

го патологічного стану.

Література

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии / Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А. науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. – Київ: Авіцена, 2002 р.- 156 с.
3. Лапач С. Н., Губенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях Excell. К.: Морион, 2001. 410 с.
4. Пак С.В. Сучасний стан та перспективи подальших досліджень слинних залоз на тлі цукрового діабету / С.В Пак, С.І. Черкашин // Клінічна стоматологія. – 2011. - №1-2. – С. 47 – 52.
5. Хесин Я. Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. М.: Медицина, 1987. 424 с.
6. Якимець М. М. Оцінка пародонта, слинних залоз, слизової оболонки порожнини рота у хворих на цукровий діабет / М. М. Якимець, М. З. Безкоровайна // Вісник наукових досліджень. – 2008. – № 1. – С. 62 – 64.

Яворская-Скрабут И.М., Герасимюк И.Е.

Динамика морфометрических изменений структур больших слюнных желез крыс при экспериментальной гипергликемии

Резюме. Морфометрическими методами изучены особенности структурных изменений паренхимы околоушных и подчелюстных слюнных желез крыс при гипергликемии. Установлено, что при моделировании стрептозотин-индуцированного сахарного диабета в организме животных развивались деструктивные процессы в больших слюнных железах, которые происходили на фоне нарушения гемодинамики. Они сопровождалась выраженным отеком, сужением просветов протоков, деструктивными изменениями их эпителия и ацинусов. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в эпителиоцитах конечных секреторных отделов

уменьшались с увеличением продолжительности гипергликемии. Установлены качественные и количественные гистологические изменения структурных компонентов паренхимы желез свидетельствуют о нарушении процесса образования и выделения секрета и наиболее выражены в околоушных слюнных железах через 3 месяца от начала экспериментального моделирования гипергликемии. Выявленные изменения нужно учитывать для проведения коррекции поражений слюнных желез при сахарном диабете

Ключевые слова: сахарный диабет, гипергликемия, морфометрия, слюнные железы.

I.M. Yavorska-Skrabut, I.Ye. Herasymyuk

Dynamics of Morphometric Changes of Structures of Large Salivary Glands of Rats in Case of Experimental Hyperglycemia

Summary. Peculiarities of structural changes of parenchyma components of parotid and submaxillary salivary glands of rats in case of hyperglycemia were studied with help of morphometric methods. Destructive changes in major salivary glands, accompanied with impaired hemodynamic, were found while simulating streptozotocin-induced diabetes mellitus in animals. Such changes were accompanied by edema, narrowing of ducts, as well as destructive changes in their epithelium and acini. The nuclear-cytoplasmic ratio in epithelial cells of terminal secretory units of parotid gland is decreased while increasing duration of hyperglycemia. Established qualitative and quantitative histological changes in the structural components of the parenchyma testify about disorders in the process of formation and excretion of saliva, and are mostly expressed in salivary glands in 3 months after beginning of the experimental hyperglycemia simulation. Revealed changes should be taken into consideration during correction of salivary glands lesions in patients with diabetes mellitus.

Key words: diabetes mellitus, hyperglycemia, morphometry, salivary glands.

Надійшла 01.03.2013 року.

УДК:616.831-005.001.57:616.31:577.322

Яременко Л.М.,¹ Грабовий О.М.,² Раскалей Д.В.,¹ Запривода Л.П.¹

Експресія синаптофізу в гангліонарному шарі сенсомоторної кори при моделюванні порушень церебрального кровообігу різного ступеня важкості у щурів

¹Кафедра гістології та ембріології (зав. каф. - член-кор АМНУ, проф. Ю.Б.Чайковський)

Національного медичного університету імені О.О.Богомольця

²Відділ патологічної анатомії (зав. – проф. О.М.Грабовий)

Національного інституту раку

Резюме. Проведені дослідження виявили пряму залежність між важкістю порушення кровообігу в головному мозку і зниженням експресії синаптофізину в гангліонарному шарі великих півкуль. Альтеративні зміни, обумовлені гострою ішемічною атакою, характеризуються, крім різкого зниження експресії синаптофізину в осередках інфарктів мозку, ще й помірними дифузними та виразними дрібноосередковими змінами.

Ключові слова: ішемія мозку, синаптофізин.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Порушення кровопостачання мозку – одне з актуальних питань сучасної медицини, що пояснюється, як тяжкістю наслідків кожного конкретного випадку хвороби, так і рівнем показників захворюваності, що сягають пандемії [1, 4]. Сучасна медична наука розглядає зміни при ішемії мозку, як складний багатовекторний процес зі специфічною кінетикою, на перебіг якого можна впливати, а не як одноманітну подію, як вважалося ще 20 років тому.

Пошкодження головного мозку в результаті ішемії тої чи іншої форми та ступеня завжди супроводжується вторинними або віддаленими структурними, функціональними та молекулярними змінами, які тривають від декількох місяців до декількох років. Одним із маркерів, який відображує

функціональні процеси у нервовій системі є білок синаптофізин (Син) [5, 6], що є інтегративним компонентом мембран синаптичних пухирців [2, 6]. Визначення експресії Син в тканині головного мозку дозволяє оцінити ступінь диференціювання та функціональну активність нейронів [7].

Мета роботи – вивчити зміни експресії синаптофізу в гангліонарному шарі сенсомоторної кори головного мозку щурів при моделюванні порушень кровопостачання у басейні лівої сонної артерії різного ступеня важкості.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження виконані на 115 самцях білих статевозрілих щурів лінії Вістар вагою 260-290 г. Тварини, використані в досліді, були поділені на 5 груп: 1 група – контроль (К), тварини, які не зазнавали ніяких дій (n=10); 2 група (ПО) – псевдооперовані, шуром виконувався доступ до лівої загальної сонної артерії й її мобілізація, після чого рана зашивалася (n=35); 3 група (ПСА) – з перев'язаною сонною артерією, після доступу до лівої сонної артерії та її мобілізації в неї вводилося 0,2 мл фізіологічного розчину та накладалася шовкова лігатура (n=35); 4 група (МЕА) – з мікроемболізацією кровоносних судин лівої півкулі головного мозку, (n=35) [3]. Всі оперативні втручання виконувалися під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг).

Головний мозок для досліджень забирався через 1, 3, 10, 30 і 90 діб після початку дослідження після введення тваринам тіопенталу натрію (200 мг/кг). Протягом 1 хв проводився розтин черепа шурів, виймався мозок, який фронтально розрізався на три частини і середня поміщалася у 10 % забуферений формалін (рН 7,4, 4°C) на 24 години. Матеріал ущільнювався в парафін і виготовляли гістологічні зрізи товщиною 4 мкм які забарвлювалися азур II-еозином.

Імуногістохімічну (ІГХ) реакцію для виявлення *Син* проводили відповідно з протоколом виробника. Гістологічні зрізи товщиною 4 мкм депарафінувалися ксилолом та регідратувалися. Демаскування антигенів здійснювалося у цитратному буфері рН 6.0 при 98°C протягом 20 хвилин, після чого зрізи промивалися буфером. Далі на зрізи наносився 3% розчин перекисі водню на 5 хвилин для пригнічення активності ендогенної пероксидази. Після 3-х кратного промивання у фосфатному буфері протягом 5 хвилин зрізи інкубували 30 хвилин в термостаті при 22°C з первинним антитілом проти *Син* (Synaptophysin Ab-2, Mouse Monoclonal Antibody, Clone: SYP02, Thermo Scientific, USA) у розведенні 1:50. Для візуалізації продуктів ІГХ реакції використовувалася система детекції EnVision™ FLEX, (Dako, Denmark). Зрізи докрашувалися гематоксилином Gill. У якості позитивного контролю використані зразки мозку шурів з визначеною позитивною реактивністю, а для негативного контролю проводили процедуру без застосування первинних антитіл.

Отримані гістологічні препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 (Nikon, Japan) за стандартизованих умов. Для аналізу отриманих зображень [5, 6] (збільшення мікроскопа x400, 1280x960 пікселів RGB) їх, за допомогою системи аналізу зображення ImageJ 1.46, піддавали трансформації у 8-бітні та вимірювали оптичну щільність симетричних ділянок гангліонарного шару кори великих півкуль (лівої та правої). Отримані цифрові дані оброблялися стандартними статистичними методами. Значимість відмінності експресії *Син* між контролем та дослідними групами, а також між враженою півкулею мозку та контралатеральною визначалася за критерієм Фішера.

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені спостереження показали, що кора півкуль мозку шурів контрольної групи має звичайну будову. Її гангліонарний шар містить великі нейрони. Більшість з них має велике округле світле ядро з добре помітним ядерцем та добре розвинену цитоплазму. Нейропіль має ніжно волокнистий вигляд. Тут також визначалися невеличкі за розмірами темні ядра гліоцитів. ІГХ дослідження виявило високу експресію *Син* в нейропіль, де навіть можна було іноді простежити окремі аксони за відкладенням гранул хромогену. У цитоплазмі нейронів лише зрідка виявлялися поодинокі гранули хромогену і вона виглядала світлим обідком навколо ядра. Навколо деяких нейронів, безпосередньо біля плазмолемі виявлялася тонка смужка високої експресії *Син*, що мало вигляд своєрідної капсули. Це може свідчити про варіабельність у щільності утворення синапсів з тілом гангліонарних клітин. Денсіометрична оцінка експресії *Син* між правою і лівою півкулями мозку не виявило достовірної відмінності, що дозволило об'єднати ці показники (табл.).

У шурів ПО через 1 добу після операції в корі лівої півкулі спостерігалася незначне розширення частини кровоносних мікросудин, перш за все капілярів, їх повнокрів'я. Інколи відзначався незначний периваскулярний набряк навколо судин венозного типу. Ці зміни гемомікроциркуляторного русла продовжували спостерігатися й через 3 доби після операції, а через 10 – практично вже не виявлялися. Клітинний склад гангліонарних шарів кори великих півкуль протягом експерименту не зазнавав достовірних змін. На цьому фоні виявлялася певна тенденція до зниження рівня експресії *Син* як у лівій, так і в правій півкулях, але яка не носила статистично достовірного характеру (Табл.).

При ПСА в корі лівої півкулі в ранній післяопераційний період (через 1 і 3 доби після травми) спостерігалася розширення одних кровоносних судин,

переважно вен, та спустошення інших. Відзначалися розповсюдженні явища периваскулярного набряку. В деяких кровоносних судинах через 1 і 3 доби після операції виявлялися крайові скупчення лейкоцитів. Серед нейроцитів гангліонарного шару через 1-3-10 діб виявлялося більше змінених нейроцитів, ніж у контролі та правій півкулі. Крім того, починаючи з 30 доби після травми тут визначалося деяке збільшення кількості гліоцитів.

Виявлення *Син* у тварин цієї групи показало достовірне зниження його експресії в лівій півкулі мозку у порівнянні з контролем через 3 і 10 діб після операції (Табл.). Хоча відмінність між півкулями і не виявлялася достовірною, це непрямим шляхом вказує на тенденцію до генералізованого зниження експресії *Син* в головному мозку внаслідок одногобічного порушення кровообігу.

За умов МЕА у лівій півкулі через 1 добу дослідження судин виявлялася різко розширеною з виразним периваскулярним набряком, ознаками стази. Іноді можна було спостерігати емболи, що складалися з жирових крапель. Периваскулярний набряк зберігався через 3 і 10 діб, і навіть через 30 діб після відтворення емболії навколо деяких венозних судин. Вже через 1 добу після початку дослідження при МЕА у лівій півкулі виявлялися різні за розмірами осередки дегенеративно-деструктивних змін. В їх складі нейропіль ставав дрібно комірчастим, а нейрони зазнавали дегенеративних змін. Через 3 доби у таких ділянках нейропіль ставав крупно комірчастим. У більших з них нейрони зазнавали некрозу, у дрібних – характеризувалися різним ступенем дегенеративних змін. До 10 доби після емболії у складі лівої півкулі на місці відносно великих осередків інфарктів починають утворюватися порожнини, які через 30 діб формували псевдокісти, а на місці менших некрозів – гліальні рубці, які виявлялися також через 90 діб дослідження. У ділянках гангліонарного шару кори лівої півкулі мозку за межами інфарктів спостерігалися виразні масові реактивні зміни нейроцитів, частина з яких виявляла ознаки некротичних змін. Кількість змінених клітин збільшувалася з 1 до 3 доби після емболії, після чого зменшувалася. У цілому, протягом дослідження у лівій півкулі при МЕА відбувалося поступове зменшення питомої кількості нейронів гангліонарного шару і зростала кількість гліоцитів.

При ІГХ дослідженні за умов МЕА через 1 добу дослідження в лівій півкулі відзначалося суттєве зниження експресії *Син*, особливо в осередках інфарктів (Табл.). За межами останніх часто спостерігалися невеличкі осередки розміром біля 100 мкм, де спостерігалася різке зниження експресії *Син*. Такі осередки виявлялися й через 3 та, дещо меншої виразності,

Таблиця. Експресія синаптофізу в гангліонарному шарі сенсомоторної кори великих півкуль головного мозку при моделюванні порушень церебрального кровообігу різного ступеня важкості у шурів (питома оптична щільність, умовні одиниці/мкм², М±δ)

Контроль	П	63,4±12,7					
	Л	66,3±9,6					
	М:П+Л	64,85±11,15					
Строк спостережень (доби)		1	3	10	30	90	
ПО	П	67,1±13,1	61,1±9,2	60,3±9,2	61,6±12,1	67,5±14,7	
	Л	65,2±12,4	60±9,6	59,3±13,9	64,4±14,8	64,1±11,2	
ПСА	П	62,9±9,1	61,7±9,1	60,7±9,3	63,7±13,1	61,9±11,6	
	Л	59,7±8,8	56,7±7,8*	57,5±8,1*	60,2±14,2	65,2±14,1	
МЕА	П	59,8±10,1	58,5±9,3	62,1±14,5	63,7±13,2	67,8±12,7	
	Л	54,1±7,5	48,1±6,8	51,3±7,0	55,9±8,2	59,9±8,3	
МЕА ОД	Л	44,2±6,1	22,2±7,5	15,1±3,4	12,7±5,2	19,8±4,3	

Контроль, ПО (псевдо оперовані), ПСА (перев'язка сонної артерії), МЕА (мікроемболия адипоцитами) – дослідні групи шурів; МЕА ОД – осередки деструкції при МЕА; П – права півкуля, Л – ліва півкуля, МП+Л – середнє значення для правої і лівої півкуль; * – достовірна відмінність від контролю; жирний шрифт – достовірна різниця між півкулями та між лівою півкулею і контролем

через 10 діб досліджу. З 30 доби після емболії відбувалося зростання рівня експресії *Син* в ураженій півкулі, але який залишався нижчим, ніж у контролі чи контралатеральній півкулі (Табл.).

У гліальних рубцях, вже починаючи з 10 доби досліджу, починали виявлятися поодинокі тяжі марковані хромогеном, кількість яких у подальшому поступово зростала. Подібна картина спостерігалася й у стінках псевдокіст. Крім того, через 30 і 90 днів після МЕА поблизу гліальних рубців та кист можна було спостерігати невеличкі локуси, де експресія *Син* ставала вищою, ніж у контролі.

Таким чином, проведені спостереження показали, що разом з дегенеративними та деструктивними змінами у мозку при порушенні його кровопостачання та ішемії відбувається зниження експресії *Син*. Отримані дані, дозволяють розглядати це явище як залежне від ступеня ішемічного ушкодження мозку, що збігається даними інших авторів [6]. При цьому характер змін експресії *Син* можна розділити на 3 форми: 1-а – загальне (фонове) зниження, що має широке розповсюдження і проявляється незначно або помірно; 2-а – різке зниження у осередках інфарктів; 3-а – виразне фокальне зниження за межами інфарктів (у невеликих осередках діаметром близько 100 мкм).

Незважаючи на реалізацію компенсаторних та відновлювальних процесів в ураженій півкулі, зниження рівня експресії *Син* зберігалися в ній і у віддалені (1 і 3 місяці) строки після порушення кровопостачання. Альтеративні зміни, обумовлені гострою ішемічною атакою, що трансформуються в повільно прогресуючий нейродегенеративний процес з кількісними змінами клітинного складу кори великих півкуль – збідніння нейронами та збільшення питомої кількості гліоцитів, знаходить своє відображення й у загальному зменшенні вмісту *Син*. Разом з цим, показниками активних відновлювальних процесів, що відбуваються після ішемічного ураження [2, 6], є виявлені осередки гіперекспресії *Син* поряд з гліальними рубцями та псевдокистами, а також появи новоутворених аксонів у гліальних рубцях. Зниження експресії *Син* в ділянках мозку по за межами ділянок з виразними дегенеративно-деструктивними змінами вказує на системні порушення синаптичної передачі в мозку, що співпадає з даними фізіологічних досліджень [6].

Висновки

1. Проведені дослідження виявили пряму залежність між важкістю порушення кровообігу в головному мозку і рівнем експресії синаптофізину в гангліонарному шарі великих півкуль.

2. Мінімальні зворотні дисциркуляторні зміни у головному мозку супроводжуються незначним загальним зниженням експресії синаптофізину, що не є статистично достовірним. Стійкі дисциркуляторні зміни, викликані перев'язкою сонної артерії, характеризуються достовірним транзиторним фоновим зниженням експресії синаптофізину з боку ураження.

3. Альтеративні зміни, обумовлені гострою ішемічною атакою, характеризуються, крім різкого зниження експресії синаптофізину в осередках інфарктів, ще й помірними ди-

фузними та виразними дрібноосередковими змінами.

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку полягає у поглибленні уявлень про морфофункціональні зміни у мозку при порушеннях кровообігу, а також як одну з ознак оцінки ступеню важкості ішемічного ураження.

Література

1. Зозуля І. С., Мошенська О. П. Гострий період ішемічного інсульту: Сучасний погляд на проблему. // Укр. мед. часопис. – 2009. – № 4 (72). – С. 67-73.
2. Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В., и др. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Том V, № 3. – С.57-63.
3. Пат. 34604 Україна. МПК G09B 23/00. Спосіб моделювання ішемічного ураження мозку / Грабовий О.М., Яременко Л.М., Панишина Н.Г.; заявник й патентовласник Національний медичний університет імені О. О. Богомольця. - № u200805453; опубл. 11.08.2008 Бюл. №15.
4. Суслина З. А. Пирадов М. А. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика. – М.: «МЕДпресс-информ», 2008. – 288с.
5. Хренов А.И., Беличенко П.В. Количественный анализ синаптофизина (p38) в мозге потомства второго поколения от самцов крыс с длительной морфинной интоксикацией. // Бюл. эксперим. биол. – 2000. – №1 (129). – С.50-52.
6. Han Gil Seo, Dae-Yul Kim, Hee Won Park et al. Early Motor Balance and Coordination Training Increased Synaptophysin in Subcortical Regions of the Ischemic Rat Brain // J Korean Med Sci.- 2010.- V. 25.- P. 1638-1645.
7. Portela-Gomes, Stridsberg, M., Johansson, U., Grimelius, J. Colocalisation of synaptophysin with different neuroendocrine hormones //Histochem. Cell Biol.- 1999.- V. 111 (1).- P. 49–54.

Яременко Л.М., Грабовой А.Н., Раскалей В.Б., Запривода Л.П.

Експресія синаптофізину в гангліонарному шарі сенсорно-моторної кори при моделюванні порушень мозкового кровообігу різної ступеня тяжкості у крыс

Резюме. Проведені дослідження виявили пряму залежність між важкістю порушення кровообігу в головному мозку і зниженням експресії синаптофізину в гангліонарному шарі великих півкуль. Альтеративні зміни, обумовлені гострою ішемічною атакою, характеризуються крім різкого зниження експресії синаптофізину в осередках інфарктів мозку, ще й умереними дифузними та виразними мелкоочаговими змінами.

Ключові слова: ішемія мозку, синаптофізин.

L.M. Yaremenko, A.N. Grabovoy, V.B. Raskalei, L.P. Zaprivoda
Synaptophysin Expression in Ganglionic Layer of the Sensorimotor Cortex after Cerebral Circulatory Disorders Simulation of Varying Severity in Rats

Summary: Our studies have revealed a direct relationship between the severity of blood circulation in the brain, and reduced expression of synaptophysin in the ganglionic layer of the cerebral hemispheres. Alternative changes resulting from acute ischemic attack are characterized not only by a sharp decline of synaptophysin expression in the brain infarct but also by moderate diffuse and expressive small-focal changes.

Key words: brain ischemia, synaptophysin.

Надійшла 01.03.2013 року.