили), (Min-Max), процентная доля (%). Проблема множественного сравнения решалась путем использования ANOVA Kruskal – Wallis [10].

Результаты исследования и их обсуждение

По данным иммуногистохимического изучения распределения GFAP-положительного материала на фронтальных срезах СМК в контроле выявлено однородное распределение хромогена с максимальной концентрацией вокруг кровеносных капилляров и в молекулярном слое (рис. 1). GFAP-положительный материал локализован в телах и отростках протоплазматических и волокнистых астроцитов. Относительная площадь GFAP-положительного материала в слое I – 16,6%, в слое III – 13,7%, в слое V – 15,9%.

В сером веществе СМК различают волокнистые и протоплазматические астроциты. Для волокнистых астроцитов характерно небольшое тело с длинными и слабо разветвленными отростками, они имеют древовидную организацию, высокая плотность GFAP-положительного материала содержится в отростках (рис. 1, Г, Д). Протоплазматические астроциты отличались крупным телом, толстыми и короткими отростками (рис. 1, В, Д). Оба вида астроцитов встречались в слоях III и V СМК мозга крыс.

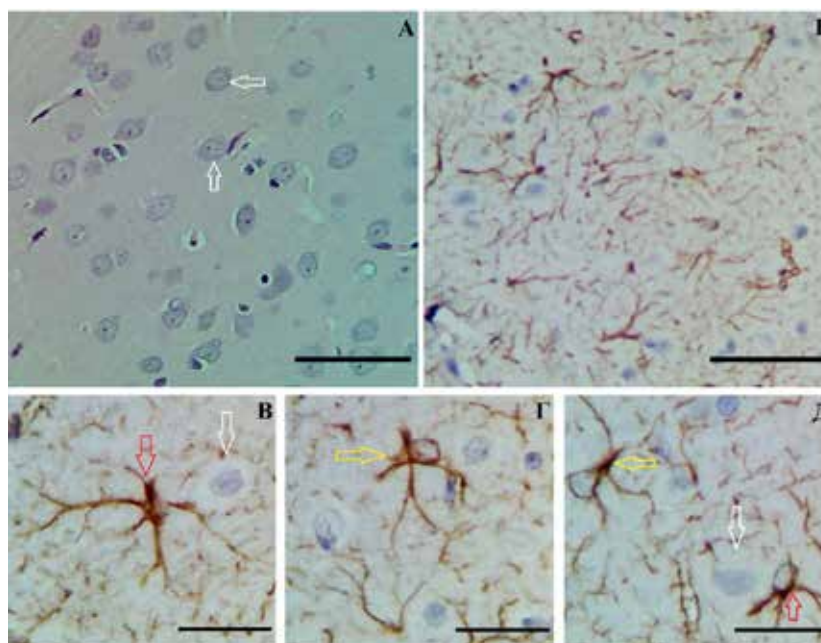


Рис. 1. Слой III (А–Г) и слой V (Д) СМК контрольной группы: А – нормохромные нейроны (белые стрелки) и нейрофибриллы (*); Б – равномерное распределение хромогена; протоплазматические (красные стрелки) и волокнистые (желтые стрелки) астроциты. Окраска: гематоксилин-эозином (А); иммуногистохимическое типирование GFAP (Б–Д). Объективы х 40 (А, Б), х 100 (В–Д), шкала – 25 мкм

По полученным в ходе фрактального анализа данным, в контрольной группе показатели заполнения фрактального пространства фрактальными структурами (телами и отростками астроцитов) при иммуногистохимическом исследовании препаратов, окрашенных на GFAP, в разных слоях СМК статистически значимо различались.

По результатам иммуногистохимического исследования относительной площади GFAP-позитивного материала установлено увеличение локального содержания маркера GFAP уже через 1 сут после необратимой двусторонней ПОСА. Максимальным содержанием маркера GFAP было в молекулярном слое СМК и составило 21,9% (Q2), здесь преобладали фиброзные астроциты. Минимальное содержание отмечено в слое V СМК – 17,6% (Q2). Значения в разных слоях статистически значимо отличались (Wilcoxon test между слоем I и слоем III – $p < 0,005$, между слоем I и слоем V – $p < 0,01$) (рис. 1). Через 1 сут после ПОСА происходило увеличение содержания реактивно измененных астроцитов с большим числом толстых отростков (гипертрофия отростков) с высокой очаговой плотностью распределения и усложнением фиброархитектоники. Эти изменения затрагивали и протоплазматические, и волокнистые астроциты СМК.

Через 3 сут после ПОСА установлено максимальное содержание маркера GFAP во всех исследуемых слоях СМК. В слое I – 23,8%, в слое III – 20,9%, в слое V – 22,2% (рис. 1). Через 7 сут после ПОСА в слое I СМК установлено статистически значимое снижение относительной площади GFAP до 18,6% (Mann – Whitney U Test; $p = 0,02$). Через 14 сут в слое I СМК отмечено увеличение относительной площади хромогена (GFAP) элементов глияльной сети СМК до 20,3% с последующим снижением этого значения до 17,8% через 30 сут после ПОСА (рис. 1). В слое III СМК через 7 сут после ПОСА относительная площадь маркера GFAP уменьшается до 18,6% и имеет статистически значимое различие с 3 сут (Mann – Whitney U Test; $p = 0,02$). Через 14 сут после ПОСА в слое III СМК показатель относительной плотности хромогена статистически значимо снизился до 15,9% (Mann – Whitney U Test; $p = 0,008$), затем через 30 сут после ПОСА произошло его увеличение до 16,85%. В слое V СМК через 7 сут после ПОСА относительная площадь GFAP статистически значимо снизилась до 16,0% (Mann – Whitney U Test; $p < 0,001$). Минимальных значений этот показатель в слое V СМК достигал через 30 сут после ПОСА и составил 14,6% (рис. 2).

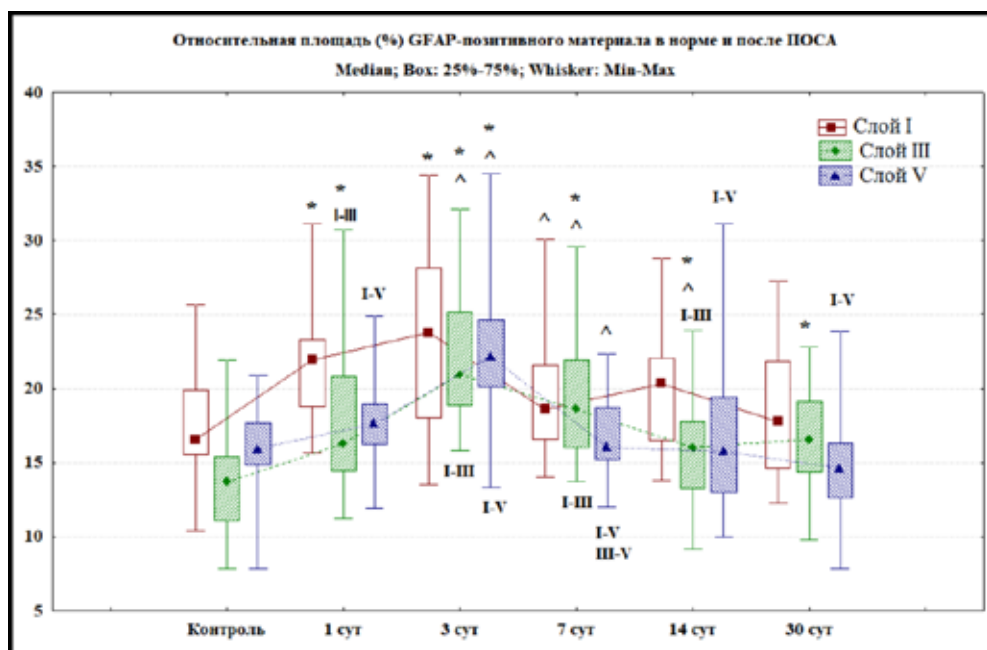


Рис. 2. Относительная площадь (%) хромогена при иммуногистохимическом выявлении (GFAP) элементов глияльной сети слоя I, III и V СМК в контроле и после ПОСА.

Примечания: * – различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U test; $p < 0,05$), I-III, I-V, III-V – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test; $p < 0,05$). При множественном сравнении по срокам (ANOVA Kraskel – Wallis) удалось отвергнуть нулевую гипотезу – слой I ($df = 5$; $H = 18,9$; $p = 0,002$); слой III ($df = 5$; $H = 46,3$; $p = 0,0001$); слой V ($df = 5$; $H = 40,6$; $p = 0,0001$)

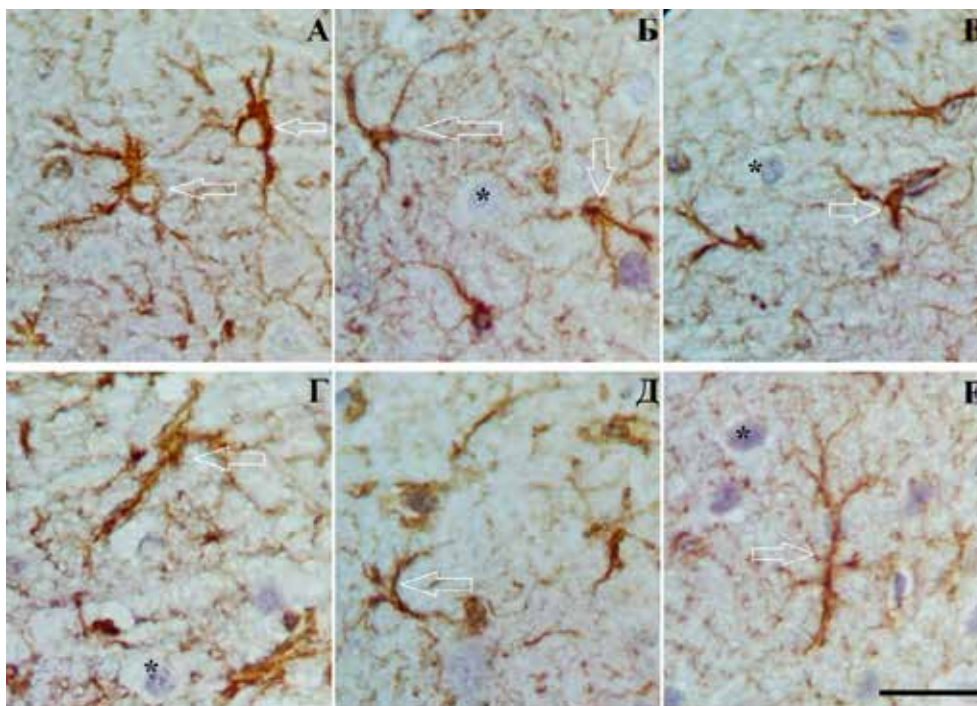


Рис. 3. Слой III (А, Б, В) и слой V (Г, Д, Е) СМК через 3 (А, Г), 7 (Б, Д) и 30 (В, Е) сут после ПОСА. Разная степень гипертрофии отростков астроцитов. Стрелки – указанные проявления. Окраска: иммуногистохимическое типирование GFAP. Объектив $\times 100$, шкала – 25 мкм

По результатам проведения фрактального анализа после ПОСА происходит пространственная реорганизация глиальной сети СМК мозга крыс. Вероятными причинами изменений могут быть деструктивные процессы отростков астроцитов вследствие возникшей гипоперфузии головного мозга, пролиферация и гипертрофия астроцитов. Через 1 сут после ПОСА выявлены статистически значимые изменения фрактальной размерности и лакуарности астроглиальной сети СМК. Фрактальная размерность в сравнении с контролем увеличивалась во всех исследуемых слоях СМК (Mann – Whitney U test; $p < 0,05$) (рис. 4). Через 3 сут после ПОСА выявлены статистически значимые изменения всех переменных (фрактальной размерности и лакуарности). Происходило статистически значимое увеличение фрактальной размерности во всех исследуемых слоях одновременно со статистически значимым уменьшением лакуарности в слое I и слое III СМК (Mann – Whitney U test; $p < 0,05$). Данные проявления могут свидетельствовать об увеличении площади GFAP-материала (рис. 2, 4).

Увеличение относительной площади GFAP-материала и увеличение фрактальной размерности астроглиальной сети может свидетельствовать о гипертрофических процессах, протекающих в отростках

астроцитов в ответ на ишемию, и может быть рассмотрено как компенсаторная реакция астроцитов (рис. 3).

Через 7 сут после ПОСА происходит статистически значимое снижение фрактальной размерности в сравнении с контролем и предыдущим сроком (Mann – Whitney U test; $p < 0,05$). Лакуарность достигает максимальных значений в этот период, происходит статистически значимое увеличение этой переменной в сравнении с предыдущим сроком (Mann – Whitney U test; $p < 0,05$). Это свидетельствует о появлении GFAP-негативных зон. Так же имеются статистически значимые различия между слоями III и V (Wilcoxon test; $p < 0,05$).

Через 14 и 30 сут после ПОСА происходит статистически значимое увеличение фрактальной размерности и снижение лакуарности астроглиальной сети во всех исследуемых слоях СМК. Происходило постепенное заполнение фрактального пространства отростками астроцитов.

Согласно данным литературы, после 20 мин ООСА выявлена количественная гетерогенность и гетерохронность изменений пространственной организации астроцитарных отростков в разных слоях гиппокампа. В остром периоде ишемии происходило уменьшение фрактальной размерности и значительное увеличение лакуарности.

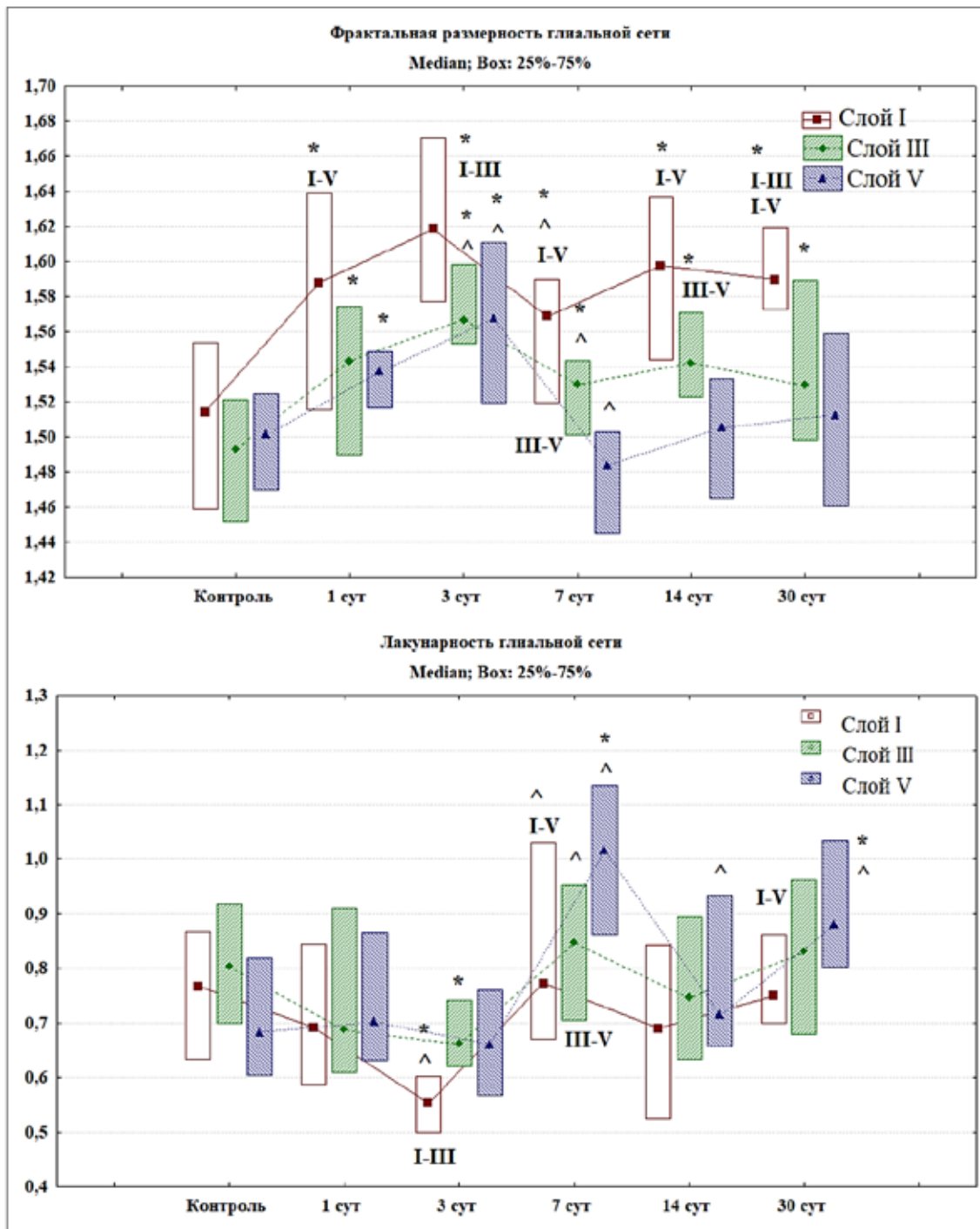


Рис. 4. Фрактальная размерность и лакунарность глиальной сети различных слоев СМК в контроле и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3)

Примечания: * – различия статистически значимы в сравнении с контролем, ^ – с предыдущим сроком (Mann – Whitney U test; $p < 0,05$), I-III, I-V, III-V – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test; $p < 0,05$).

При множественном сравнении фрактальной размерности по срокам (ANOVA Kraskel – Wallis) удалось отвергнуть нулевую гипотезу – слой I (df = 5; H = 22,8; $p = 0,0004$); слой III (df = 5; H = 44,6; $p = 0,0001$); слой V (df = 5; H = 31,8; $p = 0,0001$).

При множественном сравнении лакунарности по срокам (ANOVA Kraskel – Wallis) удалось отвергнуть нулевую гипотезу – слой I (df = 5; H = 23,6; $p = 0,0003$); слой III (df = 5; H = 12,8; $p = 0,02$); слой V (df = 5; H = 37,2; $p = 0,0001$).

Причиной деструкции отростков астроцитов были отек и набухание с разрушением цитоскелета [11, 12]. В неокортексе через 1 и 3 сут после 20 мин ООСА происходило разрушение части отростков астроцитов, а в других отростках происходили компенсаторные реактивные изменения. Через 7 сут после 20 мин ООСА увеличивалась численная плотность фиброзных астроцитов в субпиалярной зоне под наружной пограничной глиальной мембраной мозга. Начиная с 3 сут происходило восстановление характеристик астроцитарной фрактальной структуры неокортекса, но контрольного уровня они не достигали в течение всего периода наблюдения (30 сут) [7]. По нашим данным, через 3 сут после ПОСА отмечались адаптивные компенсаторные изменения отростков астроцитов, проявляющиеся уменьшением лакунарности и увеличением фрактальной размерности. Через 7 сут отмечалась очаговая деструкция отростков астроцитов. По всей видимости, часть отростков имела признаки компенсаторных изменений, в связи с чем через 14 и 30 сут после ПОСА происходило увеличение фрактальной размерности и уменьшение лакунарности.

Заключение

Таким образом, при проведении фрактального анализа получена дополнительная количественная характеристика астроцитов, включающая площадь и форму распределения отростков астроцитов в пространстве. Согласно полученным результатам установлено, что пространственная реорганизация астроцитов, активация микроглиоцитов и олигодендроцитов способствовали выживанию нейронов в условиях ишемии.

Список литературы

1. Xu S., Lu J., Shao A., Zhang J.H., Zhang J. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Front Immunol.* 2020. Vol. 26. No. 11. P. 294. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00294.
2. Гомазков О.А. Астроциты как компоненты регуляции высших функций мозга // *Нейрохимия.* 2019. Т. 36. № 4. С. 267–274.
3. Steliga A., Kowiański P., Czuba E., Waśkow M., Moryś J., Lietzau G. Neurovascular Unit as a Source of Ischemic Stroke Biomarkers-Limitations of Experimental Studies and Perspectives for Clinical Application. *Transl Stroke Res.* 2020. Vol. 11. No. 4. P. 553–579. DOI: 10.1007/s12975-019-00744-5.
4. Zhao Y., Yang J., Li C., Zhou G., Wan H., Ding Z., Wan H., Zhou H.. Role of the neurovascular unit in the process of cerebral ischemic injury. *Pharmacol Res.* 2020. Vol. 160. P. 105103. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105103.
5. Alia C., Cangi D., Massa V., Salluzzo M., Vignozzi L., Caleo M., Spalletti C. Cell-to-Cell Interactions Mediating Functional Recovery after Stroke. *Cells.* 2021. Vol. 6. No. 10 (11). P. 3050. DOI: 10.3390/cells10113050.
6. Amtul Z., Yang J., Lee T.Y., Cechetto D.F. Pathological Changes in Microvascular Morphology, Density, Size and Responses Following Comorbid Cerebral Injury. *Front Aging Neurosci.* 2019. Vol. 27. No. 11. P. 47. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00047.
7. Степанов В.А., Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Степанов А.С., Горбунова А.В. Реорганизация астроцитов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2019. Т. 105. № 5. С. 578–590.
8. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5-th ed. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press, 2005. 367 p.
9. Pirici D., Mogoantă L., Mărgăritescu O., Pirici I., Tudorică V., Coconu M. Fractal analysis of astrocytes in stroke and dementia. *Rom J Morphol Embryol.* 2009. Vol. 50. No. 3. P. 381–390.
10. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере.* 2-е изд. СПб.: Питер, 2003. 688 с.
11. Авдеев Д.Б., Степанов С.С., Акулинин В.А., Степанов А.С., Шоронова А.Ю., Самсонов А.А. Реорганизация астроцитов гиппокампа белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019. Т. 63. № 4. С. 13–22.
12. Becerra-Calixto A., Cardona-Gómez G.P. The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: Potential in Cell Therapy. *Front Mol Neurosci.* 2017. Vol. 50. No. 10 (159). P. 88.