

**В. А. Акулинин¹, А. В. Мыщик¹, С. С. Степанов¹
П. М. Ларионов², П. В. Беличенко³**

¹ Омская государственная медицинская академия
ул. Ленина, 12, Омск, 644043, Россия

² Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии
ул. Фрунзе, 17, Новосибирск, 630091, Россия

³ Департамент неврологии медицинского факультета Калифорнийского университета
9500 Gilman Drive, George Palade Labs, Room 337 MC-0649
La Jolla, California 92093-0662, USA (США)

E-mail: akulinin@omsk-osma.ru

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Изучена цитоархитектоника моторной коры большого мозга пациентов ($n = 3$), перенесших остановку системного кровотока (через 7, 90 сут. и год после успешной реанимации). В качестве контроля использован мозг погибших ($n = 4$) в результате несчастных случаев. Проведено комплексное гистологическое (окраска по Нисслю, DAPI), иммуногистохимическое (NeuN) и морфометрическое исследование пирамидных нейронов слоев III и V моторной коры. Установлено, что в постреанимационном периоде происходит значительное уменьшение иммунореактивности NeuN в пирамидных нейронах. В слое III остается 35–42 %, а в слое V – 48–56 % экспрессирующих NeuN-нейронов. Общая численная плотность NeuN-позитивных нейронов меньше, чем при окраске по Нисслю и DAPI. Существенно, что среди NeuN-негативных нейронов часть клеток не имеет признаков повреждения ядра и цитоплазмы, что свидетельствует о потенциальной возможности восстановления их функции.

Ключевые слова: клиническая смерть, мозг человека, нейроны, Ниссль, NeuN, DAPI.

Актуальность исследования структурно-функционального состояния различных нейронов коры большого мозга человека в норме и после ишемии, в частности в постреанимационном периоде, обусловлена стремлением выявления закономерностей пространственной реорганизации нейронных сетей и поиском средств регуляции деструктивных и компенсаторно-восстановительных процессов, лежащих в ее основе [1–5]. Имеются работы, свидетельствующие о том, что не только классические методы окраски (по Нисслю) нервной ткани пригодны для морфометрического исследования головного мозга человека при аутопсии, но и методы иммуногистохимической идентификации специфических нейрональных и глиальных белков. Суть этих исследований

заключается в том, что специфические антигены длительно сохраняются в нейронах после смерти [6; 7].

Среди всех нейрон-специфических белков только NeuN является маркером тела и ядра нейрона. Иммуногистохимический анализ показал, что NeuN экспрессируется почти исключительно в нервной системе, выявляется на протяжении всего онтогенетического развития мозга, является специфическим маркером ядра и тела нейронов, а также проксимальных отростков, способен связываться с ДНК нейронов, может быть регулятором процесса дифференцирования и функции нейронов [6]. Поэтому для проведения морфометрического анализа с целью выявления динамики содержания функционирующих нейронов в неповреж-

денном и поврежденном головном мозге млекопитающих в эксперименте, наряду с классической окраской по Нисслию и окраской ядер с помощью DAPI, широко используется подсчет именно NeuN-позитивных нейронов [4; 8–10].

Таким образом, по данным литературы, белок NeuN целесообразно использовать для идентификации нейронов коры большого мозга человека как специфический маркер клеток и морфометрического анализа закономерностей изменения цитоархитектоники коры большого мозга. Однако кора большого мозга человека с помощью современных иммуногистохимических методов идентификации нейронов изучена недостаточно, особенно в условиях реанимационных мероприятий.

Цель исследования – изучить структурно-функциональное состояние пирамидных нейронов слоя III и V моторной коры большого мозга человека в постреанимационном периоде с помощью комплексного гистологического, иммуногистохимического и морфометрического исследования.

Материал и методы

Проведено комплексное морфологическое исследование моторной коры большого мозга пациентов (основная группа, $n = 3$), перенесших трехминутную клиническую смерть в результате внезапной остановки работы сердца (инфаркт миокарда) и успешную реанимацию с восстановлением неврологического статуса. Биологическая смерть пациентов после перенесенного терминального состояния наступила через 7 ($n = 1$, возраст больного 77 лет), 90 ($n = 1$, возраст – 55 лет) суток и год ($n = 1$, возраст – 63 года) в результате острой сердечно-сосудистой недостаточности (повторный инфаркт). На момент смерти, кроме повторного инфаркта, у одного пациента констатировали хроническую ишемическую болезнь сердца (ХИБС) и склероз аорты, у второго – ХИБС, бронхиальную астму, эмфизему легких и отек легких, у третьего больного – ХИБС и отек легких.

Контролем послужил головной мозг 4 лиц (возраст – 17, 27, 33, 45 лет), погибших в результате несчастного случая и признанных клинически здоровыми. Аутопсийный материал забирали в течение суток после констатации биологической смерти на

базе патологоанатомического отделения медсанчасти № 9 г. Омска (зав. отделением – канд. мед. наук А. Н. Кузовкин). Исследование одобрено Этическим комитетом Омской государственной медицинской академии (протокол № 40 от 23.05.2011), получено информированное согласие родственников на изъятие биологического материала.

Кусочек моторной коры мозга размером $20 \times 10 \times 10$ мм фиксировали в 4 % растворе параформальдегида (0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4, при температуре 4 °C) [11]. Для иммуногистохимического исследования срезы (10 мкм) производились во фронтальной плоскости через все слои коры на замораживающем криостате («Cryostat», «Leica», Германия). Для окраски использовали ядерный нейрональный протеин (Neuronal nuclei protein, NeuN; «CHEMICON International Inc.», США) в разведении 1 : 500, вторичные антитела (Biotinylated anti-mouse; «Sigma Chemicals», США) в разведении 1 : 200), FITC-связанный стрептавидин (FITC-conjugated streptavidin; «Amersham, Buckinghamshire», Великобритания) в разведении 1 : 200 [10; 12].

Иммуногистохимические препараты просматривались на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе BioRad MRC 600, присоединенном к флуоресцентному микроскопу Nikon FXA. Использовался аргон-криптоновый лазер с фильтром для FITS (488 DF 10) и липофусцина (568 DF 10). Применялась двухканальная флуоресценция. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – флуоресцентный краситель, который прочно связывается с ДНК и используется для визуализации клеточных ядер [13]. На микроскопе Axioskop 40 («Carl Zeiss»), оснащенном ртутной лампой HBO 100, камерой на CCD датчике (AxioCam MRc) и объективом EC Plan-Neofluar ($\times 40$, апертура 0,9) производились цифровые микрофотографии. Использовалась программа AxioVision, которая позволяла осуществить захват изображения с каждого среза общей площадью $382\ 800\ \mu\text{m}^2$ (10 микрофотографий).

Препараты, окрашенные по Нисслию, фотографировали с помощью микроскопа Leica DM 1000, производили цифровые микрофотографии ($2\ 048 \times 1\ 536$ пк) на уровне III и V слоя коры большого мозга. На полученных микрофотографиях проводили общую и морфометрическую оценку основных типов пирамидных нейронов ко-

ры. Определяли общую численную плотность нейронов и содержание реактивно измененных клеток (гиперхромных сморщенных и несморщенных, гипохромных нейронов и клеточек тени).

Полученные результаты обработаны в программе Statistica 6.0. Проверку статистических гипотез проводили при помощи непараметрического *U*-критерия Манна – Уитни (для парного сравнения) и ANOVA Краскела – Уоллиса (для сравнения трех групп по одному признаку). В каждом сравниваемом случае количество измерений и полей зрения клеток определялось требованиями выявления статистической значимости при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Использование трех методов верификации нейронов (метод Ниссля, определение ядерного белка NeuN и DAPI) позволило провести сравнительный анализ особенностей каждого из них на мелкоклеточной (слой III) и крупноклеточной (слой V) популяции пирамидных нейронов моторной коры большого мозга человека основной (после клинической смерти) и контрольной (клинически здоровые) группы. Все методы хорошо маркировали клетки коры большого мозга пациентов сравниваемых групп (рис. 1, 2). Однако особенности каждого метода исследования и размеры клеток анализируемой популяции оказывали влияние на конечные результаты проведенного морфометрического анализа (см. таблицу).

В контрольной группе ($n = 4$) во всех изученных слоях коры большого мозга преобладали нормо- и гиперхромные несморщенные нейроны. Результаты морфометрического анализа прежде всего определялись сложностью дискриминации различных типов мелких клеток слоя III коры большого мозга. В итоге при использовании DAPI существенно завышалась общая численная плотность клеток, которые идентифицированы как мелкие пирамидные нейроны (см. таблицу). Это связано с тем, что размеры ядер мелких пирамидных и непиримидных нейронов, а также астроцитов приблизительно равны. В норме общая численная плотность NeuN-позитивных нейронов в слое III была лишь незначительно (на 11,5 %) меньше, чем при окраске по Нисс-

лю. Вполне вероятно, что при окраске по Нисслю количество пирамидных нейронов было несколько завышено за счет мелких клеток иной природы. Все это свидетельствовало о том, что в норме в мелкоклеточной популяции (слой III) наиболее объективные результаты оценки общей численной плотности нейронов достигаются при подсчете количества NeuN-позитивных нейронов в сочетании с контрольной окраской по Нисслю.

В крупноклеточном слое V моторной коры большого мозга при всех использованных методах окраски получены статистически неразличающиеся значения показателя общей численной плотности нейронов в норме (см. таблицу). Пирамидные клетки и их ядра этого слоя существенно превышали размеры всех остальных клеток и легко идентифицировались при любом методе окраски. Поэтому в норме для слоя V коры большого мозга подсчет NeuN-позитивных клеток является самым объективным (максимальная чувствительность и специфичность) способом морфометрической оценки общей плотности пирамидных нейронов. Это имеет очень большое практическое значение, так как позволяет применять иммуногистохимический метод идентификации NeuN-позитивных нейронов для автоматизированного компьютерного анализа препаратов по скоплению маркера с помощью программ графического анализа, например ImageJ.

В постреанимационном периоде появились качественно новые факторы, влияющие на получение и интерпретацию морфометрических данных при различных методах идентификации клеток. Расхождение результатов анализа общей численной плотности нейронов существенно увеличивалось. Особенно это касалось количества NeuN-позитивных нейронов (см. таблицу). При окраске по Нисслю общая численная плотность пирамидных нейронов в слое III через 7 сут. в постреанимационном периоде уменьшалась на 42,3 %, в слое V – на 28,0 %, а при подсчете NeuN-позитивных нейронов – на 60,9 и 47,8 % соответственно. DAPI в слое III давал стабильно более высокие результаты, а в слое V – на уровне классической окраски по Нисслю (см. таблицу).

Таким образом, через 7 сут. после клинической смерти почти 20 % нейронов, выявляемых при окраске по Нисслю, имели

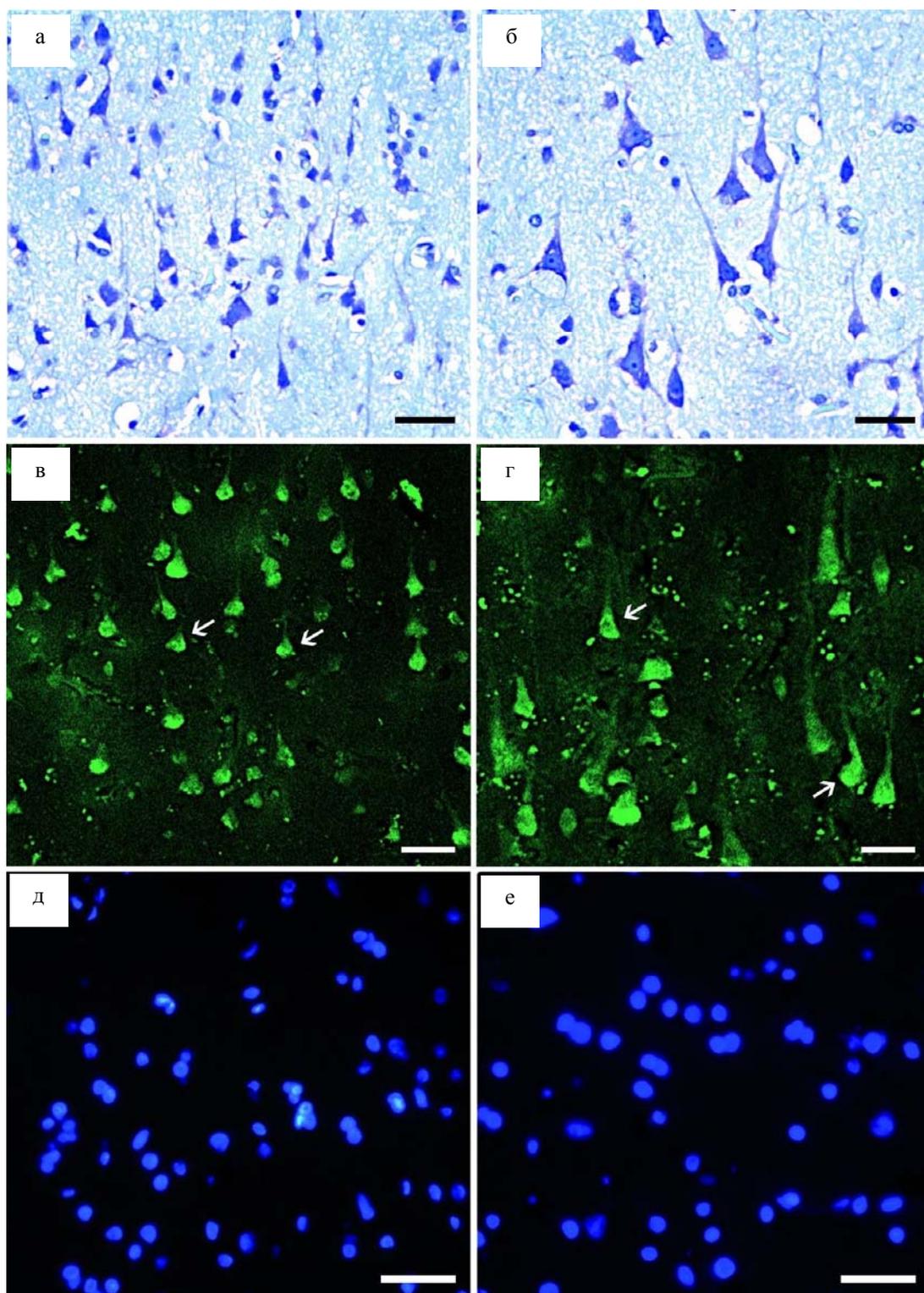


Рис. 1. Пирамидные нейроны моторной коры большого мозга человека контрольной группы: *а, б* – окраска по Нисслю (слой III и V); *в, г* – NeuN-позитивные нейроны (слой III и V); *д, е* – окраска клеточных ядер DAPI (слой III и V). Шкала 50 мкм

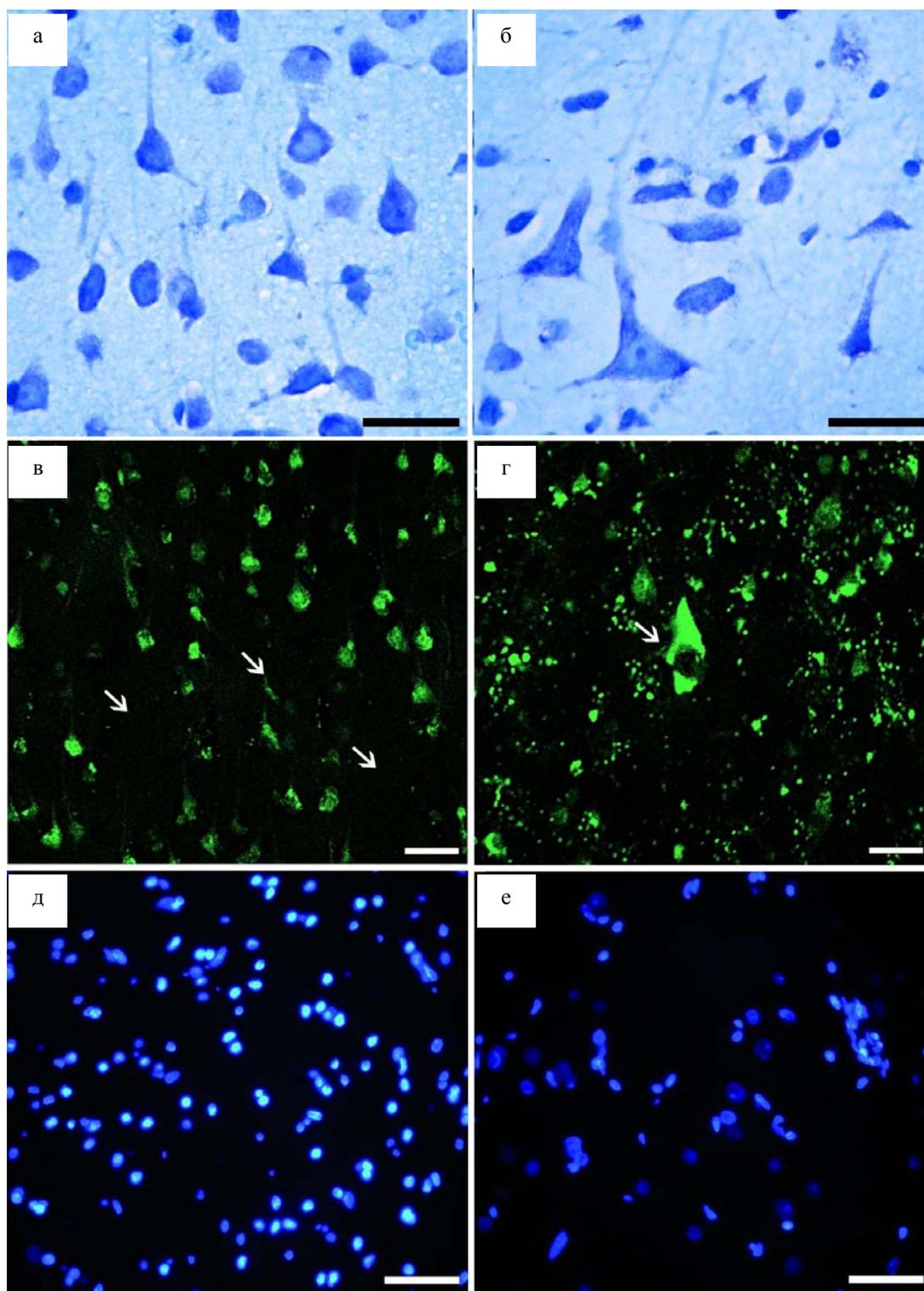


Рис. 2. Пирамидные нейроны моторной коры большого мозга человека основной группы (постреанимационный период): *а, б* – окраска по Нисслю в слоях III и V через 7 сут.; *в* – NeuN-позитивные нейроны слоя III через 90 сут.; *г* – NeuN-позитивные нейроны слоя V через год; *д, е* – неравномерное окрашивание и снижение количества клеточных ядер при окраске DAPI в слоях III и V через 7 сут. Шкала 50 мкм

Общая численная плотность пирамидных нейронов (в 0,001 мм³)
в различных слоях моторной коры большого мозга человека
в постреанимационном периоде

Метод исследования	Контроль	Срок после клинической смерти		
		7 сут.	90 сут.	1 год
Слой III				
По Ниссля	52 (50; 55)	30 (27; 32)	35 (33; 37)	32 (28; 35)
NeuN	46 (44; 48) [*]	18 (18; 23) ^{***}	20 (19; 25) ^{***}	22 (21; 26) ^{**}
DAPI	61 (59; 65) ^{**}	39 (34; 41) [*]	42 (38; 45) [*]	48 (44; 49) ^{**}
ANOVA	$H = 7,9; df = 2;$ $p = 0,02$ ^	$H = 10,6; df = 2;$ $p = 0,01$ ^	$H = 11,3; df = 2;$ $p = 0,005$ ^	$H = 9,8; df = 2;$ $p = 0,01$ ^
Слой V				
По Ниссля	25 (23; 28)	18 (17; 23)	21 (22; 24)	18 (17; 25)
NeuN	23 (19; 26)	12 (13; 15) ^{**}	14 (13; 18) ^{***}	13 (11; 16) ^{**}
DAPI	27 (25; 27)	19 (18; 22)	23 (21; 26)	20 (19; 24)
ANOVA	$H = 3,5; df = 2;$ $p > 0,05$	$H = 7,6; df = 2;$ $p = 0,02$ ^	$H = 9,9; df = 2;$ $p = 0,01$ ^	$H = 7,8; df = 2;$ $p = 0,02$ ^

Примечание: данные представлены как медиана (нижний и верхний квартили); * – отличия статистически значимы по сравнению с методом Ниссля при $p < 0,05$, ** – то же при $p < 0,01$; *** – то же при $p < 0,001$ (критерий Манна – Уитни для парных сравнений); ^ – отличия между методами верификации нейронов статистически значимы при $p < 0,05$ (ANOVA Краскела – Уоллиса).

нулевую или очень низкую иммунореактивность NeuN.

В постреанимационном периоде статистически значимо увеличивалось количество различных типов вакуолизованных, гипо-, гиперхромных сморщенных нейронов и клеток теней. Значительная часть этих нейронов сохраняла структурную целостность ядра и цитоплазмы (см. рис. 2, а, б). Однако в реактивно измененных нейронах снижалась экспрессия NeuN в ядре и уменьшались его запасы в цитоплазме (см. рис. 2, в, г). По сравнению с контролем в постреанимационном периоде отмечалось неравномерное окрашивание и уменьшение количества клеточных ядер при окраске флуоресцентным красителем DAPI (см. рис. 2, д, е).

Следовательно, в постреанимационном периоде существенная часть неповрежденных нейронов становилась NeuN-негативной. Поэтому после клинической смерти в отличие от контроля только количество NeuN-позитивных нейронов не могло быть индикатором оценки динамики изменения общей численной плотности нейронов. Тем не менее в постреанимационном периоде экспрессия NeuN отмечалась в 60–68 % (слой III), а в слое V – в 60–72 % сохранив-

шихся пирамидных нейронов, что свидетельствовало об их функциональной активности на момент смерти пациентов. Даже с учетом значительной гибели нейронов в постреанимационном периоде по сравнению с контролем в слое III на момент исследования оставалось 35–42 % функционально активных нейронов, экспрессирующих NeuN, а в слое V – 48–56 % нейронов ($p < 0,01$). Это свидетельствовало о том, что констатация биологической смерти происходила на фоне довольно высокого содержания активно функционирующих нейронов и наличия значительного потенциального резерва для восстановления функций коры большого мозга за счет NeuN-позитивных нейронов.

Заключение

Большое количество экспериментальных работ демонстрирует, что после острой ишемии головного мозга происходит выраженное уменьшение количества NeuN-позитивных нейронов [14; 15]. При этом исход для NeuN-негативных нейронов разными авторами оценивается неоднозначно. Так, в исследовании I. Unal-Cevik et al. [9], специально посвященном изучению этого вопроса, установлено, что нет убедительных

доказательств наличия связи потери иммунореактивности NeuN и необратимой гибели нейрона. Это свидетельствует о том, что при нормализации микроциркуляции ткани мозга, структурной целостности ядра и цитоплазмы часть нейронов со сниженной экспрессией функциональных и регуляторных белков может выйти из патологического состояния.

Полученные нами данные имеют большое значение для оценки структурно-функционального состояния нейронов коры большого мозга человека после клинической смерти. Установлено, что в моторной коре происходит значительное уменьшение иммунореактивности NeuN: в слое III остается 35–42 %, в слое V – 48–56 % экспрессирующих NeuN-нейронов. С учетом того, что среди NeuN-негативных нейронов, по данным литературы [9], не все имеют признаки необратимого изменения, процент содержания способных функционировать нейронов несколько выше.

Таким образом, в моторной коре большого мозга человека в постреанимационном периоде сохраняется значительный резерв способных функционировать нейронов (экспрессия белка NeuN) и NeuN-негативных нейронов без признаков необратимых изменений ядра и цитоплазмы. Особенно много таких нейронов выявляется в слое V. Однако интегрирование этих нейронов в единую пространственную нейронную сеть на фоне вторичных нарушений микроциркуляции и отека мозга существенно затруднено, в результате чего нарушается интегративно-пусковая функция моторной коры большого мозга и не реализуется репаративный потенциал сохранившихся нейронов.

Список литературы

1. *Fiala J. C.* Reconstruct: a Free Editor for Serial Section Microscopy // *J. Microscopy*. 2005. Vol. 218, № 1. P. 52–61.
2. *Anderson B. J.* Plasticity of Gray Matter Volume: the Cellular and Synaptic Plasticity that Underlies Volumetric Change // *Dev. Psychobiol.* 2011. Vol. 53, № 5. P. 456–465.
3. *Fu M., Zuo Y.* Experience-dependent Structural Plasticity in the Cortex // *Trends Neurosci.* 2011. Vol. 34, № 4. P. 177–187.
4. *Kiryk A., Pluta R., Figiel I., Mikosz M., Ulamek M., Niewiadomska G., Jablonski M., Kaczmarek L.* Transient Brain Ischemia due to Cardiac Arrest Causes Irreversible Long-Lasting Cognitive Injury // *Behav. Brain. Res.* 2011. Vol. 219, № 1. P. 1–7.
5. *Kokaia M.* Seizure-induced Neurogenesis in the Adult Brain // *Eur. J. Neurosci.* 2011. Vol. 33, № 6. P. 1133–1138.
6. *Lyck L., Dalmau I., Chemnitz J., Finsen B., Schroder H. D.* Immunohistochemical Markers for Quantitative Studies of Neurons and Glia in Human Neocortex // *J. Histochem. Cytochem.* 2008. Vol. 56, № 3. P. 201–221.
7. *Abitz M., Nielsen R. D., Jones E. G., Laursen H., Graem N., Pakkenberg B.* Excess of Neurons in the Human Newborn Mediodorsal Thalamus Compared with that of the Adult // *Cereb. Cortex.* 2007. Vol. 17, № 11. P. 2573–2578.
8. *Mullen R. J., Buck C. R., Smith A. M.* NeuN, a Neuronal Specific Nuclear Protein in Vertebrates // *Development.* 1992. Vol. 116, № 1. P. 201–211.
9. *Unal-Cevik I., Kilinc M., Gursoy-Ozdemir Y., Gurer G., Dalkara T.* Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note // *Brain. Res.* 2004. Vol. 1015, № 1–2. P. 169–174.
10. *Ahn H. C., Yoo K. Y., Hwang I. K., Cho J. H., Lee C. H., Choi J. H., Li H., Cho B. R., Kim Y. M., Won M. H.* Ischemia-related Changes in Naive and Mutant Forms of Ubiquitin and Neuroprotective Effects of Ubiquitin in the Hippocampus Following Experimental Transient Ischemic Damage // *Exp. Neurol.* 2009. Vol. 220, № 1. P. 120–132.
11. *Akulinin V. A., Dahlstrom A.* Quantitative Analysis of MAP2 Immunoreactivity in Human Neocortex of Three Patients Surviving after Brain Ischemia // *Neurochem. Res.* 2003. Vol. 28, № 2. P. 373–378.
12. *Choi Y. S., Lee M. Y., Sung K. W., Jeong S. W., Choi J. S., Park H. J., Kim O. N., Lee S. B., Kim S. Y.* Regional Differences in Enhanced Neurogenesis in the Dentate Gyrus of Adult Rats after Transient Forebrain Ischemia // *Mol. Cells.* 2003. Vol. 16, № 2. P. 232–238.
13. *Zink D., Sadoni N., Stelzer E.* Visualizing Chromatin and Chromosomes in Living Cells // *Methods.* 2003. Vol. 29, № 1. P. 42–50.
14. *Sugawara T., Lewen A., Noshita N., Gasche Y., Chan P. H.* Effects of Global Ischemia Duration on Neuronal, Astroglial, Oligodendroglial and Microglial Reactions in the Vulnerable Hippocampal CA1 Subregion

in Rats // J. Neurotrauma. 2002. Vol. 19, № 1. P. 85–98.

15. Xu G. P., Dave K. R., Vivero R., Schmidt-Kastner R., Sick T. J., Perez-Pinzon M. A. Improvement in Neuronal Survival

after Ischemic Pre-conditioning in Hippocampal Slice Cultures // Brain Res. 2002. Vol. 952, № 2. P. 153–158.

Материал поступил в редколлегию 23.04.2012

V. A. Akulinin, A. V. Mytsik, S. S. Stepanov, P. M. Larionov, P. V. Belichenko

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATUS OF PYRAMIDAL NEURONS
OF HUMAN CEREBRAL CORTEX IN NORM AND DURING POSTRESUSCITATION PERIOD**

Cytoarchitectonics of the motor cortex of the human brain has been studied in patients ($n = 3$) survived after systemic circulation arrest (7, 90 days and one year after successful reanimation). Brain of dead persons ($n = 4$) as a result of accident was used as a control group. Complex histological (Nissl and DAPI staining), immunochemical (NeuN) and morphological study of the pyramidal neurons in layers III and V of the motor cortex has been conducted. It has been found that NeuN immunoreactivity is considerably decreased in the pyramidal neurons in postresuscitation period. Neurons in layer III (35–42 %) and neurons in layer V (48–56 %) expressed NeuN. Total numerical density of NeuN-positive neurons has been less than in Nissl and DAPI staining. The part of amid NeuN-negative neurons has no signs of nucleus or cytoplasm damage indicating potentiality for their regeneration.

Keywords: clinical death, human brain, neurons, Nissl staining, NeuN, DAPI.