*С. І. Тертишний***Морфологічні та гістохімічні зміни у стовбурі головного мозку при експериментальних гематомах півкульової локалізації***Запорізький державний медичний університет***Ключові слова:** експерименти на тваринах, внутрішньомозкова гематома, стовбур мозку, моноамінергічні нейрони, гістохімія.

З метою вивчення вираженості морфологічних змін та активності біогенних амінів у нейронах стовбура мозку, котрі беруть участь у забезпеченні кардіореспіраторних функцій, виконаний експеримент на 29 білих щурах лінії Вістар, яким моделювалась гостра внутрішньомозкова гематома (ВМГ) шляхом введення в півкулю мозку аутокрові, що заздалегідь узяти в щурів. Встановили, що через 1–6 годин після ВМГ реєструється посилення інтенсивності люмінесценції катехоламінергічних нейронів на $18,4 \pm 5,5\%$. Через 12 год – 1 добу розвиток дислокаційного синдрому призводить до мозаїчно-дрібновогнищевих ішемічних ушкоджень нейронів із максимальним зниженням рівня катехоламінів на $29,5 \pm 5,0\%$ у порівнянні з контрольними спостереженнями. Через 3–6 діб на тлі домінування селективних некрозів значної кількості нейронів ядерних утворень стовбура головного мозку суттєво знижується рівень катехоламінів, що показує значну функціональну патологію нейронів, відповідальних за регуляцію кардіореспіраторних функцій, та може лежати в основі порушення інтегративної діяльності стовбурових відділів мозку в цілому.

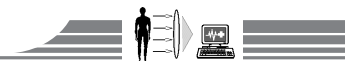
Морфологические и гистохимические изменения в стволе головного мозга при экспериментальных гематомах полушарной локализации*С. И. Тертышный*

С целью изучения выраженности морфологических изменений и активности биогенных аминов в нейронах ствола мозга, которые участвуют в обеспечении кардиореспираторных функций, проведен эксперимент на 29 белых крысах линии Вистар, которым моделировалась острая внутримозговая гематома (ВМГ) путем введения в полушарие мозга аутокрови, заранее взятой у крыс. Установлено, что через 1–6 часов после ВМГ регистрируется усиление интенсивности люминесценции катехоламинергических нейронов на $18,4 \pm 5,5\%$. Через 12 часов – 1 сутки развитие дислокационного синдрома приводит к мозаично-мелкоочаговым ишемическим повреждениям нейронов с максимальным снижением уровня катехоламинов на $29,5 \pm 5,0\%$ в сравнении с контрольными наблюдениями. Через 3–6 суток на фоне распространенных селективных некрозов значительного числа нейронов ядерных образований ствола головного мозга существенно снижается уровень катехоламинов, что отражает значительную функциональную патологию нейронов, ответственных за регуляцию кардиореспираторных функций, и может лежать в основе нарушения интегративной деятельности ствольных отделов мозга в целом.

Ключевые слова: эксперименты на животных, церебральное кровоизлияние, ствол мозга, моноаминергические нейроны, гистохимия. *Запорожский медицинский журнал. – 2015. – №5 (92). – С. 62–65***Morphological and histochemical changes in the brain stem in case of experimental hemispheric intracerebral hemorrhage***S. I. Tertishnyi***Aim.** Investigation of the extent of morphological changes and activity of biogenic amines (according to the intensity of luminescence) in the neurons of the brain stem in intracerebral hemorrhage (ICH).**Methods and results.** ICH was designed on 29 white rats of Vistar line by the administration of autologous blood in the cerebral hemisphere. It was revealed that increased luminescence intensity by $18.4 \pm 5.5\%$ was registered in monoaminergic neurons in 1–6 hours after experimental ICH. After 12 hours – 1 day development of dislocation syndrome leads to mosaic focal ischemic neuronal injuries with maximum reduction in the level of catecholamines by $29.5 \pm 5.0\%$ compared with control cases. Three–6 days after ICH on a background of selective neuronal necrosis in substantial number of neurons in the nuclei of the brainstem the level of catecholamines is significantly reduced.**Conclusion.** Disclosed observations reflect significant functional pathology of neurons responsible for the regulation of cardiorespiratory function and may underlie disturbances of integrative activity in the brain stem in general.**Key words:** *Experimentation Animal, Brainstem, Monoaminergic Neurons, Histochemistry, Cerebral Hemorrhage. Zaporozhye medical journal 2015; №5 (92): 62–65*

Ураження стовбурових відділів мозку – одне з найбільш частих ускладнень гострих порушень мозкового кровообігу у великих півкулях головного мозку. За даними різних авторів, ураження стовбура мозку трапляється у хворих з інфарктами мозку (від 4,9% до 30%) і при крововиливах у мозок (від 13,4% до 55%). Термінальною стадією дислокаційного стовбурового синдрому є стадія довгастого мозку, для котрої характерні розвиток коми, порушення стовбурових рефлексів, наростання кардіореспіраторних та інших вегетативних порушень. Важливу роль у

цих процесах відіграє порушення стовбурових медіаторних моноамінергічних систем. Інтерес до моноамінів передусім визначається їхньою участю в інтеграційних нервових процесах [1], нейроендокринній регуляції, в гомеостазі рідини й серцево-судинному регулюванні [2], а також у механізмах функціональних перебудов систем мозку після його ушкодження. Зміна нормально протікаючого біосинтезу та метаболізму моноамінів призводить до різних патологічних процесів [3]. Через центральні адренорецепторні утворення здійснюється основний регуляторний вплив на динаміку



серцево-судинної системи, а також можуть здійснюватися терапевтичні дії щодо нормалізації гемодинамічних показників.

У роботах останніх років також показано, що катехоламінергічні нейрони стовбура мозку беруть участь у модуляції дихальної та серцево-судинної функцій [4–6], тому зниження рівня біогенних амінів має безпосередній стосунок до дихальної дисфункції, що часто спостерігається у хворих на мозкові інсульти. Більшість областей розташування нейронів, що містять норадреналін, збігаються з топографією тих областей, що беруть участь у кардіореспіраторних функціях.

Мета роботи

Дослідити вираженість морфологічних змін та активність біогенних амінів (за даними інтенсивності люмінесценції) в нейронах стовбура мозку при експериментальній гематомі.

Матеріали і методи дослідження

В експерименті на 29 білих щурах лінії Вістар обох статей моделювали гостру внутрішньомозкову гематому (ВМГ) шляхом уведення в півкулю мозку аутокрові, що заздалегідь узяли в щурів. Кров вводилася через трепанаційний отвір у черепі в праву півкулю (тім'яно-потилична область) на глибину 3 мм, в об'ємі 0,02 мл і формувала гематому в області внутрішньої капсули із залученням частини медіальних ядер. Тварини були забиті через 1, 6, 12 годин і 1, 3, 6 добу від початку експериментальної дії. Забій здійснили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом (5 мг/мл фізрозчину). П'ять інтактних білих щурів становили групу контрольних тварин. Експеримент на тваринах виконаний із дотриманням положень «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей». Топографічні зрізи стовбура мозку забарвлювались гематоксиліном та еозинном, люмінесцентно-мікроскопічне виявлення біогенних амінів здійснили за методом De la Torre [7].

Обчислення денситометричних характеристик моноамінергічних нейронів і дослідження кількості нейронів із різними світлооптичними характеристиками виконали за допомогою комп'ютерної системи цифрового аналізу зображення KS 200 (Kontron Elektronik, ФРН, ліц. № 0200299). Інтенсивність люмінесценції в нейронах контрольних спостережень була умовно прийнята за 100%. Особливий інтерес представляли групи нейронів, які беруть участь у регуляції кардіореспіраторних функцій – ядро одиночного шляху та нейрони вентролатеральної поверхні стовбура мозку, де розташовані хемочутливі зони.

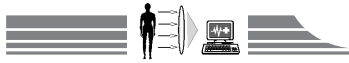
Опрацювали експериментальні дані за допомогою пакета прикладних і статистичних програм KS 200 (Kontron Elektronik, ФРН, ліцензія № 0200299), і Statistica 6.1 for Windows (serial number AXXR712D833214FAN5). Розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M). Вірогідність показників підтверджували шляхом розрахунку помилки ($\pm m$) для середніх величин, а вірогідність різниці даних порівнюваних параметрів у контрольних спостереженнях і в експерименті визначали на підставі розрахунку коефіцієнта t-Стюдента і визначення за таблицею точності безпомилкового прогнозу (p). За вірогідну мінімальну вірогідність відмінностей взяли $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Гістохімічні дослідження показали, що в контрольних спостереженнях у стовбурі мозку структури, котрі містять норадреналін, розподілені доволі дифузно, але в дорзальних відділах стовбура мозку виділялися компактні клітинні групи зі значною інтенсивністю люмінесценції. Найбільш яскраву люмінесценцію спостерігали в нейронах ядра одиночного шляху (група A2) і locus coeruleus (група A6). Виразне світіння відзначалося в цитоплазмі нейронів і в початкових ділянках нейрональних відростків. У нейропілі й більшою мірою навколо дрібних судин реєстрували окремі гранули та їхні скупчення, а також ланцюжки з яскравим світінням. Значну кількість дифузно розташованих норадренергічних нейронів, але з інтенсивністю люмінесценції на 15–20% нижче, порівнюючи з попередніми групами нейронів, спостерігали у вентролатеральній частині стовбура мозку та в медіальних зонах ретикулярної формації.

Через 1–6 годин після експериментальної ВМГ у стовбурі мозку як у дорзальних, так і у вентральних відділах, відзначали дифузні зміни, котрі зумовлені дислокацією та мали характер ішемічно-компресійних. Спостерігали одиничні непоширені дрібновогнищеві крововиливи, що часто локалізувалися перивентрикулярно, а також помірні набряклі зміни. Майже 80% клітин зберігали звичайну гістоструктуру. У кардіореспіраторних ядрах дорзальних відділів стовбура мозку (ядро солітарного тракту) реєстрували поодинокі (зменшених розмірів) різко гіперхромні клітини з нерозрізною структурою ядра на тлі переваги збережених нейронів. У вентральних відділах стовбура мозку реєстрували незначні розлади мікроциркуляції у вигляді повнокров'я мікросудин при відносному збереженні всіх структурних елементів. На цьому тлі реєстрували збільшення інтенсивності люмінесценції на $18,4 \pm 5,5\%$ у дорзальних відділах стовбура мозку (рис. 1 А) і на $11,0 \pm 2,2\%$ у вентролатеральних відділах. Відповідно дорзальні відділи стовбура мозку – зони розташування нейронів ядра одиночного шляху, беруть участь в обробці значної частини серцево-судинної та дихальної аферентної інформації [8], а структури вентролатеральної поверхні мозкового стовбура визначають рівень артеріального тиску й інтеграцію вазомоторних рефлексів, саме в цих структурах і розташована велика кількість нейронів, котрі містять катехоламін.

Через 12 годин і 1 добу після експериментальної ВМГ розвиток дислокаційного синдрому призводив до більш поширених гострих ішемічних судинно-дисциркуляторних змін. Реєстрували осередки припинення кровотоку зі спаданням деяких капілярів, розвиток вазогенного набряку з розширенням периваскулярних просторів, відзначалася поява дрібних діapedезних периваскулярних крововиливів із розвитком плазматичного просочування стінок окремих артерій. У гострому періоді мозаїчно-дрібновогнищевих ішемічних ушкоджень у нейронах виявляли частковий хроматоліз, явища гострого набухання або ішемічні зміни, без тотального некрозу клітин (рис. 1 А). Кількість нейронів зі збереженою гістоструктурою становила в дорзальних відділах стовбура мозку $63,9 \pm 6,5\%$, нейронів із різним ступенем гіперхроматозу – $19,4 \pm 3,3\%$, вакуолізованих – $16,6 \pm 3,5\%$. Зміни нейронів вентральних відділів були виражені меншою мірою. Інтенсивність люмінесценції в дорзальних



відділах стовбура мозку знижена на $29,5 \pm 5,0\%$ (рис. 2 В) і на $20,0 \pm 4,5\%$ у вентролатеральних відділах. Однак окремі нейрони зберігали яскраву люмінесценцію, порівнюючи з контрольними спостереженнями.

Через 3–6 діб після експериментальної ВМГ кількість гіперхромних нейронів збільшувалось до 85% (рис. 1 В), однак у більшості нейронів диференціювалось ядро, ядерце, визначалися чіткі контури клітини та ядерної мембрани, що свідчило про зворотний характер таких змін. Однак при несприятливому перебігу у стовбурі мозку домінували селективні некрози значної кількості нейронів кардіореспіраторних ядер із залученням переважно ядер дорзальної поверхні стовбура. У навколишній нервовій тканині реєструвались явища перинеурального і периваскулярного

набряків, дрібно-вогнищеві крововиливи. При цьому аналогічні зміни також виявляли в ядрах, котрі не мали стосунку до регулювання кардіореспіраторних функцій, що пов'язано зі значним багаторівневим ушкодженням усього мозкового стовбура. У ці терміни майже 10% нейронів були різко змінені, переважно гіперхромні з невиразною структурою ядра або слабофарбовані з нечіткими, розмитими контурами, зменшеним в об'ємі ядром, значною вакуолізацією цитоплазми, що вказувало на незворотні порушення клітинного метаболізму. У таких спостереженнях інтенсивність люмінесценції поодиноких збережених катехоламінергічних нейронів не перевищувала 5–7% від контрольних спостережень. При цьому щільність таких нейронів у полі зору не вища ніж 5% від контрольних спостережень (рис. 2 С).

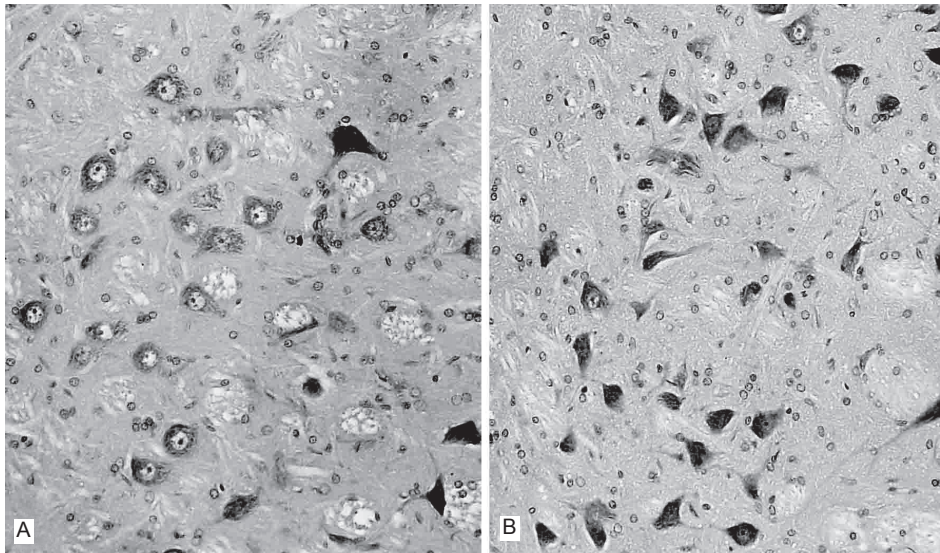


Рис. 1. Морфологічні зміни нейронів в ядрі одиночного шляху (група А2) через 12 годин (А) і 3 доби (В) після експериментальної гематоми. Забарвлення гематоксиліном та еозиним. Збільшення $\times 200$.

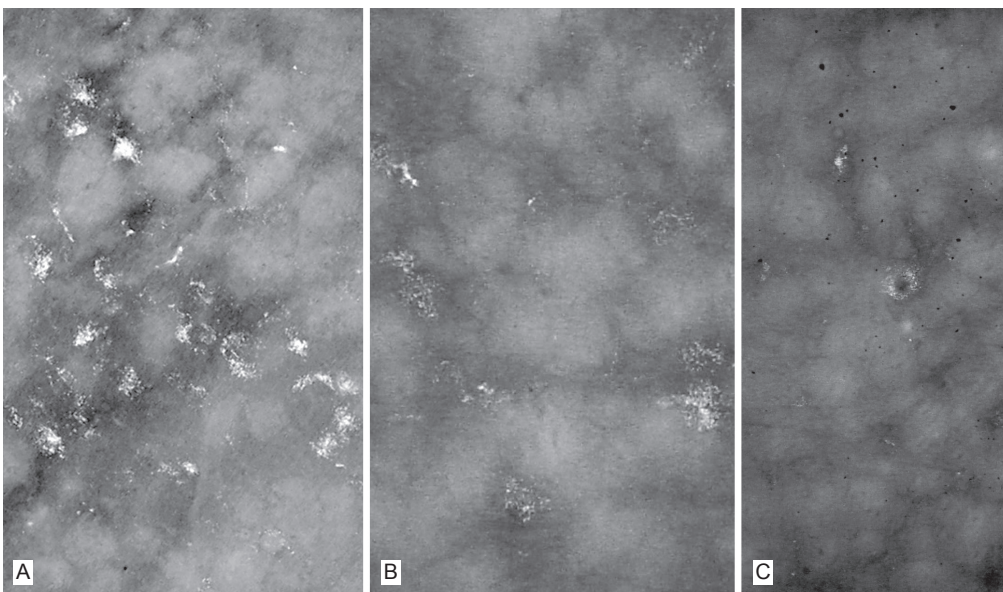
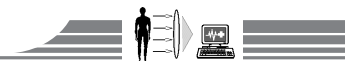


Рис. 2. Гістофлюоресценція нейронів дорзальної поверхні довгастого мозку (область ядра солітарного тракту, група катехоламінергічних нейронів А2). А – посилення люмінесценції через 1 годину після моделювання ВМГ. В, С – зниження люмінесценції через 1 (В) і 3 доби (С) після моделювання ВМГ. Збільшення $\times 200$.



У ранні терміни (1, 6 годин) після моделювання ВМГ на тлі незначних структурних змін у стовбурі мозку реєструється посилення інтенсивності люмінесценції катехоламінергічних нейронів. Результати узгоджуються з даними інших дослідників і свідчать: розвиток дислокаційного синдрому та пов'язана з ним гіпоксія стовбурових відділів призводить до деякої активації нейронів, котрі містять катехоламіни. Зокрема, дослідження останніх років засвідчили, що катехоламінергічні нейрони, які входять до складу ядра солітарного тракту, можуть активуватися при гіпоксії [9], що, на наш погляд, необхідно для модуляції кардіореспіраторних відповідей при гіпоксичних ураженнях ЦНС.

У наступні терміни при ускладненій експериментальній гематомі мозку на тлі поширених селективних некрозів значної кількості нейронів відзначається різке зниження інтенсивності люмінесценції катехоламінергічних нейронів. Вважається, що зниження синтезу деяких біогенних амінів (норадреналін, серотонін) зумовлене, головню, недостатком кисню як субстрату для гідроксилування тирозину і триптофану. На зменшення кількості катехоламінергічних нейронів у блакитній плямі, ядрі одиначного шляху й у вентролатеральних відділах мозкового стовбура поряд зі зниженням рівня катехоламінів також вказує низка авторів при вивченні гіпоксичного впливу на мозок в експерименті [10].

Висновки

1. Після моделювання ВМГ через 1–6 годин на тлі незначних структурних змін у стовбурі мозку реєструється посилення інтенсивності люмінесценції катехоламінергічних нейронів. Через 12 годин – 1 добу розвиток дислокаційного синдрому призводить до значних ішемічних судинно-дисциркуляторних змін, мозаїчно-дрібновогнищевих ішемічних ушкоджень нейронів зі зниженням рівня катехоламінів на $29,5 \pm 5,0\%$ у дорзальних і на $20,0 \pm 4,5\%$ у вентролатеральних відділах стовбура мозку.

2. У наступні терміни (3–6 діб) на тлі домінування селективних некрозів значної кількості нейронів ядерних утворень стовбура головного мозку суттєво знижується рівень катехоламінів, що показує значну функціональну патологію нейронів, котрі відповідальні за регуляцію кардіореспіраторних функцій, і може бути в основі порушення інтегративної діяльності стовбурних відділів мозку в цілому.

Перспективи подальших досліджень у цьому напрямі передбачають детальне вивчення стану катехоламінергічних нейронів у хворих на мозкові інсульти, а це може бути теоретичним підґрунтям для розробки патогенетичної терапії, що спрямована на поліпшення кардіореспіраторних функцій при внутрішньомозкових гематомах.

Список літератури

- Endoh T. Muscarinic M2 receptor inhibition of calcium current in rat nucleus tractus solitaries / T. Endoh // *Neuroreport*. – 2007. – Vol. 18(11). – P. 1141–1145.
- Lesions of medullary catecholaminergic neurons increase salt intake in rats / D.S. Colombari, G.R. Pedrino, A.H. Freiria-Oliveira et al. // *Brain Res Bull*. – 2008. – Vol. 76(6). – P. 572–578.
- Association between variation in the vesicular monoamine transporter 1 gene on chromosome 8p and anxiety-related personality traits / F.W. Lohoff, M. Lautenschlager, J. Mohr et al. // *Neurosci Lett*. – 2008. – Vol. 434(1). – P. 41–45.
- Selective optogenetic activation of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons produces cardiorespiratory stimulation in conscious mice / S.B. Abbott, S.D. DePuy, T. Nguyen, et al. // *J Neurosci*. – 2013. – Vol. 13. – №33(7). – P. 3164–3177.
- Li A. Brainstem catecholaminergic neurons modulate both respiratory and cardiovascular function / A. Li, L. Emond, E. Nattie // *Adv Exp Med Biol*. – 2008. – Vol. 605. – P. 371–376.
- Nogués M.A. Abnormalities of respiratory control and the respiratory motor unit / M.A. Nogués, E. Benarroch // *Neurologist*. – 2008. – Vol. 14(5). – P. 273–288.
- De la Torre J.C. An improved approach to histofluorescence using the SPG method for tissue monoamines / J.C. De la Torre // *J. Neurosci meth.* – 1980. – Vol. 3. – P. 1–5.
- Spyer K.M. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity / K.M. Spyer, A.V. Gourine // *Philos Trans Soc Lond B Biol Sci*. – 2009. – Vol. 364(1529). – P. 2603–2610.
- Hypoxia activates nucleus tractus solitari neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus / T.L. King, C.M. Heesch, C.G. Clark et al. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2012. – Vol. 302(10). – P. 1219–1232.
- Selective losses of brainstem catecholamine neurons after hypoxia–ischemia in the immature rat pup / K.M. Buller, J.A. Wixey, P. Pathipati et al. // *Pediatr Res*. – 2008. – Vol. 63(4). – P. 364–369.
- 1141–1145. doi: 10.1097/WNR.0b013e3280ba499d.
- Colombari, D. S., Pedrino, G. R., Freiria-Oliveira, A. H., Korim, W. S., Maurino, I. C., & Cravo, S. L. (2008) Lesions of medullary catecholaminergic neurons increase salt intake in rats. *Brain Res Bull*, 76(6), 572–578. doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.04.001.
- Lohoff, F. W., Lautenschlager, M., Mohr, J., Ferraro, T. N., Sander, T., & Gallinat, J. (2008) Association between variation in the vesicular monoamine transporter 1 gene on chromosome 8p and anxiety-related personality traits. *Neurosci Lett*, 434(1), 41–45. doi: 10.1016/j.neulet.2008.01.024.
- Abbott, S. B., DePuy, S. D., Nguyen, T., Coates, M. B., Stornetta, R. L., & Guyenet, P. G. (2013) Selective optogenetic activation of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons produces cardiorespiratory stimulation in conscious mice. *J Neurosci*, 33(7), 3164–3177. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1046-12.2013.
- Li, A., Emond, L., & Nattie, E. (2008) Brainstem catecholaminergic neurons modulate both respiratory and cardiovascular function. *Adv Exp Med Biol*, 605, 371–376.
- Nogués, M. A., & Benarroch, E. (2008) Abnormalities of respiratory control and the respiratory motor unit. *Neurologist*, 14(5), 273–288. doi: 10.1097/NRL.0b013e318173e830.
- De la Torre, J. C. (1980) An improved approach to histofluorescence using the SPG method for tissue monoamines. *J. Neurosci meth.*, 3, 1–5. doi: 10.1016/0165-0270(80)90029-1.
- Spyer, K. M., & Gourine, A. V. (2009) Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philos Trans Soc Lond B Biol Sci.*, 364(1529), 2603–2610. doi:10.1098/rstb.2009.0082.
- King, T. L., Heesch, C. M., Clark, C. G., Kline, D. D., & Hasser, E. M. (2012) Hypoxia activates nucleus tractus solitari neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 302(10), 1219–1232. doi: 10.1152/ajpregu.00028.2012.
- Buller, K. M., Wixey, J. A., Pathipati, P., Carty, M., Colditz, P. B., Williams, C. E., & Scheepens, A. (2008) Selective losses of brainstem catecholamine neurons after hypoxia–ischemia in the immature rat pup. *Pediatr Res.*, 63(4), 364–369. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181659774.

References

Відомості про автора:

Тертишний С. І., д. мед. н., професор каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, E-mail: tertishniy@i.ua.

Сведения об авторе:

Тертишний С. И., д. мед. н., профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: tertishniy@i.ua.

Information about author:

Tertishniy S. I., MD, PhD DSci, Prof., Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: tertishniy@i.ua.

Поступила в редакцию 22.09.2015 г.