

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

**ЦИТО-, АНГИО- И СИНАПТОАРХИТЕКТОНИКА КОРЫ  
СЕНСОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ОЧАГОВОГО  
ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕОКОРТЕКСА И ГИППОКАМПА**

- <sup>1</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>2</sup> - кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск;
- <sup>3</sup> - кафедра гигиены труда, профпатологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск

*Изучены цито-, ангио- и синаптоархитектоника по краю раневого канала и перифокальных участков коры сенсомоторной области больших полушарий головного мозга при проколе неокортекса и участков CA<sub>1</sub> и CA<sub>3</sub> гиппокампа стеклянной трансплантационной иглой. Установлено, что в участках коры, удаленных от раневого канала на 1,5-2 мм, через 45 сут выраженные изменения нейронов, глиальных клеток, кровеносных сосудов и межнейронных контактов отсутствуют.*

*Ключевые слова: сенсомоторная кора, гиппокамп, прокол трансплантационной иглой, морфометрия.*

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

**CYTO-, ANGIO- AND SYNAPTOARHITEKTONICS OF THE CORTEX OF  
THE SENSORIMOTOR REGION OF THE RAT BRAIN AFTER FOCAL  
LESION OF THE NEOCORTEX AND HIPPOCAMPUS**

- <sup>1</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>2</sup> - Chair of Histology, Cytology and Embriology FSBE HE «Omsk State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Fediration, Omsk;
- <sup>3</sup> - Chair of labor hygiene, occipational pathology FSBE HE «Omsk State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Fediration, Omsk

Cyto-, angio- and synaptoarchitectonics were studied along the edge of the wound channel and perifocal areas of the cortex of the sensorimotor region of the cerebral hemispheres when the neocortex and CA<sub>1</sub> and CA<sub>3</sub> sections of the hippocampus were punctured by a glass transplant

needle. It was established that in the areas of the cortex, removed from the wound channel by 1.5-2 mm, after 45 days, pronounced changes in neurons, glial cells, blood vessels and interneuronal contacts are absent.

*Keywords: sensorimotor cortex, hippocampus, puncture with transplant needle, morphometry.*

**Введение.** В связи с публикацией и вступлением в силу с 01.01.2017 г. Федерального закона № 180-ФЗ от 23.06.2016 г. «О биомедицинских клеточных продуктах» [1], регулирующего отношения, возникающие в связи с разработкой, доклиническими исследованиями, клиническими исследованиями биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для профилактики, диагностики и лечения заболеваний и состояний, актуальным является изучение влияния методов и средств введения клеточного материала на морфо-функциональное состояние органа-мишени.

**Основные методы исследования.** Эксперименты выполнены на половозрелых крысах Вистар обоего пола (n=48) из вивария ЦНИЛ Омского государственного медицинского университета. *Экспериментальные группы:* группа сравнения (интактные животные) (n=24), основная группа (билатеральное очаговое повреждение неокортекса и гиппокампа) (n=24). Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом путем декапитации. 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.

Двустороннее повреждение участков сенсомоторной коры (поле F<sup>pa</sup> и F<sup>pp</sup>) и 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 крыс Вистар, согласно стереотаксическим координатам мозга крысы [5], проводили с помощью прокола структур мозга по заданным координатам стеклянной трансплантационной иглой (наружный диаметр 0,7 мм, внутренний - 0,5 мм, скос иглы 45°) и одновременного введения через иглу относительно большого объема (0,1 мл) физиологического раствора. Контролем

служили половозрелые крысы Вистар без очагового повреждения неокортекса и гиппокампа.

По завершении экспериментов проводили морфологическую верификацию топки стереотаксических манипуляций (разрушения участков сенсомоторной коры и полей гиппокампа) на окрашенных тионином по Нисслю парафиновых и целлоидиновых срезах толщиной 7-8 мкм.

Для электронномикроскопического исследования сенсомоторную кору головного мозга крыс (поле  $F^{pa}$  и  $F^{pp}$ ) 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%). Затем материал отмывали в фосфатном буфере в течение 1 ч, дофиксировали в 1% растворе четырехокси осмия в течение 2 ч, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и 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 системы субсинаптических единиц (ССЕ), плотных проекций (ПП), постсинаптического уплотнения (ПУ) и синаптической щели использовали метод контрастирования в 1%-ом растворе фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК) на абсолютном спирте (100%) [3, 4]. Ультратонкие срезы изучали и фотографировали на электронном микроскопе ЭМВ-100 АК. На полученных электроннограммах определяли общую численную плотность синапсов на  $100 \text{ мкм}^2$  нейропиля, содержание симметричных, асимметричных и смешанных синапсов, плоских, положительно и отрицательно искривленных, неперфорированных и перфорированных синапсов. Кроме того, оценивали высоту ПП (типы А, В, С), длину активной зоны контакта (АЗК), площадь АЗК, площадь свободной от АЗК поверхности шипика (СПШ), отношение СПШ/АЗК, суммарную длину АЗК на  $100 \text{ мкм}^2$  нейропиля. Случайным образом выбранные участки среза

фотографировали при стандартном увеличении  $\times 15000$ . 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» [2]. 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 билатеральном проколе коры сенсомоторной области мозга и участков CA<sub>1</sub> и CA<sub>3</sub> полей гиппокампа стеклянной трансплантационной иглой патологические процессы в нейронах неокортекса по краю раневого канала начинались с появления пучков филаментов и липидных капель, разрушения аппарата Гольджи, потери полирибосом, потемнения цитоплазмы. Увеличивались размеры тела нейронов. В части нервных клеток ядро перемещалось к периферии, очагово уменьшалась плотность цитоплазмы, утрачивался цитоскелет. В дальнейшем происходила фрагментация ядра, конденсация хроматина, повышалась гранулярность нуклеоплазмы, увеличивалось число контактов нейронов с фагоцитирующими клетками. В телах нейронов выявлялись многочисленные цитоплазматические вакуоли различных размеров (первичные эндосомы, вторичные лизосомы, остаточные тельца). Плазматическая и ядерная мембраны растворялись, уменьшалась плотность оставшихся фрагментов нейронов, образовывались пикнотические частицы.

На 2-е сутки после прокола неокортекса в начальной части дендритов по краю раневого канала цитоплазма становилась светлой, верхушки дендритов были не изменены, дегенерация их мембран не выявлялась. Уменьшалось количество микротрубочек и нейрофиламентов в дендритах глии. Плотность глиальных клеток по краю раневого канала в 2 раза превышала контрольный (интактные животные) уровень.

Через 7 суток после прокола вокруг раневого канала располагались многочисленные дегенерирующие нейроны. В некротической ткани выявлялось

большое количество макрофагов. В центре повреждения появлялись глиоциты, фибробласты, замещающие тромб и дающие коллагеновые фибриллы. Выявлялись единичные конусы роста аксонов.

На 15-е сутки глиальный рубец достигал глубины повреждения, начиналось развитие краевой глии. Рана сокращалась, уменьшалось число мезенхимных клеток. Дегенерирующие нейронные элементы в окружающей рану нейропиле в основном исчезали. Конусы роста становились более многочисленными.

К 30-м суткам краевая глия отделяла макрофаги и фибробласты от окружающего нейропиля. На дендритных расширениях выявлялись мелкие симметричные синапсы. Плотность глиальных клеток по сравнению с 7-15-ми сутками уменьшалась.

К 45-60-м суткам регенерация поврежденного нейропиля включала рост аксонов и образование новых синаптических контактов. По всему треку от иглы был сформирован глиозный рубец. Плотность глии вблизи участка повреждения мозга снижалась, но превышала контрольный уровень.

Морфометрически определялось уменьшение численной плотности нейронов в прилежащих к раневому каналу участках слоев III-IV, увеличение количества гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней, гипер- и гипохромных нейронов, численной плотности глиальных клеток, увеличение глио-нейронного индекса, уменьшение численной плотности на  $1 \text{ мм}^2$  и длины функционально активных кровеносных капилляров в  $1 \text{ мм}^3$ . Полного восстановления морфологической картины в прилежащем к раневому каналу неокортексе к 60-м суткам посттравматического периода не происходило. Оставались повышенными количество гиперхромных сморщенных нейронов, клеток-теней, гипер- и гипохромных нейронов, глиальных клеток и глио-нейронный индекс.

На расстоянии 1,5 - 2 мм от раневого канала через 45 суток после прокола неокортекса численная плотность нейронов, гиперхромных сморщенных

нейронов и клеток-теней в слоях III-IV не отличалась от контроля. Оставалось увеличенным количество гипер- и гипохромных нейронов.

При этом численная плотность синапсов с различной организацией ССЕ, диаметр синаптических контактов, общая длина синапсов на 100 мкм нейропиля (табл. 1), число синапсов с различной длиной АЗК (табл. 2) и высотой ПП (табл. 3) не отличались от таковых у интактных животных. Отмечалась умеренная гипертрофия аксо-шиповых синапсов молекулярного слоя неокортекса (табл. 4).

Таблица 1

Численная плотность синаптических контактов с различной организацией ССЕ в нейропиле молекулярного слоя коры сенсомоторной области мозга половозрелых крыс Вистар через 45 сут после прокола стеклянной трансплантационной иглой (ФВК-метод) ( $X \pm s_x$ )

Показатель	Группы	
	Интактные (n=8)	Очаговое повреждение мозга (n=8)
Число синапсов на 100 мкм <sup>2</sup> нейропиля		
всего	17,69±0,41	18,53±0,59
асимметричные	14,54±0,28	14,73±0,55
симметричные	3,15±0,20	3,80±0,24
плоские	5,88±0,42	6,23±0,53
искривленные	8,66±0,17	8,50±0,31
Диаметр активной зоны контакта, нм	372,8±34,3	449,80±60,76
Суммарная длина активной зоны контакта, нм	6595,2±607,5	8334,01±181,5

Примечание. АЗК – активная зона контакта.

Таблица 2

Численная плотность синаптических контактов с различной длиной АЗК в молекулярном слое коры сенсомоторной области мозга половозрелых крыс Вистар через 45 сут после прокола стеклянной трансплантационной иглой (ФВК-метод) ( $X \pm s_x$ )

Длина активной зоны контакта, нм	Группы животных	
	интактные (n)=8	очаговое повреждение мозга (n=8)
<200	1,01 ±0,02	1,14±0,02*
201-400	7,92±0,52	7,93±0,52
401-600	4,50±0,23	4,95±0,28
601-800	3,24±0,39	3,79±0,43
>800	1,02±0,04	0,72±0,03*

Примечание. \* - различия с контролем достоверны (P<0,05).

Таблица 3

Численная плотность асимметричных контактов с различной высотой плотных проекций в молекулярном слое коры сенсомоторной области мозга половозрелых крыс Вистар через 45 сут после прокола стеклянной трансплантационной иглой (ФВК-метод) ( $X \pm s_x$ )

Группы животных	Число синапсов с различной высотой плотных проекций		
	> 60 нм	60-51 нм	50 нм и <
Интактные (n=8)	7,26±0,37	6,19±0,29	4,24±0,16
Очаговое повреждение мозга (n=8)	5,52±0,41*	5,57±0,22	3,64±0,17

**Примечание.** \* - различия с контролем достоверны ( $P < 0,05$ ).

Таблица 4

Дендритные шипики молекулярного слоя коры сенсомоторной области мозга половозрелых крыс Вистар через 45 сут после прокола стеклянной трансплантационной иглой ( $X \pm s_x$ )

Показатель	Группы животных	
	интактные (n)=8	очаговое повреждение мозга (n=8)
Площадь АЗК, $\text{нм}^2$	109111±926	158821±9727*
Свободная от АЗК поверхность шипика (СПШ), $\text{нм}^2$	278233±2361	414784±27997*
СПШ / АЗК	2,55	2,61

**Примечание.** \* - различия с контролем достоверны ( $P < 0,05$ ).

## Выводы

1. Билатеральный прокол коры сенсомоторной области мозга и участков СА<sub>1</sub> и СА<sub>3</sub> полей гиппокампа половозрелых крыс Вистар стеклянной трансплантационной иглой приводит к уменьшению численной плотности нейронов, увеличению количества гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней, гипер- и гипохромных нейронов, численной плотности глиальных клеток в прилежащих к раневому каналу участках неокортекса.

2. Эти изменения обнаруживаются до 60-х суток посттравматического периода.

3. В участках коры, удаленных от раневого канала на 1,5-2 мм, через 45 сут выраженные изменения нейронов, глиальных клеток, кровеносных сосудов и межнейронных контактов отсутствуют.

#### Литература

1. О биомедицинских клеточных продуктах. Федеральный закон от 23.06.2016 г. № 180-ФЗ.
2. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. - М.: МедиаСфера, 2002. - 312 с.
3. Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты) (2-е издание). - Москва, 2014. - 408 с.
4. Семченко В. В. Структурно-функциональное восстановление нервной ткани головного мозга в постшемическом 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.
5. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. - San Diego (California): Elsevier Academic Press, 2005. – 367 p.