

УДК 612.82: 616-005.4

*Ж. А. ГЛАДКОВА, Т. Е. КУЗНЕЦОВА, Е. В. ФЁДОРОВА, С. Г. ПАШКЕВИЧ,  
Г. П. МИРОНОВА, С. В. МАНЬКОВСКАЯ*

## **МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ КРЫС С ИШЕМИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ УЧАСТОК ГЕНА НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА**

*Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

Высокая степень инвалидизации и летальность актуализируют поиски новых способов профилактики и лечения инсультов. Представляется перспективным изучение влияния субстанций, направленных на восстановление нейронов в раннем постинсультном периоде. В статье обсуждаются морфо-гистохимические изменения при моделировании ишемического инсульта, в том числе и гендерные различия в восстановлении поврежденных участков головного мозга крыс, после однократного внутрицентрального введения нейротрофического фактора мозга, связанного с аденоассоциированным вирусным вектором.

*Ключевые слова:* головной мозг крыс, ишемический инсульт, внутрицентральное введение, биологическая терапия.

**Введение.** Согласно данным литературы, в мире ежегодно регистрируется около 10 млн случаев инсульта. Инсульт является патологическим состоянием, которое проявляется острым нарушением мозгового кровообращения и характеризуется внезапным появлением очаговой неврологической симптоматики. Прогноз выживаемости, степень инвалидизации зависят от вида инсульта, локализации, пола, возраста пациента [1]. Различают геморрагический и ишемический инсульт, который составляет примерно 80 % всех случаев зарегистрированных инсультов.

Распространенным последствием ишемического инсульта является повреждение структур соматосенсорной системы головного мозга: цитотоксическое воздействие большого количества глутамата и нейрокининов не только изменяет механизмы слаженного регулирования возбудимости центральных ноцицептивных нейронов, но и приводит к их гибели. Развивается центральная невропатическая боль, которая, в свою очередь, сопровождается усилением возбудимости и реактивности ноцицептивных нейронов в дорсальном роге спинного мозга, таламических ядрах и соматосенсорной коре конечного мозга [2, 3].

При изучении последствий повреждений и поиске новых способов лечения инсульта исследователи делают акцент на восстановлении клеток зоны пенумбры (ишемическая полутень): участка ишемического обратимого поражения, в которой объемный мозговой кровоток снижен до уровня достаточного лишь для минимального поддержания жизнеспособности нейронов на уровне сохранения целостности клетки, однако синаптическая активность их подавлена. Снижение энергетического метаболизма и активности нейронов приводят к тому, что использование своевременной адекватной терапии у пациентов возможно восстановить нормальное функционирование клеток в поврежденной области и уменьшить область постинсультного поражения головного мозга [4, 5].

Создание и использование генных и клеточных технологий позволили определить новое направление в лечении и профилактике инсульта. Применение генной терапии, обеспечивающей поддержание жизнедеятельности поврежденных нейронов и восстановление синаптической передачи за счет безопасного стимулирования процессов нейрорегенерации, включает как гены, кодирующие нейротрофические факторы, антиапоптозные белки, белки теплового шока и др., так и комбинации нескольких нейротрофических факторов.

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (рААВ) являются одними из наиболее перспективных векторов доставки для генной терапии благодаря своим непатогенным свойствам,

низкой иммуногенности со стороны хозяина и тропности к большинству клеток и тканей [6]. Генетическая конструкция, представляющая собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус 1-ого серотипа (рAAB1) и содержащая участок гена *BDNF* (от англ. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*; нейротрофический фактор мозга) предоставлена для проведения исследований компанией VectorBuilder (США). Известно, что нейротрофический фактор мозга – это белок, относящийся к нейротрофинам, – веществам, стимулирующим и поддерживающим развитие нейронов [7].

Целью исследования явилось изучение гистоструктурных и метаболических изменений первичной соматосенсорной коры крыс после моделирования ишемического инсульта и последующего однократного внутрицентрального введения генетической конструкции рAAB1-*BDNF*.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты выполнены на крысах Вистар (24 самца и 24 самки) массой 280±20 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, 12/12-часовом режиме освещения и темноты. Все эксперименты проведены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными [8] и одобрены Комитетом по биоэтике Института физиологии (протокол № 2 от 21.02.2022 г.). В качестве контроля животным с ишемией внутрицентрально однократно вводили искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ, Tocris Bioscience, United Kingdom), в качестве тестируемой субстанции для проведения терапии однократно внутрицентрально вводили генетическую конструкцию рAAV1-*BDNF* (AAVR15).

Животных разделили на группы: 1-я группа – интактный контроль (самцы, n=6), 2-я группа – контроль (ишемия+ИСМЖ, самцы, n=9), 3-я группа – ишемия+AAVR15 (самцы, n=9), 4-я группа – интактный контроль (самки, n=6), 5-я группа – контроль (ишемия+ИСМЖ, самки, n=9), 6-я группа – ишемия+AAVR15 (самки, n=9). Была выбрана модель ишемического инсульта, которая которую детектировали в области первичной соматосенсорной коры больших полушарий и формировали следующим образом. Крыс наркотизировали внутривенно (30 мг/кг нембутала и 500 мг/кг уретана). Моделирование ишемического повреждения головного мозга осуществляли согласно методикам; E. Z. Longa et al., 1989, Y. Wang-Fischer, 2009. Далее кожную рану ушивали (ПГА, USP 3/0, Фиатос, РФ). Через 15 минут после индукции ишемии в область большой цистерны мозга с помощью шприцевого насоса (ДШ-10, РФ) однократно вводили 50 мкл ИСМЖ (2-я и 5-я группа) или 50 мкл раствора AAVR15 в дозе  $5 \times 10^{11}$  вг со скоростью 10 мкл/мин с последующей задержкой в месте инъекции на 10 мин (3-я и 6-я группа).

На 21-е сутки по 3 особи из каждой группы выводили из эксперимента (n=18) и проводили забор образцов головного мозга для морфологического исследования. На 42-е сутки оставшиеся животные из каждой группы были выведены из эксперимента (n=30), также были взяты образцы головного мозга. С помощью слайсера (Kent Scientific Corporation, USA) вырезали корональные срезы толщиной 3 мм на расстоянии 2, 5, 8 и 11 мм от лобного полюса. Срез от 5 до 8 мм (bregma от 1,0 до -2,0 мм), включающий основную часть ишемического поражения, быстро замораживали для дальнейших анализов. Соседние срезы от 2 до 5 мм (bregma от 4,0 до 1,0 мм спереди) и 8 и 11 мм (bregma от -2,0 до -5,0 мм сзади) использовались для характеристики всей зоны инфаркта («ядра» инсульта и зоны пенумбры) [9].

После заморозки образцов (-20°C) из срезов мозга толщиной 3 мм в криомикротоме (MicromGmbH, Germany) вырезали срезы толщиной 20 мкм и 10 мкм, затем переносили их на предметные стекла, покрытые силаном. Срезы толщиной 20 мкм окрашивали на активность ферментов; срезы толщиной 10 мкм окрашивали толуидиновым синим по Нисслию. Исследование микропрепаратов и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа, оснащенного цифровой фотокамерой (Альтами LUM-1, РФ). Оцифрованные изображения обрабатывали с помощью программы Image J. (National Institutes of Health, USA). Измерение активности ферментов и морфометрию гистологических препаратов проводили в нейронах, подсчитанных в 10-ти полях зрения при увеличении 400×. Активность ферментов оценивали по оптической плотности продукта реакции в цитоплазме нейронов, выражая результаты в условных единицах оптической плотности.

Данные о средней плотности расположения нейронов в поле зрения получали в результате морфометрического исследования препаратов, окрашенных по методу Ниссля. Индекс нейродегенерации (ИНД) рассчитывали по отношению числа нейронов с грубыми нарушениями структуры к числу неизмененных нервных клеток.

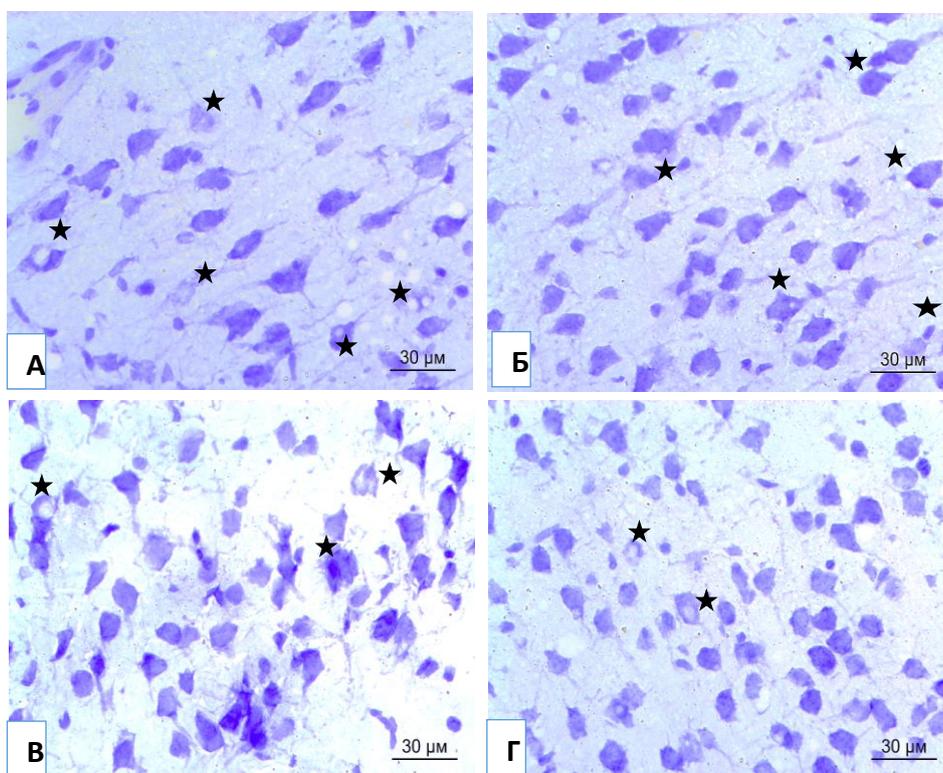
Учитывая, что ферменты углеводно-энергетического обмена реагируют на ишемические и гипоксические повреждения, проанализировали показатели активности фермента цикла Кребса

сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и показателя гликолиза лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в нейронах первичной соматосенсорной коры на 21-е и 42-е сутки эксперимента, дополнительно оценили активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [10, 11].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием статистической программы «Statistica 10» (StatSoftInc., USA). Для интерпретации данных использовали среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD), для сравнения независимых выборок использовали t-критерий Стьюдента, для анализа полученных данных использовали номинальный уровень статистической значимости ( $p < 0,05$ ).

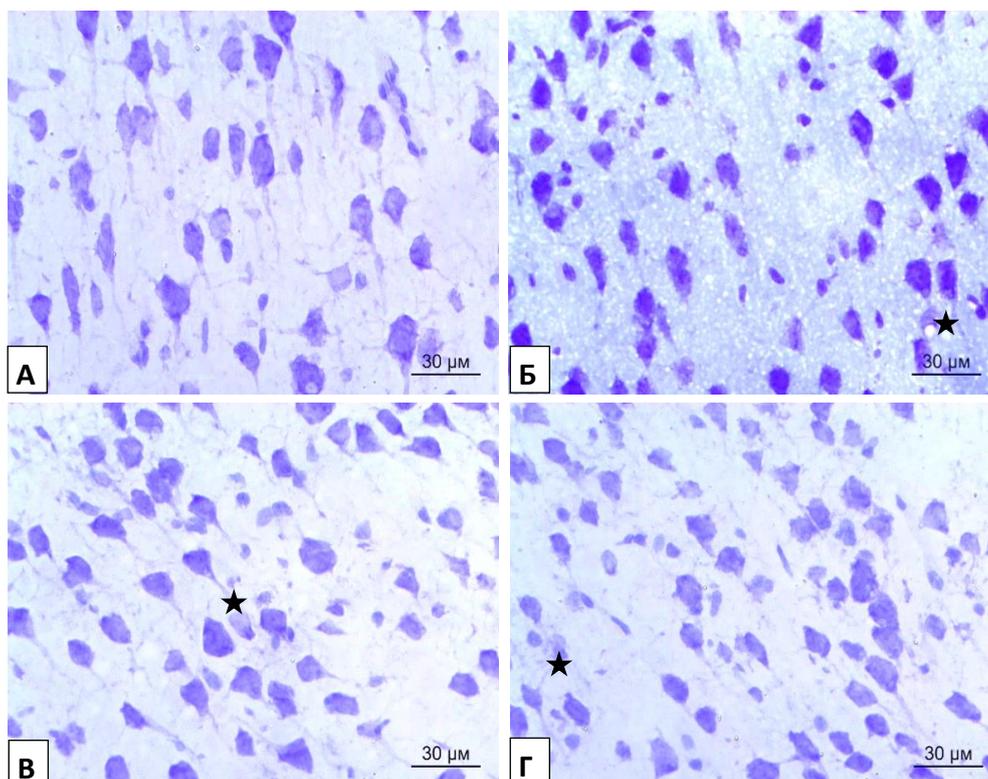
**Результаты и их обсуждение.** При изучении гистоструктуры области первичной соматосенсорной коры группы интактных животных выявлены незначительные изменения, характерные для естественных апоптотических процессов.

Оценка гистоструктурных изменений области первичной соматосенсорной коры на 21-е сутки после моделирования ишемического инсульта в группе контроля показала выраженные нарушения структуры значительной части нейронов у самцов и самок: встречались клетки с вакуолизацией цитоплазмы, гипохромные нейроны, единичные клетки-«тени» (рисунок 1 А, Б); в обеих контрольных группах животных к 42-м суткам эксперимента в соматосенсорной коре выявили снижение количества клеток с деструктивными изменениями (рисунок 1, В, Г).



**Рис.1.** Гистоструктура первичной соматосенсорной коры крыс групп контроля на 21-е (А, Б) и 42-е сутки (В, Г) после моделирования ишемии: А, В – самцы, Б, Г – самки. Звездочками отмечены деструктивно измененные нейроны. Окраска: по Нислю. Увеличение: 400×

При изучении гистоструктуры соматосенсорной коры крыс самцов на 21-е и 42-е сутки после моделирования ишемии и однократного внутрицентрального введения AAVR15 определили менее выраженные нарушения структуры значительной части нейронов как самцов и самок: встречались единичные клетки с вакуолизацией цитоплазмы и гипохромные нейроны (рисунок 2, А–Г).



**Рис.2.** Гистоструктура первичной соматосенсорной коры на 21-е (А, Б) и 42-е сутки (В, Г) животных с экспериментальной ишемией головного мозга после введения AAVJ15: А, В – самцы, Б, Г – самки. Окраска: по Нислю. Увеличение: 400×

При проведении морфометрического анализа на 21-е сутки эксперимента в контрольной группе крыс самцов по сравнению с интактными животными выявили статистически значимое повышение количества нейронов в области ишемического повреждения мозга с одновременным уменьшением их средних размеров. Зафиксировано также падение активности АХЭ и СДГ, увеличение активности ЛДГ и показателя ИНД, отражающих развитие ишемических и гипоксических повреждений (таблица 1). У крыс самцов после моделирования ишемии и введения векторной конструкции AAVJ15 наблюдали значительное увеличение средних размеров нейронов, активности АХЭ и СДГ, сопровождаемое уменьшением ИНД, по сравнению с аналогичными показателями 2 группы (таблица 1).

**Табл. 1.** Данные морфометрического исследования первичной соматосенсорной коры крыс самцов и активности ферментов

Показатель	1 группа (интактная)	2 группа (контрольная; без лечения)		3 группа (терапия AAVR15)	
		21-е сутки	42-е сутки	21-е сутки	42-е сутки
Число нейронов, абс. ед.	35,0 ± 7,0	39,5 ± 6,5 <sup>^</sup>	40,0 ± 9,1 <sup>^</sup>	42,5 ± 7,0 <sup>^</sup>	43,0 ± 8,8 <sup>^</sup>
Размер нейронов, мкм <sup>2</sup>	124,9 ± 16,4	98,4 ± 7,9 <sup>^</sup>	98,0 ± 12,3 <sup>^</sup>	105,0 ± 12,9 <sup>^*</sup>	100,3 ± 10,5 <sup>^</sup>
ИНД	0,05	0,27 <sup>^</sup>	0,29 <sup>^</sup>	0,16 <sup>^*</sup>	0,10 <sup>^*</sup>
Активность АХЭ, усл. ед.	79,5 ± 14,1	63,7 ± 15,6 <sup>^</sup>	75,3 ± 14,7 <sup>^</sup>	71,0 ± 12,9 <sup>^*</sup>	66,9 ± 14,3 <sup>^*</sup>
Активность СДГ, усл. ед.	151,6 ± 8,8	113,2 ± 7,8 <sup>^</sup>	118,8 ± 7,8 <sup>^</sup>	116,8 ± 9,0 <sup>^*</sup>	123,7 ± 7,7 <sup>^*</sup>
Активность ЛДГ, усл. ед.	77,02 ± 7,5	107,2 ± 16,3 <sup>^</sup>	95,1 ± 9,9 <sup>^</sup>	109,2 ± 13,3 <sup>^</sup>	101,8 ± 7,9 <sup>^*</sup>

Примечание: <sup>^</sup> –  $p < 0,05$  по отношению к показателям интактной группы, \* –  $p < 0,05$  по отношению к показателям контрольной группы в соответствующий временной точке

На 42-е сутки у крыс самцов контрольной группы определили статистически значимое увеличение плотности расположения нейронов, но средний размер их оставался низким по сравнению с аналогичными показателями группы интактного контроля. Зарегистрированы также пониженные значения АХЭ, СДГ и повышенная активность ЛДГ, что указывает на сохранение ишемических и

гипоксических повреждений участка мозга. Об этом свидетельствует и высокий ИНД (таблица 1). У крыс самцов, получивших генную терапию, выявлена тенденция к увеличению числа нейронов и их размеров, значимо повышалась активность СДГ и ЛДГ, снижался показатель АХЭ и существенно уменьшался ИНД по сравнению с данными 2 группы (таблица 1).

Морфометрического анализ исследуемых структур головного мозга в контрольной группе крыс самок на 21-е сутки эксперимента позволил выявить статистически значимое уменьшение числа и размеров нейронов, снижение активности АХЭ и СДГ, повышение ИНД и активности ЛДГ по сравнению с аналогичными показателями группы интактного контроля (таблица 2). У крыс самок после моделирования ишемии и введения векторной конструкции AAVJ15 наблюдали значительное увеличение плотности нейронов в области повреждения мозга, активности АХЭ и ЛДГ, сопровождаемое уменьшением активности СДГ и ИНД, по сравнению с аналогичными показателями 5 группы (таблица 2).

К 42-м суткам в контрольной группе самок сохранялись вышеописанные изменения исследуемых показателей по сравнению с интактной группой (таблица 2). У крыс самок, получивших генную терапию, выявлено существенное увеличение всех показателей, за исключением числа нейронов по сравнению с данными 5 группы в аналогичной временной точке (таблица 2).

**Табл. 2.** Данные морфометрического исследования первичной соматосенсорной коры крыс самок и активности ферментов

Показатель	4 группа (интактная)	5 группа (контрольная; без лечения)		6 группа (терапия AAVR15)	
		21-е сутки	42-е сутки	21-е сутки	42-е сутки
Число нейронов, абс.ед.	40,4±5,5 #	33,8±6,7^#	44,9±8,7^#	41,9±5,1*	40,0±9,6*
Размер нейронов, мкм <sup>2</sup>	115,2±16,0 #	101,8±13,5^	92,2±8,6^#	98,7±7,6^#	103,9±18,2^*
ИНД	0,06	0,47^#	0,31^	0,15^*	0,14^*#
Активность АХЭ, усл. ед.	78,7±14,5	66,1±14,0^	68,4±16,9^#	69,9±12,3^*	74,0±15,4^*#
Активность СДГ, усл. ед.	148,7±11,1 #	119,8±6,5^#	115,7±9,3^#	102,7±16,4^*#	123,2±7,5^*
Активность ЛДГ, усл. ед.	77,5±7,8	102,2±12,2^#	93,0±7,6^#	105,1±11,8^*#	101,7±6,9^*

Примечание: ^ –  $p < 0,05$  по отношению к показателям интактной группы, \* –  $p < 0,05$  по отношению к показателям контрольной группы, # –  $p < 0,05$  по отношению к показателям группы самцов

Сравнительный анализ морфометрических показателей позволил выявить различия у интактных самок крыс по сравнению с самцами: зафиксировали статистически значимое повышенное количество нейронов, уменьшенный размер нейронов со сниженной активностью СДГ без изменений других исследуемых показателей; в контрольной группе самок по сравнению с контрольной группой самцов зарегистрировали повышение ИНД, активности СДГ, снижение количества нейронов и активности ЛДГ на 21-е сутки эксперимента, в то время как на 42-е сутки повышалось число нейронов, уменьшался их размер снижались активность АХЭ, ЛДГ и СДГ (таблица 1, таблица 2). После однократной внутрицентральной инъекции AAVR15 на 21-е сутки эксперимента также выявили гендерные различия морфометрических показателей ишемизированной области соматосенсорной коры головного мозга: у самок был меньше размер нейронов, более низкая активность СДГ и ЛДГ; на 42-е сутки наблюдений после проведения аналогичного сопоставления определили, что у самок был более высокий ИНД и повышенная активность АХЭ без существенных отличий в других исследованных показателях (таблица 1, таблица 2).

Таким образом, полученные данные показали гендерные различия как в гистоструктурных изменениях, протекающих при моделировании ишемического инсульта, так и при репаративных процессах после введения тестируемой субстанции в область повреждения первичной соматосенсорной коры головного мозга. После однократной внутрицентральной инъекции нейротрофического фактора мозга, связанного с аденоассоциированным вирусным вектором, у крыс выявили тенденцию к улучшению показателей, отражающих процессы нейрорегенерации головного мозга в позднем постинсультном периоде, что является предпосылкой для формирования комплексного подхода в лечении и реабилитации данной патологии.

**Литература:**

- [1] Максимова М.Ю., Айранетова А.С. Гендерные особенности течения и прогноза ишемического инсульта / *Consilium Medicum*. 2019. Vol. 21, № 9. P. 9–15.
- [2] Coderre T.J., Katz J., Vaccarino A.L. et al. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence // *Pain*. 1993. Vol. 52. № 3. P. 259–285.
- [3] Terence J.C., Katz J., Vaccarino A.L. et al. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence // *Pain*. 1993. Vol. 52. № 3. P. 259–285.
- [4] Самойленкова Н.С., Гаврилова С.А., Дубина А.И. и др. Роль АТФ-зависимых калиевых каналов в процессе гипоксического и ишемического preconditionирования у крыс с фокальной ишемией мозга // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2007. Т. 4, № 6. С. 68–77.
- [5] Chen S.T., Hsu C.Y., Hogan E.L. et al. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarctions // *Stroke*. 1986. Vol. 17. P. 738–743.
- [6] Lu Y. Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy – a review // *Stem Cells Dev*. 2004. Vol. 13. P. 33–145.
- [7] Aarse J, Herlitze S, Manahan-Vaughan D. The requirement of BDNF for hippocampal synaptic plasticity is experience-dependent. // *Hippocampus*. 2016. Vol. 26. P. 739–751.
- [8] European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // *Europ. Treaty Series*. Strasbourg. 1986. № 123. P. 48.
- [9] Paxinos Y., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates // San Diego : Academic Press. 1998. P. 256 p.
- [10] Лойда З., Госсрай Р., Шублер Т. // *Гистохимия ферментов* / М.: Мир, 1982. 272 с.
- [11] Karnovsky M.A., Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases // *J. Histochem. Cytochem*. 1964. Vol. 12, № 3. P. 219–229.

ZH. A. HLADKOVA, T.E. KUZNETSOVA, E. V. FEDOROVA, S. G. PASHKEVICH, G. P. MIRONOVA,  
S. V. MANKOVSKAYA

**MORPHOMETRIC CHANGES IN THE RAT PRIMARY SOMATOSENSORY CORTEX WITH  
CEREBRAL ISCHEMIA AFTER INTRODUCTION OF A VECTOR CONSTRUCT CONTAINING  
A SECTION OF THE BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR GENE**

*State Scientific Institution "Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus",  
Minsk, Republic of Belarus*

**Summary**

The high degree of disability and mortality actualizes the search for new methods for the prevention and treatment of strokes. It seems promising to study medical substances aimed at restoring neurons in the early post-stroke period. The article discusses morpho-histochemical changes in the modeling of ischemic stroke, including geographical differences in the recovery of damaged parts of the rat brain, after a single intracerebral injection of brain-derived neurotrophic factor associated with an adeno-associated viral vector.

*Key words:* rat brain, ischemic stroke, intracerebral administration, biological therapy.