

**ПОВЫШЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА АСТРОЦИТОВ В МОДЕЛИ ТОТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС**

М.С. Кудабаева

Научный руководитель: доцент, д.б.н. М.Ю. Ходанович

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: kmsra08@gmail.com

**INCREASE OF ASTROCYTES NUMBER IN GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA IN
RATS**

M.S. Kudabaeva

Scientific Supervisor: Associate Prof., Dr. M. Yu. Khodanovich

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: kmsra08@gmail.com

Abstract. *Astrocytes are the most abundant cell class in the CNS. Astrocytic therapies have huge potential for neuronal repair after stroke. The most number of brain stroke studies address to clear damage of neurons. Modern studies turn to usage of morphological and functional changes in astroglial cells after stroke in regenerative medicine. Our study is focused on the changes of numbers of astrocytes in hippocampus (where new glia divide) after brain ischemia. Ischemia was modeled by occlusion of tr. brachiocephalicus, a. subclavia sin., a. carotis communis sin. Astrocytes were determined using immunohistochemical labeling with anti GFAP antibody. We found out that number of astrocytes increased in 10th and 30th days after stroke in CA1, CA2 fields, granular layer of dentate gyrus (GrDG) and hilus. Morphology of astrocytes became reactive in these regions. Our results reveal substantial long-term inflammation in hippocampus region after global ischemia in rats.*

Введение. Инсульт является одной из лидирующих причин смертности и инвалидизации населения по всему миру. Устранение последствий данного заболевания является важной задачей для медицины. Современные исследования по созданию лекарств, для лечения инсульта все чаще становятся, направлены на поддержку и регуляцию астроцитов при патологии. Астроглия играет важную роль в регуляции постинсультного воспаления. В данном исследовании было изучено влияние тотальной ишемии головного мозга (ТИГМ) на реактивацию астроцитов.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на 20 половозрелых крысах-самцах линии вистар (массой 250-300 г). Животные содержались в стандартных условиях вивария во время исследования. Моделирование тотальной ишемии проводилось путем хирургической окклюзии сосудов (левой общей сонной артерии, левой подключичной артерии, брахицефального ствола) с использованием лигатуры [1]. Ишемический эпизод длился 7 минут. После снятия лигатур наступала реперфузия сосудов. Во время операции использовался хлоралгидратный наркоз с искусственной вентиляцией легких, при транскардиальной перфузии – эфирный. Отслеживание изменений производилось в нескольких временных точках. Для этого животные делились на 4 группы: спустя 10 суток после ишемии - «Контроль-1», «Ишемия-1», спустя 30 суток - «Контроль-2», «Ишемия-2». Контрольным группам

проводились те же манипуляции за исключением затягивания лигатур и создания ишемического эпизода. Фиксация тканей проводилась при помощи 4% раствора формалина. Для криопротекции изъятый мозг помещался в 10% раствор сахарозы на 24 часа, после в 20% раствор сахарозы еще на 24 часа. После криопротекции ткани замораживались в парах азота и помещались для хранения в морозильную камеру на температуру -80°C . Срезы замороженных тканей получали с использованием криотома (*Thermo Scientific HM 525, Germany*) при ширине шага 10 мкм. Иммуногистохимический анализ тканей проводился с использованием специфических антител: к *GFAP* (*Rabbit anti GFAP, Alexa Flour, USA*) для оценки реактивации глии. Для осуществления флуоресцентной съемки использовался маркер к антителу: *Alexa Flour®488 Donkey anti Rabbit*. В ходе анализа подсчитывалось количество клеток в регионах гиппокампа: поля *CA1*, *CA2*, слои, *granular layer of dentate gyrus (GrDG)*, *hilus*. Анализ данных в программе STATISTICA 10 проводился с использованием t-критерия для несвязанных выборок.

Результаты. Статистический анализ данных показал увеличение количества астроцитов у группы «Ишемия-1» в зоне *CA2*, *hilus* ($p<0,01$), *CA1*, *GrDG* ($p<0,05$), по сравнению с группой «Контроль-1». Реактивная пролиферация астроцитов вокруг поврежденных нейронов усилилась более чем в два раза в поле *CA1*, *CA2*. Анатомически поля *CA1*, *CA2* обладают высокой плотностью нейронов и небольшим количеством глии. Миграция и пролиферация глии в этой зоне свидетельствует о наличии воспаления. Наименее сильные изменения на 10 сутки наблюдались в слое *GrDG*, где ишемическому воздействию подвергаются не только взрослые астроциты, но и радиальная глия, экспрессирующая *GFAP* (Рис.1). Данные изменения свидетельствует об индукции деления стволовых клеток.

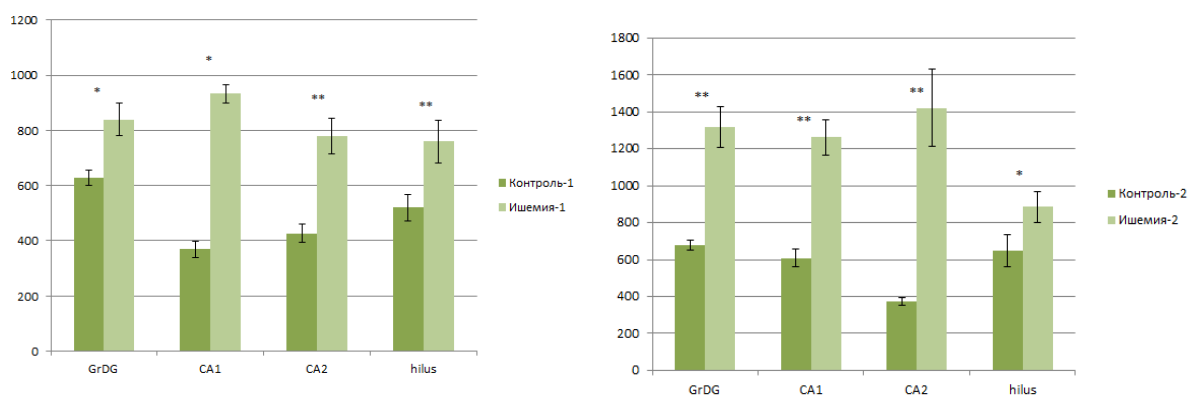


Рис. 1. Увеличение количества астроцитов в слоях гиппокампа после ишемического поражения на 10 и 30 сутки. Указано количество клеток на мм^2 . Представлены средние по группе со стандартной ошибкой средней. Статистические различия отмечены символами: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$.

Различия между группами усиливаются на 30 сутки. Наблюдается значительное повышение количества астроцитов в слоях *GrDG*, *CA1*, *CA2* ($p<0,01$), *hilus* ($p<0,05$) в группе «Ишемия-2» по сравнению с группой «Контроль-2». Количество астроцитов в поле *CA2* превышает контрольные показатели более чем в 3 раза. Усиление различий по сравнению с контролем в слое *GrDG* говорит, о наличии пика деления стволовых клеток в гранулярном слое в период около 30 суток после ишемии.

Астроциты сохраняли морфологию характерную для состояния реактивации в обеих ишемических группах, о чем свидетельствует характерное «набухание» клеток, увеличение ветвистости и удлинение отростков, идентифицируемых по усилению экспрессии и распределению *GFAP* (Рис. 2). Такая морфология сохраняется во всех временных точках исследования после ишемии.

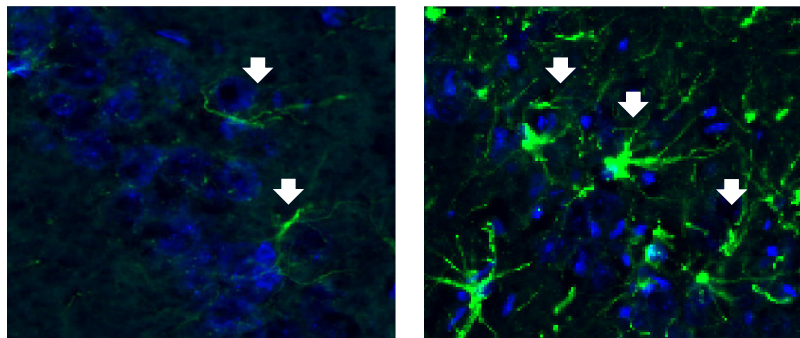


Рис. 2. Изменение количества астроцитов в поле CA1 гиппокампа крыс. Слева представлена группа «Контроль-1», справа показана группа «Ишемия - 1». В синий цвет окрашены ядра клеток (DAPI), зеленым окрашены отростки астроцитов (*GFAP*). Размер изображения: 100 мкм. Увеличение $\times 20$.

Заключение. Пирамидальные нейроны поля CA1 наиболее чувствительны к ишемическому воздействию, снижение кровоснабжения приводит к отмиранию нейронов данного слоя. Поврежденные клетки поля CA1 и исходящие от них сигналы индуцируют реактивацию астроглии. Наши данные свидетельствуют о запуске репаративных процессов, приводящих к ограничению очага воспаления после ишемии. Воспалительные процессы усиливаются в течение месяца после воздействия ТИГМ. Реактивация астроглии изменяет ее функции по поддержки метаболизма нейронов. Исходя из наших данных, доказывающих сохранение реактивации глии спустя месяц после ишемического эпизода, можно предположить, что постишемическое воспаление обладает патогенным потенциалом по отношению к здоровым нейронам, прилегающих к слою CA1. Постнатальное деление стволовых клеток сохраняется в зоне *GrDG* гиппокампа и является физиологически значимым процессом. Ряд ученых высказывает предположение, что гибель нейронов является индуктором пролиферации стволовых клеток, которые могут дифференцироваться в нейрональные прогениторы [2]. Наши данные доказывают, что ишемия является фактором стимулирующим деление *GFAP*-положительных стволовых клеток.

Работа поддержана грантом РНФ (проект № 14-45-00040).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pecna M., Pecny M. (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol. Rev.*, Vol. 94, pp. 1077–1098.
2. Chernysheva G. A., Smolyakova V. I., Osipenko A. N., & Plotnikov M. B. (2014) Evaluation of Survival and Neurological Deficit in Rats in the New Model of Global Transient Cerebral Ischemia. *Bull. Exp. Biol. Med*, Vol.158, no. 2, pp. 197–199.