

*Ерениев С.И.<sup>1</sup>, Семченко В.В.<sup>2</sup>, Степанов С.С.<sup>3</sup>*

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОРЫ  
СЕНСОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ  
БИЛАТЕРАЛЬНОЙ ИНТРАГИППОКАМПАЛЬНОЙ АЛЛО- И  
КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ**

<sup>1</sup> – кафедра гигиены труда, профпатологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск;

<sup>2</sup> – кафедра анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии института ветеринарной медицины и биотехнологий ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», Омск;

<sup>3</sup> – кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск, Россия

*Изучены цито-, ангио- и синаптоархитектоника по краю раневого канала и перифокальных участков коры сенсомоторной области больших полушарий головного мозга крыс Вистар при проколе неокортекса стеклянной трансплантационной иглой, алло- и ксенотрансплантации ткани эмбрионального мозга. Установлено, что в прилежащих к раневому каналу участках неокортекса при нейротрансплантации ускоряется замещение раневого канала глиозным рубцом; уменьшается реактивный глиоз и количество необратимо и реактивно измененных нейронов, сохраняется численная плотность нейронов в слое III, увеличивается количество функционально активных капилляров в слоях I-III, сохраняется близкая к контролю синаптоархитектоника в слое I неокортекса.*

*Ключевые слова: алло- и ксенотрансплантация эмбриональной нервной ткани, сенсомоторная кора, морфометрия.*

*Ereniev S.I.<sup>1</sup>, Semchenko V.V.<sup>2</sup>, Stepanov S.S.<sup>3</sup>*

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE  
CEREBRAL CORTEX OF THE SENSORIMOTOR REGION OF THE RAT  
BRAIN AFTER BILATERAL INTRAHIPPOCAMPAL ALLO- AND  
XENOTRANSPLANTATION OF EMBRYONIC NEURAL TISSUE**

<sup>1</sup> – Chair of labor hygiene, occupational pathology FSBE HE «Omsk State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Omsk;

<sup>2</sup> – Chair of Anatomy, Histology, Physiology and Pathological Anatomy at the Institute of Veterinary Medicine and Biotechnologies

FSBEI HE «The Omsk P.A. Stolypin State Agrarian University», Omsk;

<sup>3</sup> – Chair of Histology, Cytology and Embriology FSBE HE «Omsk State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Omsk, Russian

*The cyto-, angio- and synaptoarhitektonics along the edge of the wound channel and perifocal areas of the cortex of the sensorimotor region of the cerebral hemispheres of the Wistar rat brain during the puncture of the neocortex by a glass transplant needle, allo and xenotransplantation of the embryonic brain tissue. It has been established that in the adjacent areas of the neocortex during neurotransplantation, the replacement of the wound channel with a glial scar is accelerated; Decreases reactive gliosis and the number of irreversibly and reactively altered neurons, the neuronal density in the III layers is preserved, the number of functionally active capillaries in layers I-III is increased, remains close to the control of synaptoarchitektonics in the molecular layer of the neocortex.*

*Keywords: allo- and xenotransplantation of embryonic nerve tissue, sensorimotor cortex, morphometry.*

**Введение.** Экспериментальное и клиническое использование клеточных продуктов (эмбриональных, фетальных, нейрональных и соматических стволовых клеток) как направление биомедицины в доклинических и клинических исследованиях существует на протяжении многих десятилетий [1, 8]. Юридически законным применение биомедицинских клеточных материалов в России стало с 01.01.2017 г. в связи с публикацией Федерального закона № 180-ФЗ от 23.06.2016 г.

**Основные методы исследования.** Эксперименты выполнены на половозрелых крысах Вистар (n=81) обоего. Экспериментальные группы: контрольная (n=9), группа сравнения (повреждение без трансплантации, n=24), основная группа I (повреждение с аллотрансплантацией, n=24), основная группа II (повреждение с ксенотрансплантацией, n=24). Материал для исследования забирали на 2-, 7-, 15-, 30-, 45- и 60-е сутки эксперимента. Опыты проводились в соответствии с приказом МЗ СССР № 755, от 12.08.77 г. и № 701 от 27.07.78 г. об обеспечении принципов гуманного обращения с экспериментальными животными. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом путем декапитации.

Повреждение участков сенсомоторной коры (поле  $F^{pa}$  и  $F^{pp}$ ) и  $CA_1$  ( $AP=-3,75$ ;  $L=2,4$ ;  $H=2,75$  мм) и  $CA_3$  ( $AP=-3,3$ ;  $L=3,0$ ;  $H=3,75$  мм) полей гиппокампа крыс Вистар, согласно стереотаксическим координатам мозга крысы [7], проводили с помощью стеклянной трансплантационной иглы и одновременного введения через иглу 0,1 мл физиологического раствора.

Для аллотрансплантации в качестве донорского материала использовали

фрагменты сенсомоторной коры эмбрионов крыс Вистар (Э 15 сут), для ксенотрансплантации - фрагменты переднего мозгового пузыря эмбриона человека (Э 7-10 нед) [6], получаемых при плановых искусственных прерываниях беременности.

С помощью стереотаксического аппарата Gyartasisz (Budapest) трансплантаты вводили в участки CA<sub>1</sub> (AP=- 3,75; L=2,4; H=2,75 мм) и CA<sub>3</sub> (AP=-3,3; L=3,0; H=3,75 мм) полей гиппокампа.

Критерием приживления трансплантата служили васкуляризация, увеличение объема трансплантата, наличие в нем дифференцированных нейронов без выраженных морфологических изменений, отсутствие признаков воспаления, малигнизации и сплошной глиальной капсулы вокруг трансплантата [2].

Анализировали данные по животным с морфологически подтвержденным приживлением трансплантата на окрашенных тионином по Нисслю парафиновых и целлоидиновых срезах толщиной 7-8 мкм.

Для электронномикроскопического исследования сенсомоторную кору головного мозга крыс (поле F<sup>pa</sup> и F<sup>pp</sup>) фиксировали погружением в смеси 1% раствора глутарового альдегида и 4% раствора параформа на 0,1 М фосфатном буфере (рН - 7,4) с добавлением сахарозы (5%), дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия в течение, заключали в смесь эпона и аралдита. Тангенциальные ультратонкие срезы коры контрастировали уранилацетатом, цитратом свинца. Осмированный материал использовали для качественной и количественной оценки состояния нейронов и их отростков, глиоцитов, кровеносных капилляров и синапсов.

Для верификации парамембранных специализированных образований пре- и постсинаптической частей – ССЕ (системы субсинаптических единиц) – плотных проекций (ПП), постсинаптического уплотнения (ПУ) и синаптической щели использовали метод контрастирования в 1%-ом растворе фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК) на абсолютном спирте (100%) [4, 5]. На электроннограммах определяли общую численную плотность синапсов на 100 мкм<sup>2</sup> нейропиля, содержание симметричных, асимметричных, плоских и

синапсов. Кроме того, оценивали высоту ПП, длину активной зоны контакта (АЗК), площадь АЗК, площадь свободной от АЗК поверхности шипика (СПШ), отношение СПШ/АЗК, суммарную длину АЗК на 100 мкм<sup>2</sup> нейропиля. Обработку материала проводили на цифровых изображениях с помощью программы ImageJ 1.46.

Статистический анализ полученного материала проводили с использованием стандартного пакета прикладных статистических программ «STATISTICA-6» [3]. Проверку статистических гипотез проводили с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Нулевая гипотеза отвергалась при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** При проколе стеклянной иглой коры сенсомоторной области мозга и участков СА<sub>1</sub> и СА<sub>3</sub> полей гиппокампа в прилежащей к треку коре на 2-е сутки после нейротрансплантации отмечался околоклеточный и околосоудистый отек, увеличение тел и ядер нейронов, наличие в них вакуолей и просветленных участков цитоплазмы, гиперхромия других нейронов. Увеличивалось количество сателлитарной глии, гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней.

Через 7 суток после нейротрансплантации выраженность деструктивных изменений нейронов и кровеносных сосудов в прилежащем неокортексе уменьшалась. Вокруг раневого канала в увеличенных ядрах глиоцитов выявлялась базофильная зернистость. В части нейронов обнаруживались участки хроматолиза, единичные мелкие вакуоли, в перинуклеарном слое цитоплазмы чаще встречались мелкие электронноплотные митохондрии. В эндотелиоцитах увеличивалось количество пиноцитозных пузырьков. Выявлялись единичные нейроны с просветленным ядром и большим ядрышком, уменьшением гранулярного эндоплазматического ретикулума, большим содержанием мелких митохондрий и свободно лежащих полисом. Обнаруживались митотически делящиеся глиоциты. Астроциты имели светлую цитоплазму, множество липофусциновых гранул, лизосом, фагосом, нередко 2

ядра различных размеров. Олигодендрциты содержали небольшое число полисом, митохондрий, жировых капель в темной цитоплазме. К этому сроку увеличивалось количество гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней, гипер- и гипохромных нейронов и глиоцитов. Глио-нейронный индекс увеличивался в 2 раза.

Через 15 суток после нейротрансплантации численная плотность глиальных клеток вокруг раневого канала достигала максимального уровня, но оставалась в 1,56 раза меньше, чем при очаговом повреждении мозга без нейротрансплантации.

К 45-м суткам после нейротрансплантации численная плотность глиальных клеток вокруг раневого канала уменьшалась и приближалась к контролю. Замещение раневого канала глиозным рубцом происходило быстрее, чем в случаях без нейротрансплантации. Уменьшалось, но превышало контрольный уровень количество гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней, гипер- и гипохромных нейронов, глио-нейронный индекс. Поля запускания нервных клеток выявлялись редко. Численная плотность нейронов в слое III коры сенсомоторной области не отличалась от контроля. Количество гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней было меньше в 4,2 раза, гипер- и гипохромных нейронов – в 2 раза.

На расстоянии 1,5–2 мм от края раневого канала на 45-е сутки после прокола неокортекса и участков CA<sub>1</sub> и CA<sub>3</sub> полей гиппокампа численная плотность нейронов в слое III коры сенсомоторной области уменьшалась, увеличивалось относительное количество гиперхромных сморщенных нейронов, клеток-теней, гипер- и гипохромных нейронов, глиальных клеток, в слоях I–III - функционально активных капилляров.

На 7-е сутки после очагового повреждения и нейротрансплантации просвет мелких сосудов уменьшался незначительно, менее выраженным был отек периваскулярных отростков астроглии. Плотность функционально активных капилляров в слоях I–III увеличивалась. Сокращалась редукция численной плотности синапсов в молекулярном слое. Общая численная

плотность синаптических контактов, симметричных и плоских контактов в нейропиле слоя I при нейротрансплантации была статистически значимо больше, чем у животных группы сравнения (табл. 1). Увеличивалось относительное количество и абсолютное содержание, очень мелких, мелких и средних межнейронных контактов, нормализовалось содержание крупных и очень крупных контактов (табл. 2) и синапсов с высотой ПП 51-60 нм (табл. 3), в меньшей мере увеличивалась площадь АЗК аксо-шипиковых синапсов и свободная от АЗК поверхность шипиков (табл. 4).

Таблица 1

Численная плотность синаптических контактов с различной организацией ССЕ в молекулярном слое коры сенсомоторной области мозга половозрелых крыс Вистар через 7 суток после прокола стеклянной трансплантационной иглой и билатеральной интрагиппокампальной трансплантации эмбриональной нервной ткани (ФВК-метод),  $M \pm m$

Показатель	Интактные животные (n=9)	Группы		
		сравнения	основные	
		очаговое повреждение мозга (n=24)	очаговое повреждение мозга и алло-трансплантация (n=24)	очаговое повреждение мозга и ксено-трансплантация (n=24)
Число синапсов на 100 мкм <sup>2</sup> нейропиля:				
- всего	17,69±0,41	13,48±0,36	16,40±0,41*	15,83±0,33*
- асимметричных	14,54±0,28	10,57±0,51	10,79±0,33	11,24±0,31
- симметричных	3,15±0,20	2,91±0,16	5,61±0,10*	4,59±0,11*
- плоских	5,88±0,42	5,55±0,19	7,41,0±0,18*	8,18±0,26*
- искривленных	8,66±0,17	8,81±0,42	8,99±0,28	7,65±0,27*
Диаметр АЗК, нм	372,8±34,3	425,4±23,1	402,7±16,3*	443,2±21,7*
Суммарная длина АЗК, нм	6595,2±607,5	6108,6±332,0	6603,5±267,4*	7016,0±335,4*

**Примечание.** В таблицах 1–4: \* – различия в сравнении с очаговым повреждением без трансплантации статистически значимы при  $p < 0,05$  (t-критерий Пирсона для независимых выборок). Материал представлен как среднее (M) ± ошибка средней (m). ССЕ – система субсинаптических единиц; ПП – плотные проекции; АЗК – активная зона контакта; СПШ – свободная поверхность шипика; ФВК – фосфорно-вольфрамовая кислота.

Таблица 2

Численная плотность синаптических контактов с различной длиной АЗК в молекулярном слое коры сенсомоторной области мозга половозрелых крыс Вистар через 7 суток после прокола стеклянной трансплантационной иглой и билатеральной интрагиппокампальной трансплантации эмбриональной нервной ткани (ФВК-метод),  $M \pm m$

Длина АЗК, нм	Группы			
	интактные животные	очаговое повреждение мозга	очаговое повреждение мозга и аллотрансплантация	очаговое повреждение мозга и ксенотрансплантация
<200	1,01 ±0,02	1,48±0,24	2,41±0,12*	1,77±0,10
201-400	7,92±0,52	3,30±0,49	5,84±0,30*	6,22±0,15*
401-600	4,50±0,23	2,37±0,31	3,36±0,18*	3,98±0,10*
601-800	3,24±0,39	4,02±0,47	3,75±0,19	2,89±0,10*
>800	1,02±0,04	2,31 ±0,23	1,04±0,10*	0,96±0,10*

Таблица 3

Численная плотность асимметричных контактов с различной высотой плотных проекций в молекулярном слое коры сенсомоторной области мозга половозрелых крыс Вистар через 7 суток после прокола стеклянной трансплантационной иглой и билатеральной интрагиппокампальной трансплантации эмбриональной нервной ткани (ФВК-метод),  $M \pm m$

Группы	Число синапсов с различной высотой ПП		
	> 60 нм	60-51 нм	50 нм и <
Интактные животные	7,26±0,37	6,19±0,29	4,24±0,16
Очаговое повреждение мозга	7,91±0,40	3,09±0,16	3,36±0,17
Очаговое повреждение мозга и аллотрансплантация	6,61±0,35	6,72±0,35*	3,07±0,21
Очаговое повреждение мозга и ксенотрансплантация	6,05±0,88	5,92±0,85*	3,86±0,36

Таблица 4

Дендритные шипики молекулярного слоя коры сенсомоторной области мозга половозрелых крыс Вистар через 7 суток после прокола стеклянной трансплантационной иглой и билатеральной интрагиппокампальной трансплантации эмбриональной нервной ткани,  $M \pm m$

Показатель	Группы			
	интактные	очаговое повреждение мозга	очаговое повреждение мозга и аллотрансплантация	очаговое повреждение мозга и ксенотрансплантация
Площадь АЗК, нм	109111±926	142054±3860	127273±2578*	154205±3725*
Своб. от АЗК поверхность шипика (СПШ), нм <sup>2</sup>	278233±2361	383547±13923	327091±8625*	379344±6437
СПШ/АЗК	2,55	2,70	2,57*	2,46*

Влияние ксенотрансплантации ткани стенки переднего мозгового пузыря эмбриона человека 7–10-недельного внутриутробного развития на морфофункциональное состояние неокортекса было сходно с влиянием аллотрансплантации ткани эмбрионального неокортекса. Различия носили количественный характер. При ксенотрансплантации выявлялось большее количество гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней, гипер- и гипохромных нейронов, меньшее количество очень мелких контактов (табл. 2), более выраженная гипертрофия аксо-шипиковых синапсов и увеличение свободной от АЗК поверхности шипиков (табл. 4).

**Заключение.** При очаговом повреждении мозга внутримозговая алло- и ксенотрансплантация ткани эмбрионального неокортекса сопровождается ускоренным замещением раневого канала в коре сенсомоторной области мозга половозрелых крыс глиозным рубцом; уменьшением реактивного глиоза в окружающей раневой канал ткани и количества необратимо и реактивно измененных нейронов; сохранением численной плотности нервных клеток в слое III; увеличением количества функционально активных капилляров в слоях I–III; сохранением близкого к контрольному уровню количества межнейронных контактов в молекулярном слое; увеличением содержания очень мелких контактов; нормализацией количества очень крупных контактов; уменьшением гипертрофии аксо-шипиковых синапсов в прилежащих к раневому каналу участках неокортекса.

#### Литература

1. Новик А.А., Иванов Р.А. Клеточная терапия. / Под ред. Ю.Л. Шевченко. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 240 с.
2. Полежаев Л.В., Александрова М.А., Витвицкий В.Н. и др. Трансплантация ткани мозга в биологии и медицине. – М.: Наука, 1993. – 239 с.
3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. - М.: МедиаСфера, 2002. - 312 с.
4. Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты) (2-е издание). – Москва: 2014. -408 с.
5. Семченко В. В. Структурно-функциональное восстановление нервной ткани головного мозга в постишемическом периоде с позиций представления о провизорности в репаративном гистогенезе / В. В. Семченко, С. С. Степанов, С. И. Ерениев // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2016. - № 2. - С. 98–102.

6. Фалин Л.И. Эмбриология человека. Атлас. – М.: Медицина, 1976. – 543 с.
7. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. - San Diego (California): Elsevier Academic Press; 2005. – 367 p.
8. Ярыгин К.Н., Семченко В.В., Ерениев С.И. и др. Регенеративная биология и медицина. Книга II. Клеточные технологии в терапии болезней нервной системы. – Екатеринбург-Москва-Омск-Томск-Ханты-Мансийск: Омская областная типография, 2015. – 360 с.

Репозиторий БГМУ