ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 616-005.4-036-092.9 doi:10.18499/2225-7357-2022-11-2-43-51 1.5.22 – клеточная биология 3.3.2 – патологическая анатомия



Нейроглиальные взаимоотношения и структуры межнейронной коммуникации слоя V сенсомоторной коры белых крыс после перевязки общих сонных артерий

Л. М. Макарьева¹, М. С. Коржук^{1, 2}, В. А. Акулинин^{1⊠}, С. С. Степанов¹, А. Ю. Шоронова¹, Д. Б. Авдеев¹

¹Омский государственный медицинский университет, Омск, Россия ²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Цель исследования – изучить изменения нейронов, глиоцитов и структур системы межнейронной коммуникации (дендритов, терминалей) слоя V сенсомоторной коры (СМК) головного мозга половозрелых белых крыс после двусторонней перевязки общих сонных артерий (ПОСА).

Материал и методы. Острую / хроническую неполную ишемию головного мозга моделировали на белых крысах Wistar путем ПОСА. Мозг фиксировали путем перфузии. Проводили сравнительную гистологическую, иммуногистохимическую и морфометрическую оценку соответствующих структур в норме (n=6), через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ПОСА (n=30). Использовали окраски по Нисслю и гематоксилинэозином, иммуногистохимические реакции на NSE, MAP-2, p38, GFAP и IBA1. Определяли численную плотность пирамидных нейронов, астроцитов, олигодендроцитов, микроглиоцитов и относительную площадь p38-позитивного материала (терминали синапсов). Проверку статистических гипотез проводили с помощью непараметрических методов в программе Statistica 8.0.

Резильтаты. ПОСА приводила к появлению в слое V СМК деструктивно измененные темных, гипохромных, вакуолизированных нейронов и клеток-теней. Эти изменения сопровождались уменьшением общей численной плотности пирамидных нейронов, гипергидратацией нейропиля (отростков дендритов, астроцитов и синапсов), а также выраженной реакцией (гипертрофией, пролиферацией) всех нейроглиальных типов клеток. Через 1 сут после ПОСА появление нейронов как с обратимыми, так и с необратимыми изменениями сопровождалось увеличением в нейропиле слоя V СМК крыс относительной площади зон отека-набухания до 14,5 (10,6–16,4)%, контроль – 7,2 (6,9–7,5)%. Максимальное содержание деструктивно измененных нейронов (25%) выявлено в слое V СМК крыс через 1 сут после ишемии. Общая численная плотность нейронов слоя V СМК через 30 сут уменьшилась на 27,9% (Mann-Whitney U Test; p=0,0001). В зонах скопления поврежденных нейронов увеличивалось содержание астроцитов, микроглиоцитов и олигодендроцитов. Нейроглиальный индекс в контроле составлял 1,30, через 3 сут - 1,37, 7 сут - 1,50, 14 сут – 1,63 и 30 сут – 1,30. Максимальное увеличение численной плотности микроглиоцитов отмечено через 1 сут (Mann-Whitney U Test; p=0,001), олигодендроцитов – чрез 7 сут после ПОСА (Mann-Whitney U Test; p=0,02). По данным иммуногистохимического типирования p38, выявили два пика относительной площади терминалей – в остром периоде (1-е и 3-и сут) и через 30 сут. Эти количественные изменения происходили на фоне сначала увеличения (на 1-е и 3-и сут), а затем уменьшения степени гидратации нейропиля. Отрицательные статистически значимые сильные связи выявлены через 3 сут (R=-0,90) и 7 сут (R=-0,70) после ПОСА. Это можно объяснить гидропическими изменениями терминалей (деструкцией синапсов по светлому типу). Общая численная плотность терминалей нейропиля в сравнении с контролем (157500±20500 на 1 мм²) через 3 сут после ПОСА в слое V белых крыс уменьшалась до 102300±19400 (на 35,0%), а через 30 сут – частично восстанавливалась до 135000±27100 (24,4%).

Заключение. Таким образом, после ПОСА в слое V белых крыс на фоне сохранения значительной части пирамидных нейронов и компенсаторной реорганизации нейроглиальных взаимоотношений были выявлены деструктивные и компенсаторно-восстановительные изменения структур межнейронной коммуникации.

Ключевые слова: ишемия, нейроны, синапс, сенсомоторная кора, иммуногистохимия, морфометрия

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Макарьева Л.М., Коржук М.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Шоронова А.Ю., Авдеев Д.Б. Нейроглиальные взаимоотношения и структуры межнейронной коммуникации слоя V сенсомоторной коры белых крыс после перевязки общих сонных артерий // Журнал анатомии и гистопатологии. 2022. Т. 11, №2. С. 43–51. https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-2-43-51

[©]Макарьева Л.М., Коржук М.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Шоронова А.Ю., Авдеев Д.Б., 2022

ORIGINAL ARTICLES

Original article

Neuroglial relationships and structures of interneuronal communication of the white rat sensorimotor cortex layer v after the common carotid artery ligation

L. M. Makar'eva¹, M. S. Korzhuk^{1, 2}, V. A. Akulinin¹, S. S. Stepanov¹, A. Yu. Shoronova¹, D. B. Avdeev¹

¹Omsk State Medical University, Omsk, Russia

²S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

Abstract. The aim of research was to study changes in neurons, gliocytes and structures of the interneuronal communication system (dendrites, terminals) of the mature white rat sensorimotor cortex (SMC) layer V after the common carotid artery (CCA) bilateral ligation.

Material and methods. Acute/chronic incomplete cerebral ischemia was simulated in white Wistar rats by the CCA bilateral ligation. The brain was fixed by perfusion. A comparative histological, immunohistochemical and morphometric evaluation of the related structures in the norm (n=6), and in 1, 3, 7, 14 and 30 days after the common carotid artery bilateral ligation (n=30) was carried out. Nissl and hematoxylin-eosin stains, immunohistochemical reactions for NSE, MAP-2, p38, GFAP and IBA1 were used. The numerical density of pyramidal neurons, astrocytes, oligodendrocytes, microgliocytes and the relative area of p38-positive material (synapse terminals) were determined. Statistical hypotheses were tested by nonparametric methods using Statistica 8.0 program.

Results. CCA bilateral ligation led to the appearance of destructively altered dark, hypochromic, vacuolated neurons and shadow cells in layer V of the SMC. These changes were accompanied by a decreased overall numerical density of pyramidal neurons, hyperhydration of the neuropil (processes of dendrites, astrocytes, and synapses), and a pronounced reaction (hypertrophy, proliferation) of all neuroglial cell types. One day after the CCA bilateral ligation, the appearance of neurons with both reversible and irreversible changes was accompanied by an increase in the layer V relative area of edema-swelling zones in the neuropil of the rat SMC up to 14.5 (10.6– 16.4) %, in control – 7.2 (6.9–7.5) %. The maximum content of destructively altered neurons (25%) was found in the rat SMC layer V one day after ischemia. The total number density of neurons in layer V of the SMC decreased by 27.9% after 30 days (Mann-Whitney U Test; p=0.0001). In the areas of damaged neuron accumulation, the content of astrocytes, microgliocytes, and oligodendrocytes increased. The neuroglial index in the control group was 1.30; it was 1.37 in 3 days, it was 1.50 in 7 days, it was 1.63 in 14 days, and it was 1.30 in 30 days. The maximum increase in the number density of microgliocytes was noted after 1 day (Mann–Whitney U Test; p=0.001), oligodendrocytes - 7 days after CCA ligation (Mann-Whitney U Test; p=0.02). According to the data of immunohistochemical typing of p38, two peaks of the relative area of the terminals were revealed: in the acute period (days 1 and 3) and after 30 days. These quantitative changes were first associated with an increase (on the 1st and 3rd day) and then a decrease in the degree of the neuropil hydration. Negative statistically significant strong correlations were detected in 3 days (R=-0.90) and 7 days (R=-0.70) after CCA ligation. This can be explained by hydropic changes in the terminals (destruction of synapses according to the light type). The total numerical density of neuropil terminals decreased to 102300±19400 (by 35.0%) in 3 days after CCA ligation in layer V of white rats and partially recovered to 135000±27100 (24.4%) after 30 days, compared to the animals of the control (157500±20500 per 1 mm²).

Conclusion. Thus, the CCA ligation resulted in destructive and compensatory-restorative changes in the structures of interneuronal communication associated with preservation of a significant part of pyramidal neurons and compensatory reorganization of neuroglial relationships in layer V of white rats.

Key words: ischemia, neurons, synapse, sensorimotor cortex, immunohistochemistry, morphometry

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Makar'eva L.M., Korzhuk M.S., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Shoronova A.Yu., Avdeev D.B. Neuroglial relationships and structures of interneuronal communication of the white rat sensorimotor cortex layer v after the common carotid artery ligation. Journal of Anatomy and Histopathology. 2022. V. 11, Nº2. P. 43–51. https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-2-43-51

Введение

В настоящее время для идентификации нейронов, глиальных клеток и межнейронных коммуникаций широко применяются иммуногистохимические методы, которые направлены на выявление синтезируемых маркерных белков. К распространенным нейромаркерам относятся: NSE (нейрон-специфическая енолаза), MAP-2 (ассоциированный с микротрубочками белок), GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок астроцитов), IBA1 (кальций-связывающий белок, специфичный для микроглии), p38 (синаптофизин) [4].

Нейрон-специфическая енолаза является высокоспецифичным нейромаркером. Енолаза катализирует дегидратацию 2-фосфо-D-глицерата (PGA) до фосфоенолпирувата (PEP) в гликолитическом пути. Этот фермент необходим для анаэробного превращения глюкозы в метаболиты, пригодные для окисления. NSE в нейронах располагается в перикарионах и отростках и обнаруживается в нормальных условиях [9]. Интенсивность экспрессии этого фермента свидетельствует о разной метаболической активности, увеличение содержания NSE в нейронах наблюдалось при ишемическом повреждении головного мозга. Судить о функциональной активности представляется возможным по интенсивности окрашивания NSE-позитивного материала [5].

МАР-2 (белок, ассоциированный с микротрубочками цитоскелета) относится к основной группе белков цитоскелета нейронов и является распространенным белком в слоях II–VI коры головного мозга. Изменение иммунореактивности этого белка является маркером функциональной недостаточности при ишемии. МАР-2 является уязвимым белком в условиях ишемического повреждения нейронов [10].

В изучении синаптоархитектоники основную роль занимает исследование белка синаптофизина (рз8), являющегося белком мембран синаптических пузырьков нейронов, и, принимающего участие в регуляции и осуществлении синаптической передачи [4]. Имеются работы, которые посвящены иммуногистохимическому исследованию терминалей при помощи реакции на синаптофизин на модели острой 20-мин ишемии (окклюзии общих сонных артерий) [1, 3]. Однако реорганизация цитоархитектоники и межнейронных коммуникаций V слоя СМК в условиях субтотальной ишемии после необратимой двусторонней ПОСА освещена недостаточно полно и подлежит более детальному изучению. Целью настоящего исследования было иммуногистохимическое и морфометрическое изучение пирамидных нейронов, глии и синапсов слоя V СМК через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после необратимой двусторонней ПОСА.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрена этическим комитетом университета (протокол № 123 от 09 октября 2020 года). В качестве экспериментальных животных использовали белых крыс линии Wistar массой 250–300 г. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями Международного комитета по работе с лабораторными животными, поддержанными ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/ЕU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей».

Субтотальную ишемию головного мозга моделировали путем необратимой двусторонней ПОСА (2-сосудистая модель субтотальной ишемии, без гипотонии). Эксперимент проведен на самцах белых крыс линии Wistar. Материал для исследования забирали через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ПОСА (n=30). Контролем служили интактные крысы (n=6).

После премедикации сульфатом атропина (0,1 мг/кг, подкожно), животных наркотизировали введением Zoletil 100 (10 мг/кг, внутримышечно). Проверку глубины наркоза осуществляли по исчезновению реакции на болевой раздражитель (укол лапы) и угнетению роговичного рефлекса. Выведение животных из эксперимента проводилось под наркозом (Zoletil 100, 10 мг/кг, внутримышечно). Сосудистое русло мозга промывали введением 100–125 мл раствора 0,9% NaCl и Фрагмина (5000 единиц) в левый желудочек сердца и фиксировали перфузией 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4) через аорту под давлением 90–100 мм рт. ст. в течение 15 мин. Материал хранился в холодильнике при температуре +4°С. Через сутки полученный материал заключали с помощью автомата «STP 120» в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы толщиной 4 мкм готовили с помощью микротома HM 450 (Thermo) на уровне CMK: 1,2 – (-3,0) мм от Брегмы [11, 14].

Общую качественную оценку нервной ткани и определение численной плотности нейронов (учитывали только нейроны с видимым ядрышком) и глиальных клеток проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином и тионином по методу Ниссля. Идентификацию клеток проводили при гистохимической реакции на NSE (идентификация нейронов), GFAP (идентификация астроцитов и изучение цитоскелета), IBA1 (идентификация микроглиоцитов). Цитоскелет нейронов изучали при иммуногистохимической реакции на МАР-2; синаптические терминали – синаптофизин (р38). Иммуногистохимические реакции проводили на серийных фронтальных срезах, помещенных на маркированные предметные стекла. Использовали мышиные моноклональные антитела к GFAP – глиальному фибриллярному кислому белку астроцитов; кроличьи поликлональные антитела к NSE - нейрон специфической енолазе; мышиные моноклональные антитела к p38 - синаптофизину; к MAP-2 - белку, ассоциированному с микротрубочками цитоскелета. Для визуализации использовали набор реагентов на основе полимера NovoLink и пероксидазы NovoLink Polymer Detection System (Великобритания).

Препараты изготавливали в соответствии с инструкциями фирмы производителя реагентов, фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1.4×1.4 µm), изображение сохраняли в файлах с расширением tiff (2592×1944 пикселей), затем в Photoshop CC размерность увеличивали (до 3780×2835 пикселей/см, разрешение 600 пикселей/дюйм).

Для достижения максимальной контрастности и четкости изображения проводили коррекцию с помощью фильтра Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость) в Photoshop CC. Морфометрическое исследование проводили при помощи программы ImageJ 1.53.

Для выявления p38-позитивных терминалей и зон отека-набухания в нейропиле использовали фильтр Enhance Contrast (https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process) с последующей обработкой изображения в Threshold (селекция меток синаптофизина и очагов отека). Селекцию осуществляли для



Рис. 1. Астроциты (а), олигодендроциты (б), микроглиоциты (в) и нейроны (г) слоя V СМК крыс после необратимой двусторонней ПОСА через 1 сут (в), 3 сут (г), 7 сут (б), 14 сут (а). Стрелки – GFAP-позитивные клетки (а), IBA1-позитивные клетки (в), MAP-2-позитивные клетки (г); * – вакуолизированные нейроны. Окраска: по Нисслю (б), иммуногистохимическая реакция (а, в, г), докраска гематоксилином. Об. 40 (а), об. 100 (б, в, г); шкала – 50 мкм (а), 20 мкм (б, в, г).

каждой ROI (20×20 мкм) путем ручного управления (Over/Under). Далее строили гистограммы распределения пикселей по степени яркости, полученные результаты (List) переносили в Excel для дальнейшей обработки. С помощью генератора случайных чисел отбирали по 20 ROI на каждый срок.

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями: парным сравнением (Mann–Whitney U-test), множественным сравнением (ANOVA Kraskel– Wallis), парным корреляционным анализом (метод Спирмена), а также с использованием Multiple Regression с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft, USA). Количественные данные в исследовании представлены как медиана (Me – 50% квартиль, Q2), интерквартильный разброс (Q1–Q3 – 25–75% квартили), (Min–Max), процентная доля (%). Проблема множественного сравнения решалась путем использования ANOVA Kraskel–Wallis [2].

Результаты и их обсуждение

Результатом ишемического повреждения после ПОСА в слое V СМК крыс является наличие деструктивно измененных нейронов. Эти изменения проявились усилением (ги-

перхромные нейроны) и ослаблением (гипохромные нейроны, клетки-тени) тинкториальных свойств, вакуолизацией цитоплазмы пирамидных нейронов, хроматолизом, сморщиванием перикарионов (пикноморфные нейроны) и гомогенизацией цитоплазмы. С 1-х сут появлялись нейроны с выраженными признаками отека-набухания перикариона и перицеллюлярного отека. Эти изменения сохранялись до 30-х сут после ПОСА. Появление обратимо и необратимо измененных нейронов сопровождалось уменьшением общей численной плотности пирамидных нейронов в слое V СМК на всем исследуемом сроке без восстановления до контрольных значений. Дефицит общей численной плотности нейронов к 30-м сут составил 27,9% (рис. 3а). В острый и подострый периоды (с 1-х по 14-е сут) происходили изменения нейроглиальных взаимоотношений, проявляющиеся пролиферацией и гипертрофией глиальных клеток. Пик численной плотности астроцитов наблюдался через 14 сут, олигодендроцитов - через 7 сут, микроглиоцитов – через 1 сут после ПОСА. При иммуногистохимической реакции на GFAP выявлена гипертрофия отростков астроцитов (рис. 1а). В остром периоде ишемии (1-е и 3-и сут) происходила активация микроглиоцитов, эти изменения обнаруживались при иммуногистохимическом типировании на IBA1. Активация микроглиоцитов необходима для санации нервной ткани при ишемическом повреждении головного мозга [8]. Отмечался рост нейроглиального индекса от 1,39 (1-е сут) до 1,63 (14-е сут). Через 30 сут этот показатель восстанавливался до 1,3. После ПОСА плотность МАР-2-позитивного материала подвергалась изменениям: происходила конденсация белка цитоскелета в гиперхромных сморщенных нейронах. Изменениям цитоскелета также были подвержены нейроны с дегидратацией (рис. 1г).

При иммуногистохимическом исследовании пирамидных нейронов СМК крыс на фронтальных срезах обнаружены изменения в плотности распределения нейромаркера NSE. Наблюдалась разница в интенсивности окрашивания NSE-позитивного материала в разные исследуемые сроки (1-е–30-е сут) и в пределах одного срока (рис. 2). Эти проявления могут свидетельствовать о разной метаболической активности в результате ишемического очагового повреждения нейронов. Накопление белка отмечалось как в обратимо, так и в необратимо измененных нейронах.

По результатам морфометрического исследования происходило статистически значимое изменение количества NSEпозитивных нейронов на всем протяжении исследуемого срока. Наибольшее количество деструктивно измененных нейронов, по данным NSE, выявлено в остром периоде ишемии (через 1 и 3 сут) – 25 и 20% соответственно от общей численной плотности нейронов



Рис. 3 Общая численная плотность нейронов (ОЧПН) и доля (%) NSE-позитивных нейронов в слое V СМК в контрольной группе и через 1, 3, 7, 14, 30 сут после ПОСА. * – сравнение с контролем, ^ – сравнение между сроками (Mann–Whitney U test). Различия статистически значимы при p<0,05. Материал предоставлен как медиана (Q2) и 25–75% квартили (Q1–Q3). Различия между всеми сроками после ПОСА статистически значимы по результатам ANOVA Kraskel–Wallis (K–W).



Рис. 2. Слой V СМК крыс при реакции на специфический нейромаркер (NSE): высокая плотность типированного белка в пирамидных нейронах (белые стрелки), низкая плотность (черные стрелки) через 1 сут (а), 3 сут (б), 7 сут (в) и 30 сут (г) после ПОСА. Окраска: иммуногистохимическая реакция, докраска гематоксилином. Об. 100; шкала – 20 мкм.

(рис. 5а, б). Эти изменения происходили на фоне максимального содержания микроглиоцитов и минимальной численной плотности астроцитов. Числовые значения микроглиоцитов через 1 сут увеличились на 14,3% по сравнению с контрольными цифрами. В остром периоде (1-е и 3-и сут) отмечалась активация микроглиоцитов при реакции на кальций-связывающий белок, специфичный для микроглии (рис. 1в). Наименьшее количество NSE-позитивных нейронов отмечалось через 30 сут после ПОСА, доля деструктивных нейронов в данном сроке 18% от общей численной плотности нейронов (рис. за, б). Эти изменения сопровождались пиком снижения численной плотности олигодендроцитов и микроглиоцитов - на 31,5 и 25,7% соответственно.

Статистически значимое увеличение экспрессии NSE на протяжении всего срока исследования и отсутствие восстановления до контрольных значений может свидетельствовать о высокой функциональной активности нейронов на всем протяжении ишемии. Эти изменения могут носить компенсаторный характер. Изменение метаболической активности нейронов могут привести к структурнофункциональной реорганизации коры головного мозга [5, 13]. Однако, через 30 сут после ПОСА доля NSE-позитивных структур в исследуемом материале достигала минимальных значений. Эти изменения свидетельствовали о том, что в отдаленном периоде восстановления нейронов не происходило, отмечался рост количества нейронов с необратимыми (деструктивными) изменениями.

По данным иммуногистохимического типирования p38, синаптические терминали в слое V СМК крыс распределялись в нейропиле, на перикарионах и дендритах пирамидных нейронов. При этом визуально отмечалась различная сохранность и плотность распределения этого белка (рис. 4а-е).

С помощью анализа гистограмм распределения пикселей изображений нейропиля (зоны интересов 400 мкм²) удалось



Рис. 4. Нейроны (стрелки) и нейропиль (*) слоя V СМК крыс при реакции на специфический нейрональный белок синаптических терминалей (синаптофизин): различная сохранность и плотность распределения типированного белка. а – контроль, б – через 1 сут, в – 3 сут, г – 7 сут, д – 14 сут, е – 30 сут после ПОСА. Окраска: иммуногистохимическая реакция, докраска гематоксилином. Об. 100; шкала – 20 мкм.



Рис. 5. Поэтапное получение количественных данных (относительная площадь терминалей и мелких очагов отека, %) для нейропиля слоя V СМК крыс с помощью программы ImageJ 1.53: а – исходные ROI (400 мкм², RGB, фильтр Enhance Contrast), б – после обработки изображения в Threshold (селекция меток синаптофизина и очагов отека), в – гистограмма изображения ROI с указанием количества и яркости соответствующих пикселей. Красные стрелки – терминали на разных этапах анализа. Окраска: иммуногистохимическая реакция на синаптофизин, докраска гематоксилином. Об. 100; шкала – 5,0 мкм.

выявить относительную площадь терминалей и их общую численную плотность, а также относительную площадь зон отека–набухания нейропиля (рис. 5).

Установлены статистически значимые изменения этих морфометрических переменных в сравнении с контролем и в динамике наблюдения (1-е – 30-е сут). Было отмечено два пика увеличения относительной площади терминалей – в остром периоде (1-е и 3-и сут) и через 30 сут.

Эти количественные изменения происходили на фоне начального увеличения (на 1-е и 3-и сут) и последующего уменьшения степени гидратации нейропиля (рис. 6). При сравнении всех сроков исследования (подгрупп контроль, 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 30-е сут) выявлена слабая положительная корреляционная связь (R=0,40, Спирмен; p<0,05) между этими переменными. При сравнении по отдельным срокам отрицательные статистически значимые сильные связи выявлены через 3 сут (R=-0,90) и 7 сут (R=-0,70). То есть, увеличение доли площади отека-набухания в остром периоде сопровождалось уменьшением доли р38-позитивных частиц (терминалей). Это можно объяснить результатом гидропических изменений терминалей (светлым типом деструкции синапсов). При этом общая численная плотность терминалей нейропиля, в сравнении с контролем (157500±20500 на 1 мм²), в остром периоде (через 3 сут) после ПОСА уменьшалась до 102300±19400 на 1 мм², а в отдаленном периоде – увеличивалась до 135000±27100 на 1 мм².

По данным регрессионного анализа, в остром периоде (через 3 сут) увеличение площади отека на 1% приводило к уменьшению площади терминалей на 0,56%. В остальных подгруппах корректных влияний не выявили. Коэффициент детерминации модели составил 66%. Это значит, что вариация площади терминалей умеренно объясняется изменением площади отека-набухания. Для проверки условий независимости наблюдений друг от друга использовали критерий Durbin-Watson. Допустимые значения для данного критерия находятся в диапазоне от 1 до 3. В нашем исследовании значение критерия соответствовало 1,51, что свидетельствует о корректности результатов.

Следовательно, можно заключить, что в остром (через 3 сут) и подостром (через 7 сут) периодах деструкция синаптических терминалей была связана с их гипергидратационными изменениями. В другие периоды подобных связей не выявлено. Вполне вероятно, что через 1, 14 и 30 сут большее значение в



Рис. 6. Относительная площадь р38-позитивных синаптических терминалей и мелких очагов отека-набухания нейропиля слоя V СМК крыс в норме и после ПОСА. *^ – различия в сравнении с контролем (* – терминали, ^ – отек-набухание); 3–7 и 14–30 – в сравнении с предыдущим сроком (Mann-Whitney U test); т–о – между площадью терминалей и очагов отека-набухания (Wilcoxon test) статистически значимы при p<0,05. Различия между всеми сроками после ПОСА статистически значимы по результатам однофакторного множественного сравнения с помощью ANOVA Kraskel–Wallis (K–W).

формировании мелких зон отека-набухания в нейропиле имели отростки дендритов и астроцитов.

Таким образом, после ПОСА в слое V СМК крыс на фоне сохранения значительной части пирамидных нейронов и компенсаторной реорганизации нейроглиальных взаимоотношений были выявлены закономерные изменения структур межнейронной коммуникации, в частности - численной плотности и относительной площади срезов терминалей нейропиля. ПОСА приводило к статистически значимому уменьшению общей численной плотности терминалей, но также к увеличеотносительной нию плошали р38-позитивного материала через 1, 3, 7, 14 и зо сут. То есть, терминалей становилось меньше, но они увеличивались в размерах, либо объединялись в конгломераты. В остром (3-и сут) и подостром (7-е сут) периодах установлено наличие статистически значимых сильных отрицательных связей между площадью р38-позитивного материала и выраженностью отека-набухания. По меньшей мере 56% площади появившихся зон отеканабухания можно объяснить переходом нормальных терминалей в терминали, измененные по светлому типу деструкции, с агглютинацией и распадом синаптических пузырьков. Остальные 44% площади отека-набухания в нейропиле в остром периоде после ПОСА, вероятно, связаны с гипергидратацией шипиков, мелких отростков дендритов и астроцитов.

Ранее подобные изменения были выявлены нами при электронномикроскопическом исследовании [6]. Однако,

сравнение результатов иммуногистохимического и электронно-микроскопического исследования показало, что необходимо учитывать более высокую разрешающую способность последнего. С помощь электронной микроскопии выявлялись все возможные варианты синапсов, а при иммунной реакции терминали диаметром <0,30 мкм было трудно верифицировать как отдельные структуры. иммуногистохимический Флюоресцентный метод позволял выявлять даже терминали с диаметром около 0,20 мкм [7]. Тем не менее, в нервной ткани слоя V СМК при оценке общей площади терминалей нами получены примерно одинаковые величины. По нашим данным, р38-позитивные структуры нейропиля в контроле у человека (флюоресцентный метод) занимали 6,4 (5,5-8,6)%, а у крысы (светооптический метод) - 7,9 (7,4-8,2)%.

Полученные нами данные соответствуют представлениям о реакции нейронов, глии и синапсов на острую и хроническую ишемию, сформировавшимся в последнее время, и хорошо обоснованным в экспериментальных исследованиях и обзорах [12]. Иммуногистохимическая детализация структурных изменений в слое V СМК после ПОСА может быть использована для дальнейшего изучения закономерностей реакции нервной ткани на ишемическое воздействие.

Выводы

- После перевязки общих сонных артерий в слое V сенсомоторной коры крыс уменьшалась общая численная плотность нейронов и синаптических терминалей, но увеличивались содержание глиальных клеток и относительная площадь терминалей.
- Нейроглиальный индекс увеличивался через 7 сут после перевязки общих сонных артерий в слое V сенсомоторной коры крыс до 1,50 и через 14 сут – до 1,63 (контроль – 1,30). Максимальное увеличение численной плотности микроглиоцитов отмечено через 1 сут, а олигодендроцитов – через 7 сут после перевязки сосудов.
- 3. В остром (через 3 сут) и подостром (через 7 сут) периодах в слое V сенсомоторной коры крыс деструкция синаптических терминалей была связана с их гипергидратационными изменениями: установлено наличие статистически значимых сильных отрицательных связей между площадью р38-позитивного материала и выраженностью отека-набухания. В другие периоды подобных связей не выявлено.
- 4. Общая численная плотность терминалей нейропиля, в сравнении с контролем, в остром периоде после перевязки общих сонных артерий в слое V сенсомоторной

коры крыс уменьшалась на 35,0%, а в отдаленном периоде частично восстанавливалась (на 24,4%) при дефиците (27,9%) общей численной плотности нейронов.

Список источников / References

- Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б., 1. Степанов А.С., Разумовский В.С., Артюхов А.В., и др. Особенности изменений неокортекса, архикортекса и миндалевидного тела белых крыс после острой ишемии. Журнал анатомии и гистопатологии. 2018;7(2):9-17 [Akulinin VA, Stepanov SS, Avdeev DB, Stepanov AS, Razumovsky VS, Artyukhov AV, et al. Features of the White Rats' Neocortex. Archicortex and Amygdala Changes After Acute Ischemia. Journal of Anatomy and Histopathology. 2018 Jul 3;7(2):9-17] (in Russian). EDN: XRLCMH. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-2-9-17
- Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере. 2-ое изд. СПб.: Питер; 2003 [Borovikov V. Statistica. Iskusstvo analiza dannykh na komp'yutere. 2-oe izd. Saint-Petersburg: Piter; 2003] (in Russian).
- Горбунова А.В., Кошман И.П., Шоронова 3. А.Ю., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов С. С., и др. Сравнительная характеристика структурно-функциональных изменения поля САз гиппокампа после острой ишемии и травмы головного мозга белых крыс. Журнал анатомии и гистопатологии. 2020; 9(4): [Gorbunova AV, Koshman 19-30. IP. Shoronova AYu, Avdeev DB, Akulinin VA, Stepanov SS, et al. Comparative Characteristics of Structural and Functional Changes in the Hippocampal CA3 Region in White Rats after Acute Ischemia and Brain Injury. Journal of Anatomy and Histopathology. 2021 Jan 18;9(4):19-30] (in Russian). EDN: TRSVXM. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-4-19-30
- Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В., Безнин Г.В., Сухорукова Е.Г. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010;5(3):57–63 [Korzhevskii DE, Petrova ES, Kirik OV, Beznin GV, Suhorukova EG. Neural Markers in Investigation of Stem Cells Differentiation. Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya. 2010;5(3):57–63] (in Russian). EDN: MUIDMT
- Сергеева С.П., Савин А.А., Шишкина Л.В., Виноградов Е.В. Головной мозг после ишемического инсульта: клиникогистологическое исследование. Журнал неврологии и психиатрии. 2017;117 (3–2):66–70. [Sergeeva SP, Savin AA, Shishkina LV, Vinogradov EV. The brain after ischemic stroke: a clinical/histological study. Zhurnal nevrologii

Информация об авторах

Макарьева Любовь Михайловна, lyuba.mamontova.07@gmail.com; https://orcid.org/0000-0002-1133-6541 i psikhiatrii im SS Korsakova. 2017;117(3-2):66–70] (in Russian). EDN: YTSZSF. doi: 10.17116/jnevro20171173266-70

- 6. Степанов А.С. Сравнительная характеристика синаптоархитектоники неокортекса, гиппокампа и миндалевидного комплекса белых крыс в норме и после острой ишемии. анатомии гистопатологии. Журнал И 2017;6(4):47-54. [Stepanov AS. Comparative characteristics of the white rats neocortex, hippocampus and amygdale complex synaptoarchitectonics in norm and after acute ischemia. Journal of Anatomy and Histopathology. 2017 Dec 12;6(4):47-54] (in Russian). EDN: ZXWOWN. doi: 10.18499/2225-7357-2017-6-4-47-54
- Степанов А.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Мыцик А.В. Иммуногистохимическая характеристика структур коммуникации нейронов коры головного мозга человека в норме и после реперфузии. Журнал анатомии и гистопатологии. 2016;5(4):61–8. [Stepanov AS, Akulinin VA, Stepanov SS, Mytsik AV. Immunohistochemical Characterization of the Neurons Communication Structures in the Human Brain Cortex in Normal Conditions and After Reperfusion. Journal of Anatomy and Histopathology. 2016;5(4):61–8] (in Russian). doi: 10.18499/2225-7357-2016-5-4-61-68
- Imai Y, Kohsaka S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: Role of Iba1. Glia. 2002 Oct 14;40(2):164–74. doi: 10.1002/glia.10149
- 9. Isgrò MA, Bottoni P, Scatena R. Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2015;867:125–43. doi: 10.1007/978-94-017-7215-0_9
- Kühn J, Meissner C, Oehmichen M. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) – a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia. Acta Neuropathologica. 2005 Nov 23;110(6):579–86. doi: 10.1007/s00401-005-1090-9
- 11. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2005.
- Shin TH, Lee DY, Basith S, Manavalan B, Paik MJ, Rybinnik I, et al. Metabolome Changes in Cerebral Ischemia. Cells. 2020 Jul 7;9(7):1630. doi: 10.3390/cells9071630
- Yardimoğlu M, İlbay G, Dalçik C, Dalçik H, Sahi n D, Ateş N. Immunocytochemistry of Neuron Specific Enolase (NSE) in the Rat Brain After Single and Repeated Epileptic Seizures. International Journal of Neuroscience. 2008 Jan;118(7):981–93. doi: 10.1080/00207450701769232
- 14. Zilles KJ. The cortex of the rat : a stereotaxic atlas. Berlin ; New York: Springer-Verlag; 1985.

Information about the authors Lyubov' M Makar'eva, lyuba.mamontova.07@gmail.com; https://orcid.org/0000-0002-1133-6541

Коржук Михаил Сергеевич – д-р. мед. наук, профессор; gensurg@mail.ru https://orcid.org/0000-0002-4579-2027 [™] Акулинин Виктор Александрович – д-р. мед. наук, про- фессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриоло- гии Омского государственного медицинского университе- та. Ул. Ленина, 12, Омск, 644099; v_akulinin@outlook.com; https://orcid.org/0000-0001-6097-7970 Степанов Сергей Степанович – д-р мед. наук, serg_stepanov@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-0741-2227	Mikhail S Korzhuk – Doct. Med. Sci., Prof.; gensurg@mail.ru https://orcid.org/0000-0002-4579-2027 ^{CV} Viktor A Akulinin – Doct. Med. Sci., Prof., head of histology, cytology and embryology department of Omsk State Medical University. Ul. Lenina, 12, Omsk, 644099; v_akulinin@outlook.com; https://orcid.org/0000-0001-6097-7970 Sergei S Stepanov – Doct. Med. Sci., serg_stepanov@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-0741-3337
IIIps.//огсіd.org/0000-0003-0/41-333/ Шоронова Анастасия Юрьевна, nastasya1994@mail.ru https://orcid.org/0000-0002-0936-3137 Авдеев Дмитрий Борисович – канд. ветеринар. наук, до- цент; avdeev86@inbox.ru https://orcid.org/0000-0003-4976-7539	Anastasiya Yu Shoronova, nastasya1994@mail.ru https://orcid.org/0000-0002-0936-3137 Dmitrii B Avdeev – Cand. Veterinar. Sci., Assoc. Prof.; avdeev86@inbox.ru https://orcid.org/0000-0003-4976-7539

Статья поступила в редакцию 30.04.2022; одобрена после рецензирования 23.05.2022; принята к публикации 4.06.2022. The article was submitted 30.04.2022; approved after reviewing 23.05.2022; accepted for publication 4.06.2022.