

**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 СА<sub>1</sub> и СА<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 CA1 and CA3 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  $F^{pa}$  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 [5], проводили с помощью прокола структур мозга по заданным координатам стеклянной трансплантационной иглой (наружный диаметр 0,7 мм, внутренний - 0,5 мм, скос иглы  $45^\circ$ ) 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 четырехоксида 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.