

Summary

DETECTION OF PLA⁺-LYMPHOCYTES-HELPERS IN CADUCA DURING II TRIMESTER IN SPONTANEOUS MISCARRIAGE AND IN PARTURIENT WOMEN

Kushch O.G.

Key words: placenta, I and II trimester of pregnancy, helper-lymphocytes, bean lectin

This paper is the first to present the distribution of PLA⁺-lymphocytes-helpers in caduca parturient women and after spontaneous miscarriages during the second trimester of pregnancy by using the lectin- histochemical technique. We used a bean lectin to study helper-lymphocytes in the caduca during the second trimester of pregnancy after miscarriages and in parturient women with normal pregnancy and pregnancy complicated by antigenic exposure. In cases of spontaneous abortions in the second trimester of pregnancy the number of RLA⁺-lymphocyte-helpers is minimally uncounted, which indicates the absence of humoral immunity in the decidua of the uterus. Antigenic impact on the body of a pregnant during the third trimester of pregnancy and Rh incompatibility result in the activation of humoral local immunity of the uterus against the background of the suppression of cytotoxic immunity by reducing the number of CD8 + lymphocytes.

УДК 616.831–005.1–092.9

Макаренко А.Н., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А., Крайнева В.А.

ОСОБЕННОСТИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У КРЫС С ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ ГЕМАТОМОЙ

ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва

Установлено, что у крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой (новая модель геморрагического инсульта, ГИ) через 7 месяцев после операции наблюдаются нарушения обучения и памяти, ориентировочно-исследовательского поведения и двигательной активности, повышенный уровень тревоги. Морфологические исследования показали, что у этих крыс определяется выраженная активация восстановительных процессов в пятом и, особенно, третьем слое сенсомоторного неокортекса. Определяется увеличение нейроглиального индекса пирамидных нейронов и гигантских пирамидных нейронов правого полушария (область моделирования ГИ) по сравнению с левым (без ГИ) и мозгом контрольных ложнопериоперированных животных.

Ключевые слова: геморрагический инсульт, поведение, память, морфология

Известно, что комплексное лечение последствий инсульта, как правило, не приводит к полному выздоровлению пациента. В частности, у 60%-70% больных в отдаленном периоде после инсульта отмечается развитие осложнений, приводящих к стойкой постинсультной инвалидизации, повышается риск возникновения повторного инсульта [10,11,15]. Одной из причин недостаточной эффективности лекарственной терапии постинсультных состояний может быть отсутствие четких представлений о патогенетических особенностях развития отдаленных последствий инсульта, таких как интеллектуально-мнестические нарушения, непсихотические расстройства и когнитивное снижение [15]. В современной экспериментальной фармакологии моделируют, главным образом, острый инсульт [2,9,13], а развивающихся в ЦНС нарушения в отдаленном периоде после инсульта изучены недостаточно. Ранее была разработана новая модель интрацеребральной посттравматической гематомы, геморрагического инсульта и показана адекватность ее использования в нейрорепарационной фармакологии для изучения нейропротективных свойств препаратов [2,3,7].

Цель исследования

Изучение морфофункциональных особенностей (поведения и памяти, структурно-функциональных и нейроглиальных взаимоотношений) в соматосенсорной области неокортекса крыс через семь месяцев после моделирования интрацеребральной посттравматической гематомы – геморрагического инсульта (ГИ).

Методика исследования

Исследования выполнены на белых крысах самцах, линии Вистар, массой 180-210 г в начале эксперимента и 350 - 420 г при его завершении. Острый аутогеморрагический инсульт моделировали в области внутренней капсулы правого полушария [2,8]. Крысам, наркотизированным хлоралгидратом (200 мг/ кг, в/б) при помощи специального устройства (мандрен-нож) и стереотаксиса осуществляли деструкцию мозговой ткани в области capsule interna, (координаты Н=4 мм, L=3.0 мм, А=1,5 мм от брегмы по атласу G. Paxinos) с последующим (через 2-3 минуты)

введением, в место повреждения, крови, взятой из-под языка (0,02- 0,03 мл). Ложно оперированным животным проводили скальпирование и трепанацию черепа. Через 7 месяцев у выживших животных (8 интактных крыс, 8 ложнооперированных и 12 крыс с ГИ) регистрировали поведение и состояние животных по стандартным методикам, традиционно используемым в нейрорепсихофармакологии [2,4]. Неврологический статус у крыс определяли с использованием метода Mc Grow в модификации И.В. Ганнушкиной [5], ориентировочно-исследовательское поведение и двигательную активность - в открытом поле, уровень тревожности – в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта ПКЛ), обучение и память изучали, используя методику условного рефлекса пассивного избегания УРПИ) (Lafayette Instrument Co., США). [14]. Через 72 часа после завершения изучения поведения и памяти крыс декапитировали, извлекали головной мозг и проводили морфологическое исследование неокортекса. Материал фиксировался в 10% растворе нейтрального формалина и заливался в парафин. Фронтальные гистологические срезы головного мозга толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, тионином (по Ниссю), азури II-эозином, синим Эванса – пикриновой кислотой и кислым фуксином (по Новели) [7,12]. Морфометрию клеток соматосенсорного неокортекса проводили, измеряя площади и периметры пирамидных (III слой) и гигантских пирамидных (V слой) нейронов. Оценивали количество глиоцитов, прилежащих к этим клеткам (нейроглиальный индекс). В исследовании были использованы мик-

роскоп Olympus BX51 с цифровой камерой Olympus C4040ZOOM и компьютер с программным обеспечением Olympus DP-Soft3,2. Статистическую обработку результатов морфометрических исследований проводили с использованием стандартных статистических методов [1,9].

Результаты исследования

Изучение поведения животных через 7 месяцев после ГИ показало, что у крыс наблюдались лишь незначительные нарушения неврологического статуса в сравнении с контрольной группой ложнооперированных животных. Так, если у ложнооперированных крыс слабые неврологические нарушения наблюдались в 30% случаев, то в группе с ГИ этот показатель составлял 50%. При этом ни в одной из групп не отмечались грубые нарушения неврологического статуса. При регистрации ориентировочно-исследовательского поведения в открытом поле показано, что у крыс с ГИ через 7 месяцев после операции сумма всех показателей поведения (горизонтальные перемещения, вертикальная активность, обследование отверстий) была в 1,3 раза меньше, чем в контрольной группе ложнооперированных крыс и составляла $16,48 \pm 1,08$, в контроле - $19,80 \pm 2,21$. Вместе с тем, у животных с ГИ отмечалось изменение стратегии поведения в приподнятом крестообразном лабиринте. Как видно на таблице 1, в отличие от крыс контрольной группы, проводивших около 30 секунд в открытых не защищенных рукавах лабиринта, опытные животные с ГИ вовсе не заходили туда, а осуществляли только один заход в темную камеру и проводили в ней почти все время эксперимента.

Таблица 1.

Поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте через 6 месяцев после геморрагического инсульта.

Показатели поведения	Контроль (ложнооперированные крысы)	Опыт (крысы после ГИ)
Латентное время первого захода в рукав (сек.)	$5,4 \pm 1,0$	$9,83 \pm 2,53^*$
Время, проведения в закрытых рукавах (сек.)	$28,2 \pm 11,5$	0
Время, проведения в открытых рукавах (сек.)	$185,3 \pm 30,3$	$290,2 \pm 2,53$
Количество заходов в открытые рукава	$1,3 \pm 0,3$	0
Количество заходов в закрытые рукава	$1,8 \pm 0,4$	1*

*-достоверность отличий от контроля при $P \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Подобное поведение свидетельствует о повышенном уровне тревожности у этих крыс. Обучение условной реакции пассивного избегания показало, что при воспроизведении рефлекса почти все ложнооперированные животные (83,3%) помнили об ударе током в темной камере и не заходили туда или заходили с большим

латентным временем рефлекса. В то время как в опытной группе о ситуации помнило только 16,6% крыс. Остальные животные с коротким латентным временем рефлекса заходили в темную «опасную» камеру (рис.1).

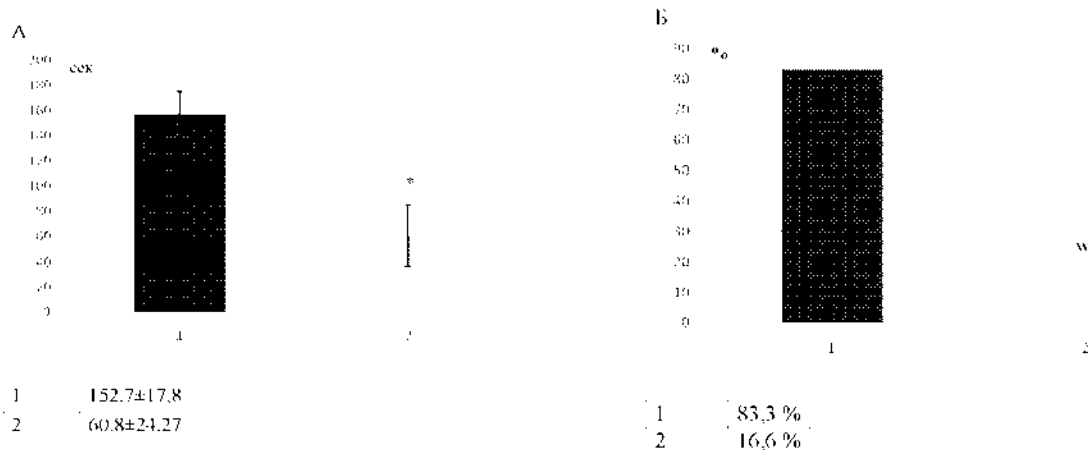


Рис. Воспроизведение УРПИ у крыс через 7 месяцев после геморрагического инсульта.

Оси ординат: А - латентное время рефлекса в сек., Б – количество животных, не зашедших в темную камеру в %. 1 – ложнооперированные животные, 2 – крысы с геморрагическим инсультом.

*-достоверность отличий от контроля при $P \leq 0,01$ (критерий Манна-Уитни)
w-достоверность отличий от контроля при $P \leq 0,01$ (критерий χ^2)

Эти данные свидетельствует о выраженных нарушениях у крыс с ГИ процессов обучения и воспроизведения памятного следа на модели условного рефлекса пассивного избегания через 7 месяцев после операции.

Морфологическое исследование пирамидных нейронов III и V слоев соматосенсорного не-

окортекса проводилось через 7 месяцев после ГИ и через 2 дня после регистрации поведения. Данные о характере морфологических изменений пирамидных нейронов III и V слоев соматосенсорного неокортекса опытных и контрольных животных представлены в таблице 2.

Таблица 2.
Морфометрические показатели пирамидных и гигантских пирамидных нейронов соматосенсорного неокортекса

Подгруппа	Морфометрические параметры, мкм ²				Нейроглиальный индекс
	Площадь нейрона	Периметр нейрона	Площадь ядра	Периметр ядра	
Пирамидные нейроны					
Правое полушарие (области ГИ)	192,29 ± 3,45*	85,22 ± 1,14*	88,96 ± 3,65*	42,33 ± 1,22*	1,03 ± 0,08*
Левое полушарие (без ГИ)	171,37 ± 4,87	79,55 ± 1,77	74,52 ± 2,05	38,83 ± 0,62	0,58 ± 0,08
Правое полушарие (контрольные крысы без ГИ)	188,12 ± 3,01	88,13 ± 1,09	92,17 ± 2,34	40,91 ± 0,83	0,56 ± 0,09
Гигантские пирамидные нейроны					
Правое полушарие (области ГИ)	220,03 ± 4,27	86,61 ± 1,13	97,31 ± 1,68*	43,77 ± 0,40*	1,06 ± 0,07*
Левое полушарие (без ГИ)	210,71 ± 6,32	84,51 ± 1,89	87,19 ± 2,84	41,43 ± 0,82	0,47 ± 0,08
Правое полушарие (контрольные крысы без ГИ)	228,14 ± 3,84	83,86 ± 1,09	94,76 ± 1,88	43,62 ± 0,66	0,57 ± 0,07

*- $p < 0,05$ п

о сравнению с контрольным полушарием.

Показано, что в правом полушарии по сравнению с левым животных с ГИ и правым полушарием ложнооперированных крыс наблюдается увеличение площади и периметра тел и ядер пирамидных нейронов III слоя соматосенсорного неокортекса (табл.2). В отличие от пирамидальных нейронов III слоя, в V слое неокортекса отмечается статистически достоверное увеличение только площади и периметра ядер клеток правого полушария. Полученные результаты свидетельствуют о более выраженной активации восстановительных процессов, протекающих в пирамидных нейронах III слоя в сравнении с V в отдаленном периоде экспериментального интрацеребрального аутогеморрагического инсульта и согласуются с данными литературы

о различном влиянии экспериментального инсульта на клетки III и V слоев соматосенсорного неокортекса [6].

Известно, что при остром инсульте, резко возрастает нейроглиальный индекс, что отражает инициацию патогенетических процессов, оказывающих повреждающее действие на нейроны в условиях острой ишемии [6, 11, 13]. В настоящем исследовании показано увеличение нейроглиального индекса пирамидных и гигантских пирамидных нейронов правого полушария (область моделирования ГИ) по сравнению с левым (без ГИ) и мозгом контрольных ложнооперированных животных (табл.2).

Увеличение объема ядер клеток, наблюдаемое в настоящем исследовании, обусловлено не прогрессированием нейродегенеративных процессов в пирамидных нейронах правого полушария, а,

учитывая морфофункциональное состояние этих клеток и их ядер, визуально оцениваемое по форме и ядерно-цитоплазматическим отношениям, тинкториальным свойствам (отсутствие гиперхроматоза), в первую очередь свидетельствует об активации восстановительных процессов в неокортексе крыс спустя 7 месяцев после моделирования острого геморрагического инсульта. Вместе с тем, сохранение повышенного нейроглиального индекса может свидетельствовать и о негативных тенденциях альтерации нейронов в отдаленном периоде постинсультного восстановления.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что при регистрации поведения животных через 7 месяцев после операции, моделирующей интрацеребральную посттравматическую гематому (геморрагический инсульт), у крыс наблюдалось нарушение ориентировочно-исследовательского поведения, повышение уровня тревожности, нарушение памяти, замедленность и вялость движений. Вместе с тем, у животных не отмечалось нарушений координации движений и каких-либо серьезных неврологических отклонений. Эти изменения развивались на фоне незавершенных процессов постинсультного восстановления нейроглиальных взаимоотношений, характерной особенностью которых является преобладание активных процессов в нервных клетках III слоя сенсомоторного неокортекса животных, перенесших геморрагический инсульт. Комплекс представленных выше изменений, по-видимому, является одной из причин более тяжелого течения и развития осложнений при повторном инсульте.

Благодарность

Авторы статьи выражают благодарность зав. кафедрой гистологии и эмбриологии Нацио-

нального медицинского университета им. А.А.Богомольца, чл.-корр. НАМН Украины проф.Ю.Б.Чайковскому и зав. НИЛЦ университета проф.А.Н.Грбовому за методическую и консультативную помощь, оказанную в ходе выполнения морфологического раздела работы.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М., 1990.
2. Воронина Т.А. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Р.У. Островская. – М., 2012. – С. 253-263.
3. Галаева И.П. Биол. экспер / И.П. Галаева, Т.Л. Гарибова, Т.А. Воронина [и др.] // Биол. – 2005. – Т. 140, № 11. – С. 545-548.
4. Гарибова Т.Л. Эффект нооглотила у крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой (геморрагическим инсультом) // Эксперим. и клин. фармакол. – 2003. – Т. 66, № 2. – С. 45-48.
5. Ганнушкина И.В., Антелава А.Л., Баранчикова М.В. Новое в патогенезе мозгового кровообращения / И.В. Ганнушкина, А.Л. Антелава, М.В. Баранчикова [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. – 1997. – Т. 97, № 6. – С. 4-8.
6. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова. – М.: Медицина, 2001.
7. Косицкий А.В. Гистология. – М, 1988.
8. Макаренко А.Н. Авторское свидетельство № 1767518 от 03.11.1990 г.
9. Мишалов В.Г. Тканевые реакции развивающиеся в ответ на введение целлюлозной нити в полость бедренной вены кролика / В.Г. Мишалов, Д.С. Миргородский, А.Н. Грабовой [и др.] // Серце і судини. – 2005.- № 1 (додаток).- С. 101-104.
10. Румянцева С.А. Иммунокоррекция гнойновоспалительных осложнений церебрального инсульта / Румянцева С.А., Коваленко А.А., Шишкина А.А. – М., 2006.
11. Скворцова В.И. Ишемия головного мозга / Скворцова В.И., Гусев Е.И. – М., 2001.
12. Цинзерлинг А.В. Современные инфекции. Патологическая анатомия и вопросы патогенеза / А.В. Цинзерлинг // Руководство. – СПб., 1992.
13. Kappelle I.G. Treatment or prevention of complications of acute ischemic stroke / I.G. Kappelle., H.B. Van Der Worp // *Neurol. Neurosci. Rep.* – 2004. – V. 4, № 1. – P. 36-41.
14. Pellow S. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat / S. Pellow, Ph. Chopin, S.E. File, M. Brilay // *Neurosci Meth J.* – 1985. – № 14. – P. 149-167.
15. Robinson R. G. The clinical neuropsychiatry of stroke: cognitive, behavioral, and emotional disorders following vascular brain injury / R. G. Robinson. - Cambridge University Press, 1998.

Реферат

ОСОБЛИВОСТІ ВІДНОВНИХ ПРОЦЕСІВ У ЩУРІВ З ІНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОЮ ПІСЛЯТРАВМАТИЧНОЮ ГЕМАТОМОЮ

Макаренко О.М., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А., Крайнева В.А.

Ключові слова: геморрагічний інсульт, поведінка, пам'ять, морфологія

Встановлено, що у щурів з інтрацеребральною посттравматичною гематомою (нова модель геморагічного інсульту, ГІ) через 7 місяців після операції спостерігається порушення навчання та пам'яті, орієнтовно-дослідної поведінки і рухової активності, поїдвищення рівня тривоги. Морфологічні дослідження показали, що у цих щурів визначається виражена активація відновних процесів в п'ятому і, особливо, третьому шарі сенсомоторного неокортексу. Визначається збільшення нейроглиального індексу пірамідних нейронів і гігантських пірамідних нейронів правої півкулі (ділянка моделювання ГІ) в порівнянні з лівим (без ГІ) і мозком контрольних помилковооперованих тварин.

Summary

CHARACTERISTICS OF RECOVERY PROCESSES IN RATS WITH INTRACEREBRAL POSTTRAUMATIC HEMATOMA

Makarenko A.N., Garibova T.L., Voronina T.A., Krajneva V.A.

Key words: hemorrhagic stroke, behaviour, memory, morphology.

It has been found out the rats with intracerebral posttraumatic hematoma (a novel model of hemorrhagic stroke, HS) in 7 months following the operation demonstrated learning problems, poor memory, impaired orientation responses, exploratory behaviour and locomotor activity along with the increased anxiety. Morphological studies have showed these rats are detected to have a pronounced enhancement of recovery processes in the 5th and, especially, in the 3rd layer of the sensorimotor neocortex. The increase in the neuroglia index of pyramidal neurons and giant pyramidal neurons of the right hemisphere (area of HS modelling) is observed as compared to the left hemisphere (without modelled HS) and the brain of pseudo-operated control animals.