

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 611.9+616–091.8

doi:10.18499/2225-7357-2022-11-3-65-74

1.5.22 – клеточная биология

3.3.2 – патологическая анатомия



Сопоставление иммуногистохимического и ультраструктурного изучения реакции аксональных терминалей сенсомоторной коры белых крыс на перевязку общих сонных артерий

С. С. Степанов¹, Л. М. Макарьева¹, В. А. Акулинин^{1✉}, М. С. Коржук^{1, 2},
А. Ю. Шоронова¹, Д. Б. Авдеев¹, И. Г. Цускман¹, А. В. Слободская¹

¹Омский государственный медицинский университет, Омск, Россия

²Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Цель исследования – изучить структурно-функциональные изменения аксональных терминалей в слоях I, III и V сенсомоторной коры (СМК) головного мозга крыс Wistar после двусторонней перевязки общих сонных артерий (ПОСА) с помощью иммуногистохимического и электронномикроскопического методов.

Материал и методы. Неполную ишемию головного мозга моделировали путем двусторонней перевязки общих сонных артерий (ПОСА – 2-сосудистая модель глобальной ишемии без гипотонии) на белых крысах линии Wistar (n=36). СМК изучали в контроле (интактные крысы, n=6), через 1, 3, 7, 14 и 30 сут (n=30) после ПОСА. Использовали окраски по Нисслю, гематоксилином и эозином, иммуногистохимические реакции на p38 и метод электронной микроскопии. Определяли общую численную плотность и относительную площадь аксональных терминалей. Проверку статистических гипотез проводили с помощью непараметрических методов для парного и множественного сравнения в программе Statistica 8.0.

Результаты. После ПОСА в СМК мозга крыс увеличивалось содержание дегенеративно измененных нейронов. Изменения нейронов СМК сопровождалась гипергидратацией нейропиля и реактивным астроглиозом. Общая численная плотность терминалей во всех слоях СМК статистически значимо уменьшалась уже через 1 сут (в слое I – на 28,6%, III – 46,9%, V – 46,4%) и сохранялась примерно на этом уровне в течение всего наблюдения. Относительная площадь синаптических терминалей различалась в сравниваемых слоях СМК. В слоях I и III СМК сначала (1-е и 3-и сут) значения этого показателя снижались, а затем (7-, 14- и 30-е сут) – увеличивались. В слое V СМК активация экспрессии данного белка происходила уже в остром периоде (1-е и 3-и сут), снижалась через 7 и 14 сут, вновь усиливалась через 30 сут. При ультраструктурном исследовании выявлялось больше мелких терминальных ветвей аксонов. Однако общая тенденция изменений количества терминалей была аналогичной.

Заключение. После двусторонней ПОСА в слоях I, III и V СМК крыс были выявлены деструктивные и компенсаторно-восстановительные изменения аксональных терминалей. Реорганизация межнейронных взаимоотношений происходила на фоне выраженных проявлений гипергидратации нейропиля. Максимальное разрушение синаптических терминалей отмечалось в слое III СМК, а их адаптивные изменения – в слое V. Результаты иммуногистохимического и ультраструктурного исследований сопоставимы и дополняют друг друга. Все это, вероятно, можно рассматривать как структурную основу изменения интегративно-пусковой деятельности головного мозга после ПОСА.

Ключевые слова: ишемия, нейроны, синапсы, сенсомоторная кора, иммуногистохимия, ультраструктура, морфометрия

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Степанов С.С., Макарьева Л.М., Акулинин В.А., Коржук М.С., Шоронова А.Ю., Авдеев Д.Б., Цускман И.Г., Слободская А.В. Сопоставление иммуногистохимического и ультраструктурного изучения реакции аксональных терминалей сенсомоторной коры белых крыс на перевязку общих сонных артерий // Журнал анатомии и гистопатологии. 2022. Т. 11, №3. С. 65–74. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-3-65-74>

ORIGINAL ARTICLES

Original article

Comparison of the immunohistochemical and ultrastructural studies of the white rats sensorimotor cortex synaptic terminals reaction to common carotid arteries ligation

S. S. Stepanov¹, L. M. Makar'eva¹, V. A. Akulinin^{1✉}, M. S. Korzhuk^{1, 2}, A. Yu. Shoronova¹, D. B. Avdeev¹,
I. G. Tsuskman¹, A. V. Slobodskaya¹

¹Omsk State Medical University, Omsk, Russia

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

Abstract. The aim of the research was to study the structural and functional changes in axonal terminals in layers I, III, and V of the sensorimotor cortex (SMC) of the brain of Wistar rats after the common carotid artery (CCA) bilateral ligation using immunohistochemical and apparatus-microscopic methods.

Material and methods. Incomplete cerebral ischemia was modeled by bilateral ligation of the common carotid arteries (CCA - 2-vessel model of global ischemia without hypotension) in white Wistar rats (n=36). SMC was studied in the control (intact rats, n=6), 1, 3, 7, 14 and 30 days (n=30) after POCA. Nissl, hematoxylin-eosin, immunohistochemical reactions for p38, and electron microscopy were used. The total number density and relative area of axonal terminals were determined. Statistical hypotheses were tested using nonparametric methods for pairwise and multiple comparisons using the Statistica 8.0 program.

Results. After CCA bilateral ligation, the content of degeneratively altered neurons in the rat brain SMC increased. Changes in the SMC neurons were accompanied by neuropil hyperhydration and reactive astrogliosis. The total number density of terminals in all SMC layers decreased statistically significantly after 1 day (by 28.6% in layer I, 46.9% in layer III, and 46.4% in layer V) and remained approximately at this level throughout the entire observation period. The relative area of synaptic terminals differed in the compared SMC layers. In layers I and III of the SMC, the values of this indicator first (days 1 and 3) decreased, and then (days 7, 14, and 30) they increased. In layer V of the SMC, activation of the expression of this protein occurred already in the acute period (days 1 and 3), decreased after 7 and 14 days, and increased again after 30 days. Ultrastructural examination revealed more small terminal axonal branches. However, the general trend of changes in the number of terminals was similar.

Conclusion. After CCA bilateral ligation, destructive and compensatory-restorative changes in axonal terminals were revealed in layers I, III, and V of the rat MMC. The reorganization of interneuronal relationships occurred against the background of pronounced manifestations of neuropil hyperhydration. The maximum destruction of synaptic terminals was noted in layer III of the SMC, and their adaptive changes were observed in layer V. The results of immunohistochemical and ultrastructural studies are comparable and complement each other. All this can probably be considered as a structural basis for changes in the integrative-starting activity of the brain after CCA bilateral ligation.

Key words: ischemia, neurons, synapses, sensorimotor cortex, immunohistochemistry, ultrastructure, morphometry

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

For citation: Stepanov S.S., Makar'eva L.M., Akulinin V.A., Korzhuk M.S., Shoronova A.Yu., Avdeev D.B., Tsuskman I.G., Slobodskaya A.V. Comparison of the immunohistochemical and ultrastructural studies of the white rats sensorimotor cortex synaptic terminals reaction to common carotid arteries ligation. Journal of Anatomy and Histopathology. 2022. V. 11, №3. P. 65–74. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-3-65-74>

Введение

После ишемии головного мозга отмечаются проявления двигательной дисфункции, ухудшения памяти и когнитивных способностей, что приводит к значительному ухудшению качества жизни и социальной адаптации. Нейропатологические изменения имеют установленную морфологическую, функциональную и биохимическую основу. Нарушается нормальное функционирование нейронов (секреция нейротрофических факторов, межполушарные связи, синаптическая активность), а, следовательно, и нейронной сети головного мозга в целом [27].

В настоящее время не существует эффективных терапевтических методов восстановления неврологических функций у таких пациентов. Это связано с тем, что ЦНС взрослого человека обладает ограниченной способностью к истинной структурной регенерации после травмы. Несмотря на то, что вероятные молекулярные и клеточные механизмы, связанные с регенерацией нейронных сетей, хорошо изучены, практическая часть проблемы до сих пор остается не решенной. Вероятно, это требует дальнейших усилий по всем направлениям, включая и нейроморфологическое. В этой связи перспективным является изучение аксонов и их терминалей [25].

Терминаль является концевым разветвлением аксона (нейрита), на срезах структурно представлена одним или множеством пре-

синаптических зон, содержащих синаптические пузырьки (СП). В совокупности отростки дендритов (включая шипики), астроцитов и терминали формируют сложное волокнистое пространственное образование – нейропил, содержащий основную массу синаптических контактов. В сенсомоторной коре нейропилем представлен практически весь его молекулярный (I) слой – сплетения апикальных дендритов и аксонов нижележащих пирамидных нейронов [4]. Терминаль каждого аксона является конечной зоной реализации динамики аксональных структур – распространение и накопление нейромедиатора в определенном пространстве. Основопологающим процессом при этом является аксональный транспорт, который снабжает аксон и концевую часть аксона материалами, необходимыми для поддержания структуры и функции синапсов [9, 13, 16]. Поэтому столь актуальным является изучение синапсов, в частности, а также точное и детальное определение количества и структурно-функционального состояния СП в аксональных терминалях в норме и после ишемического воздействия [5, 6, 11].

Основным способом точного количественного анализа терминалей является электронная микроскопия [4, 11]. Однако, методы электронной микроскопии для морфометрии синапсов на больших объемах материала являются дорогостоящими, трудоемкими и технически сложными [10, 19, 21, 22, 23]. Поэтому наиболее приемлемым вариантом

рутинного количественного изучения изменений синаптических популяций, как у животных, так и у человека, является использование различных методов измерения синаптофизин-иммунореактивных терминалей (количество, площадь, интенсивность окраски, форма).

Синаптофизин (Synaptophysin), также известный как основной синаптический везикулярный протеин p38, – гликопротеин, имеющий четыре трансмембранных домена массой 38 кДа, локализуется на поверхности синаптических пузырьков, где связан с синаптобrevином. Белок выявлен практически во всех нейронах головного и спинного мозга, а его локализация в синаптических терминалях позволила использовать иммуногистохимическую реакцию на p38 для количественной оценки синапсов. В настоящее время стереология p38-иммунореактивных везикул является наиболее полезным методом оценки числа синапсов в определенных областях мозга. Разработаны протоколы иммуногистохимического изучения синапсов с помощью антител к разным структурам синапса (пре- и постсинаптической зонам). Подобные методы широко применяются при изучении закономерностей старения и развития различных неврологических расстройств головного мозга. Они характеризуются высокой избирательностью выявления синапсов в нервной ткани и позволяют автоматизировать процесс морфометрии этих структур [10, 11, 17]. Для получения первичных данных используются специальные плагины, элементы машинного обучения [8, 15, 21, 26].

С помощью иммуногистохимического типирования p38 была выявлена реакция синапсов на окклюзию общих сонных артерий [6, 7]. Аналогичных работ при моделировании ПОСА не проводилось.

Таким образом, иммуногистохимическая стереология является наиболее полезным методом оценки количества синапсов в больших объемах материала. Однако, анализ литературы показал, что целесообразно провести дополнительное исследование и сопоставить результаты иммуногистохимического и ультраструктурного изучения реакции аксональных терминалей сенсомоторной коры белых крыс на ПОСА для более полной характеристики количественных изменений.

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 лабо-

раторными животными, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей».

Эксперимент проведен на половозрелых самцах крыс линии Wistar (n=36). На фоне премедикации (сульфатом атропина 0,1 мг/кг, подкожно), животным вводили Zoletil 100 (10 мг/кг, внутримышечно). Неполную глобальную ишемию головного мозга моделировали путем необратимой двусторонней ПОСА (2-сосудистая модель субтотальной ишемии, без гипотонии). Контролем служили интактные крысы (n=6). Вывод животных из эксперимента проводили через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ПОСА (n=30) под наркозом (Zoletil 100). 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. Мозг извлекали и хранили в холодильнике при температуре +4°C. Через сутки полученный материал заключали с помощью автомата «STP 120» в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы толщиной 4 мкм готовили с помощью микротомы HM 450 (Thermo) на уровне СМК: 1,2 – (-3,0) мм от Брегмы [24].

Общую качественную оценку нервной ткани проводили на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, а также тионином по методу Ниссля. Синаптические терминали изучали с помощью иммуногистохимической реакции на синаптофизин (p38) и электронной микроскопии. Использовали мышинные моноклональные антитела, клон 27G12, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd/PA0299, Великобритания). После реакции с первичными антителами срезы инкубировали с соответствующими вторичными антителами, хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрашивали гематоксилином, заключали в полистирол. Для визуализации использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Препараты приготовлены в соответствии с инструкциями фирмы производителя реагентов.

Для электронной микроскопии мозг контрастировали в течение 1–2 ч в 1% незабуференном растворе четырехоксида осмия, промывали, обезвоживали и заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие (70–100 нм) срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Использовали ультрамикротом LKB-8800 (Швеция) и микроскоп Hitachi-600H (Япония).

Светооптическое исследование проводили на микроскопе Leica DM 1000 (камера

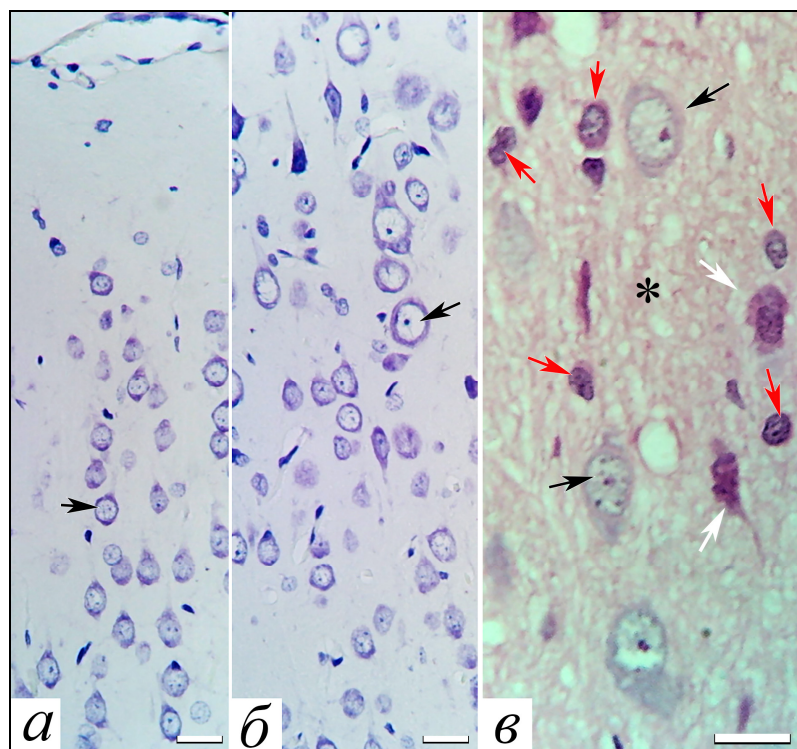


Рис. 1. Пирамидные нейроны слоя II–III (а) и слоя V (б–в) СМК в контроле (а, б) и через 3 сут после ПОСА. Примечание: в контроле преобладают нормохромные нейроны (черные стрелки), нейропилль (*) без признаков отека-набухания, после ПОСА появляются пикноморфные нейроны (белые стрелки), отек-набухание нейропиля, много глиоцитов (красные стрелки). Окраска по Нисслю (а, б) и гематоксилин–эозином (в), об. 40 (а, б) и 100 (в), шкала – 25 мкм.

GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size $1.4 \times 1.4 \mu\text{m}$), 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 использовали фильтр Camera Raw (контрастность, баланс белого, четкость) в Photoshop CC. Морфометрическое исследование проводили с помощью программы ImageJ 1.53.

Определение относительной площади р38-позитивных терминалей в нейропиле осуществляли с применением фильтра Enhance Contrast (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process>) с последующей обработкой изображения в Threshold (селекция меток синаптофизина и очагов отека) для каждой ROI ($20 \times 20 \mu\text{m}$) путем ручного управления (Over/Under). Далее строили гистограммы распределения пикселей по степени яркости, полученные результаты (List) переносили в Excel. Для оценки общей численной плотности синаптических терминалей (пресинаптические зоны) использовали выявление пиков яркости изображения с помощью фильтров "Enhance Contrast", "Subtract Background", "Find Maxima" с различием яркости 30 и плагин FindFoci. На каждый срок с помощью генератора случайных чисел отбирали по 20 зон интереса (ROI).

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями: парное сравнение (Mann-Whitney U-test), множественное сравнение (ANOVA Kraskel-

Wallis 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.

Результаты и их обсуждение

В СМК животных контрольной группы преобладали типичные нормохромные нейроны, признаков отека-набухания нейропиля не выявлено (рис. 1а, б). В ответ на ПОСА появлялись обратимые и необратимые дегенеративные изменения нейронов и выраженные проявления отека-набухания. Нейропилль за счет перераспределения воды приобретал своеобразное пористое строение (рис. 1в). Патологические изменения варьировали по степени выраженности, но во всех слоях СМК сохранялись на протяжении всего периода наблюдения. Подробно гистологическое описание этого представлено нами ранее [2].

Также после ПОСА происходили выраженные изменения в популяциях глиальных клеток. Ранее нами выявлены особенности этих изменений с помощью иммуногистохимического (GFAP, IBA1) и морфометрического исследований [3]. Нейроглиальный индекс увеличивался до 1,63 (контроль – 1,30). Отмечены проявления реактивного глиоза, гипертрофии и усложнения пространственной организации отростков астроцитов. Максимальное увеличение численной плотности микроглиоцитов отмечено через 1 сут, а олигодендроцитов – через 7 сут после ПОСА.

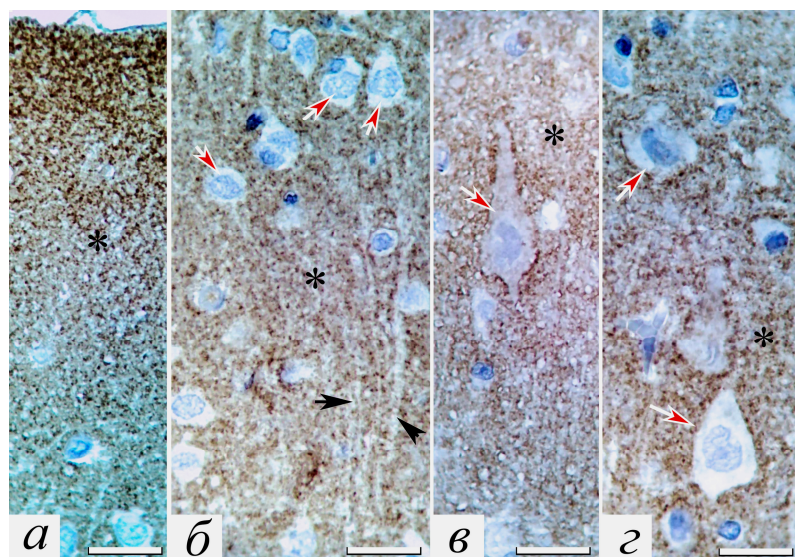


Рис. 2. Нейропилъ (*) и нейроны (красные стрелки) при реакции на синаптофизин в слое I (а), III (б) и V (в, г) СМК через 1 сут после ПОСА: различия структуры нейропиля, пространственного распределения и плотности иммунных меток (коричневые гранулы) в нем. Примечание: черные стрелки – дендриты. Окраска: синаптофизин, докраска гематоксилином. Об. 100; шкала – 20 мкм.

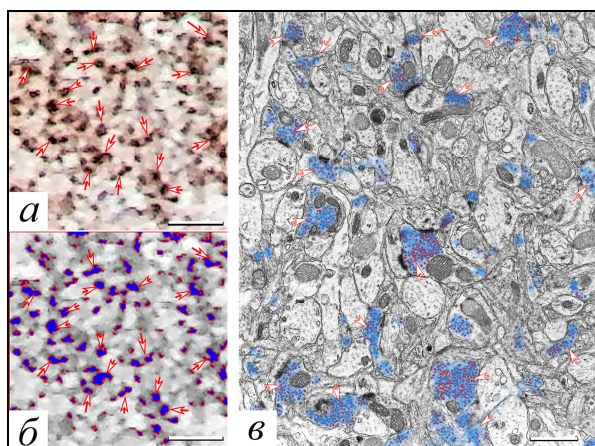


Рис. 3. Синаптические терминалы в нейропиле слоя I СМК животных контрольной группы синаптофизин (а) и электронномикроскопическом исследовании (в). Типирование синаптофизина (а), об. 100, шкала – 5 мкм; маска (б) изображения (а); осмирование, контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом, шкала – 1 мкм. Везде стрелками указаны терминалы. На электронограмме отдельные синаптические пузырьки в терминалы отмечены красным, а пространственное расположение их скоплений в нейропиле – синим. Терминалы без признаков разрушения, отсутствуют; проявление светлого типа деструкции и агглютинации пузырьков.

Иммуногистохимическая реакция на синаптофизин позволила выявить синаптические пузырьки аксональных терминалов во всех слоях СМК и визуально их отличать. В молекулярном слое плотность меток выше в верхнем этаже (рис. 2а). В пирамидных слоях отчетливо видны аксосоматические синапсы на перикарионах (рис. 2 б–г).

Для сопоставления результатов иммуногистохимического и ультраструктурного изучения аксональных терминалов проведено сравнение таких морфометрических параметров как общая численная плотность аксональных / синаптических терминалов и относительной площади их срезов. При выявлении р38, сегментирование изображения и вы-

деление контуров терминалов (рис. 3а, б) показало, что по форме и размерам в мозге контрольных животных они соответствовали зонам распределения синаптических пузырьков (рис. 3в).

Однако при определении общей численной плотности терминалов полного количественного соответствия при использованных подходах, закономерно, выявлено не было. Это, вероятно, связано со значительными различиями толщины срезов (2 мкм и 50–70 нм). При иммуногистохимическом исследовании терминалы, находящиеся рядом, в пространстве нейропиля, накладывались / сливались друг с другом, образуя крупные конгломераты из нескольких пресинаптических зон. При этом, в процессе морфометрического анализа, в сравнении с электронограммами, увеличивался размер одной видимой терминалы и уменьшалась их плотность (рис. 4).

На микрофотографиях видно, что для сегментирования конгломератов синаптических терминалов необходимо применение дополнительных цифровых методов, позволяющих разделять пиксели терминалов и окружающего пространства, незначительно отличающихся по яркости (на 30–40). Для этого идеально подходят фильтры ImageJ 1.52 – "Enhance Contrast", "Subtract Background", "Find Maxima" с различием яркости 30, плагин FindFoci. При использовании FindMaxima в каждом конгломерате терминалов удалось выявить несколько максимумов яркости (рис. 5).

С учетом представленного выше подхода был проведен морфометрический анализ общей численной плотности р38-позитивных терминалов по плотности максимумов яркости (после инвертирования изображения). Установлено, что в контроле общая численная плотность терминалов нейропиля в СМК варьировала от 18 (Min) до 37 (Max) на 100 мкм² (рис. 6). Это было меньше (критерий

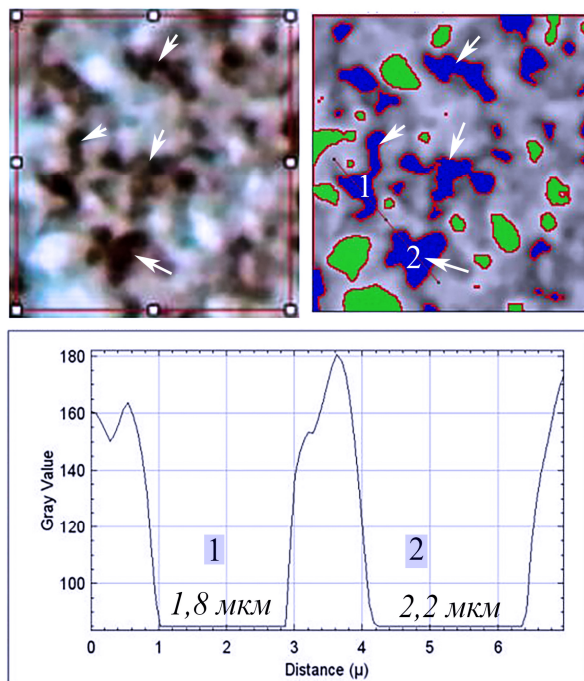


Рис. 4. p38-позитивные синаптические терминалы (коричневые цвет и белые стрелки) и их маски (синие цвет и белые стрелки) в слое I СМК животного контрольной группы – синаптофизин. Об. 100, ROI – 10×10 мкм. Везде стрелками указаны терминалы, зеленые участки – отростки астроцитов или дендритов. Конгломераты соседних синаптических терминалов (для графика) отмечены числами «1» и «2», ниже даны размеры отрезков линии их сечения на Plot Profile.

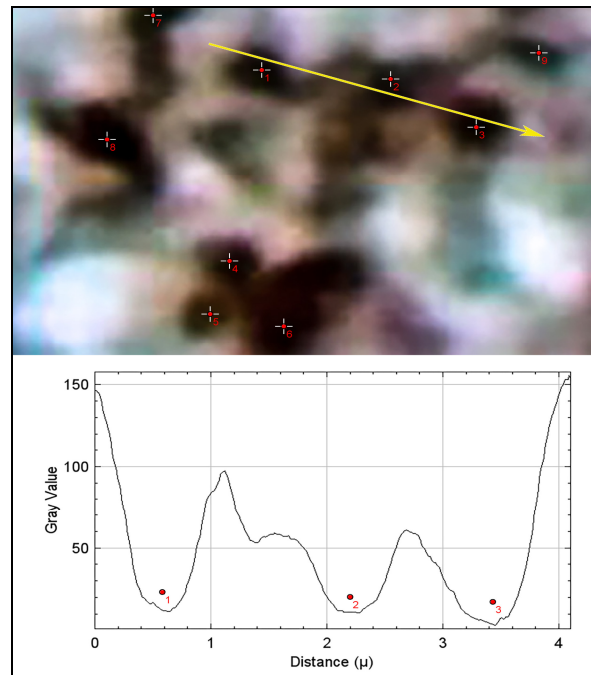


Рис. 5. p38-позитивные синаптические терминалы (коричневые) в слое I СМК животного контрольной группы – синаптофизин. Об. 100. Крестиками отмечены участки максимальной плотности маркера на срезе конгломератов синаптических терминалов. На графике (Plot Profile) числами «1», «2» и «3» отмечены соответствующие пики изображения вдоль направления желтой линии.

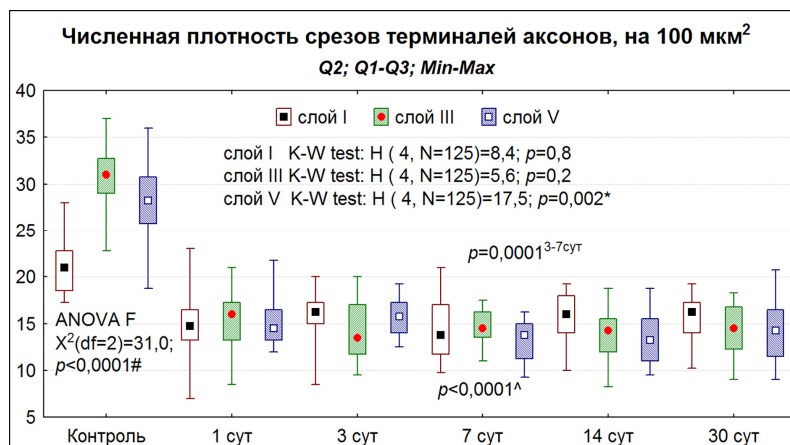


Рис. 6. Общая численная плотность p38-позитивных синаптических терминалов в слоях I, III и V СМК животных контрольной группы и после ПОСА. ANOVA Friedman и Kraskel-Wallis – соответственно однофакторный дисперсионный анализ Friedman для зависимых и Kraskel-Wallis для независимых выборок; * – различия между сроками в слое V статистически значимы (ANOVA Kraskel-Wallis); ^ – различия в сравнении с контролем для всех сроков значимы при $p < 0,0001$ (Mann-Whitney U test); # – различия между слоями в контроле значимы (ANOVA Friedman). Q2 – медиана (50%), Q1-Q3 – интерквартильный размах (25–75%), Min-Max – весь диапазон значений показателя.

Манна-Уитни; $p = 0,001$), чем при ультраструктурном исследовании контрольного материала – 40,6 (29,4–44,8) мкм² (Q2, Q1–Q3). При ультраструктурном исследовании выявлялось больше мелких терминальных ветвей аксонов.

После ПОСА во всех слоях СМК общая плотность терминалов статистически значимо уменьшалась уже через 1 сут (в слое I – на

28,6%, III – 46,9%, V – 46,4%) и сохранялась примерно на этом уровне в течение всего наблюдения (рис. 6).

Таким образом, с помощью цифровой обработки соседних пикселей изображения удалось частично решить проблему «скрытых» терминалов при иммуногистохимическом исследовании. Однако очень мелкие терминалы (около 0,25 мкм) не сегментировали

Таблица 1

Относительная площадь p38-позитивных терминалей нейропиля различных слоев сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в норме и после ПОСА, Q2 (Q1–Q3)

Группы	Слой I	Слой III	Слой V
Контроль	12,8 (10,8–15,2)	8,0 (7,6–8,4) $p=0,02^{I-III}$	7,9 (7,4–8,2) $p=0,01^{I-V}$
1 сут	11,4 (8,8–14,3)	5,2 (4,7–7,2) $p=0,001^* p=0,001^{I-III}$	12,0 (11,0–13,0) $p=0,0003^*$ $p=0,005^{III-V}$
3 сут	9,2 (7,0–11,7) $p=0,04^*$	4,0 (2,8–4,5) $p=0,0001^* p=0,01^{\wedge}$ $p=0,001^{I-III}$	13,5 (11,8–14,6) $p=0,0002^*$ $p=0,005^{III-V}$
7 сут	15,1 (9,2–18,9) $p=0,03^{\wedge}$	6,7 (5,7–6,9) $p=0,02^* p=0,0004^{\wedge}$ $p=0,002^{I-III}$	9,8 (9,0–10,1) $p=0,02^* p=0,001^{\wedge}$ $p=0,01^{I-V} p=0,03^{III-V}$
14 сут	18,9 (13,4–23,4) $p=0,01^*$	5,5 (4,4–9,8) $p=0,001^{I-III}$	9,8 (8,5–10,6) $p=0,01^* p=0,04^{I-V}$ $p=0,04^{III-V}$
30 сут	16,2 (12,5–24,0)	8,4 (7,2–10,6) $p=0,049^{\wedge} p=0,007^{I-III}$	12,4 (12,3–12,8) $p=0,0002^* p=0,001^{\wedge}$ $p=0,01^{III-V}$
ANOVA K-W(df=4)	H=18,6, $p=0,001^{\#}$	H=27,4, $p=0,0000^{\#}$	H=15,9, $p=0,003^{\#}$

Примечание: * – различия в сравнении с контролем статистически значимые при $p < 0,05$; \wedge – с предыдущим сроком (Mann–Whitney U test), I-III, I-V, III-V – в сравнении между соответствующими слоями (Wilcoxon test) при $p \leq 0,02$. # – различия между всеми сроками после ПОСА статистически значимы по результатам однофакторного множественного анализа (ANOVA Kraskel–Wallis). ОПТ – относительная площадь терминалей. Материал представлен как медиана и интерквартильный разброс.

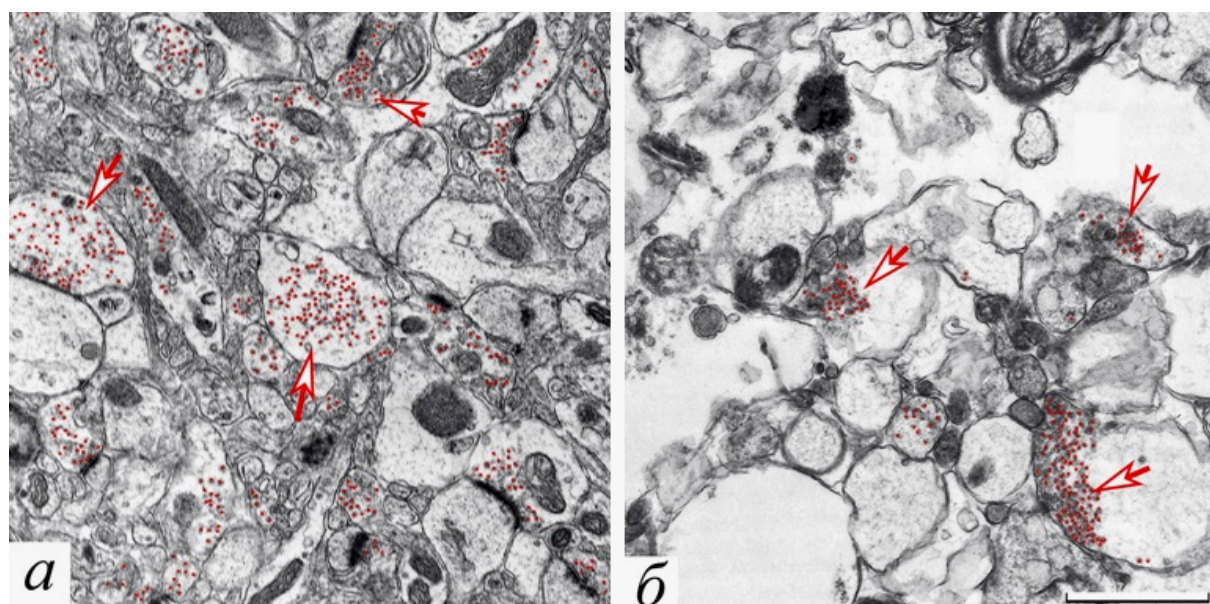


Рис. 7. Синаптические терминалы (а, б) в нейропиле слоя I (а) и III (б) СМК через 1 (а) и 3 (б) сут после ПОСА: различные проявления отека-набухания структур нейропиля, агглютинации и деструкции синаптических пузырьков (красные точки) с умеренным (а) и выраженным (б) уменьшением их количества в терминалах (стрелки). Окраска: осмирование, контрастирование цитратом свинца и уранил-ацетатом, шкала – 1 мкм.

лись, вероятно, в силу физических ограничений разрешающей способности светового микроскопа. Тем не менее, при использовании реакции на p38 удалось выявить статистически значимое уменьшение общей численной плотности терминалей после ПОСА. Аналогичный эффект острой ишемии выявлен нами и при электрономикроскопическом исследовании [5, 6].

С помощью анализа гистограмм распределения пикселей изображений нейропиля удалось выявить относительную площадь терминалей нейропиля. Подробно подход

описан ранее [3]. Уменьшение общей численной плотности терминалей после ПОСА сопровождалось статистически значимыми изменениями их размеров и относительной площади (табл. 1). Однако динамика этих изменений была не такая однозначная и различалась по срокам и слоям. В большей степени деструкции подвергались синаптические пузырьки терминалей в нейропиле слоя III СМК. Именно в этом слое выявлены самые низкие значения переменной. В слое I и V СМК мозга отмечалась явная тенденция, вероятно, адаптивного формирования крупных

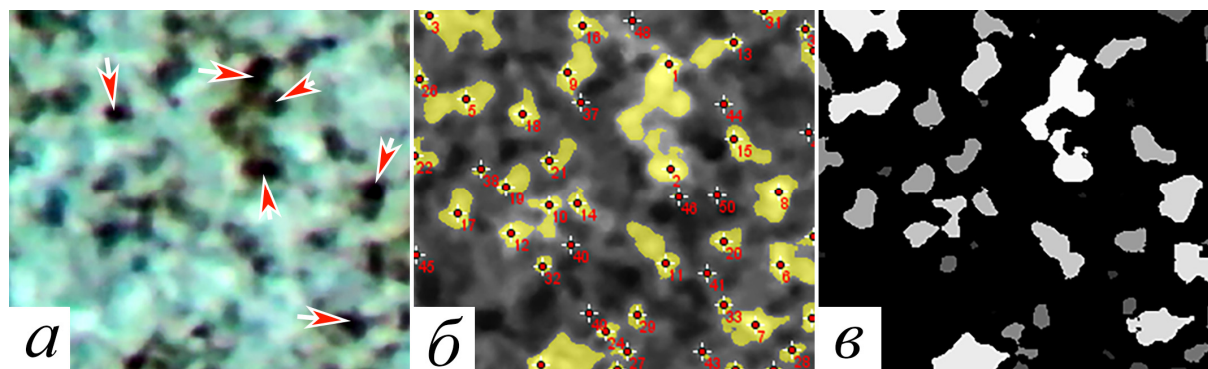


Рис. 8. p38-позитивные синаптические терминалы (а, стрелки) в слое I СМК через 1 сут после ПОСА при иммуногистохимическом исследовании. Точками отмечены яркие крупные терминалы, крестиками – бледные мелкие (б); с помощью оттенков серого (в) показано более точное типирование терминалов по содержанию белка p38. Об. 100; плагин FindFoci.

терминалей, в сравнении с контролем: в слое I – через 14 сут, а в слое V – через 1, 3, 7, 14 и 30 сут (табл. 1).

Полученные при иммуногистохимическом исследовании данные можно объяснить ультраструктурными изменениями терминалей: отеком-набуханием терминалей, деструкцией и агрегацией синаптических пузырьков с их смещением и сморщиванием, а также разрушением цитоскелета и митохондрий. В большей степени эти изменения проявлялись в слое III СМК (рис. 7 а, б). Мы полагаем, что именно за счет этого в слое III выявлялись небольшие скопления p38-позитивного материала (табл. 1) при практически равной их общей численной плотности (рис. 6).

О значительном увеличении неоднородности терминалий по содержанию p38-позитивных синаптических пузырьков свидетельствовали и данные иммуногистохимического исследования (рис. 8 а, б, в). Типирование терминалей по степени яркости и размерам (показатель – «общая интенсивность пикселей в пике», плагин FindFoci) показало, что после ПОСА увеличивалось (до 40–70% от общего количества) содержание бледных профилей терминалей (рис. 8в). Высокое содержание бледных терминалей, вероятно, подверженных светлomu (отечному) типу деструкции, отмечалось на протяжении всего периода наблюдения. В контроле преобладали терминалы с высоким содержанием p38.

Таким образом, по данным иммуногистохимического и ультраструктурного исследований, после ПОСА в течение всего периода наблюдения (30 сут) сохранялись выраженные проявления гипергидратации нейропиля СМК. Это, вероятно, приводило к перманентному разрушению преимущественно мелких веточек аксональных терминалей, что проявлялось уменьшением общей численной плотности пресинаптических зон (во всех слоях) и их относительной площади (слои I и III). В слое V СМК, в силу до конца неизученных факторов, изменялась локализация синапти-

ческих пузырьков, но без их значительного разрушения.

Полученные в работе данные послужат для уточнения особенностей структурно-функциональной реорганизации аксональных терминалей разных слоев СМК после ПОСА. Выявленные различия могут быть связаны с особенностями нейро-глиальных отношений изученных слоев СМК – атрофией и гипертрофией астроцитов по типу обратимого реактивного глиоза [3, 14, 18, 20].

Заключение

После двусторонней ПОСА в слоях I, III и V СМК крыс были выявлены деструктивные и компенсаторно-восстановительные изменения аксональных терминалей. Реорганизация межнейронных взаимоотношений происходила на фоне выраженных проявлений гипергидратации нейропиля. Максимальное разрушение синаптических терминалей отмечалось в слое III СМК, а их адаптивные изменения – в слое V СМК. Результаты иммуногистохимического и ультраструктурного исследований сопоставимы и дополняют друг друга. В совокупности все это, вероятно, приводило после ПОСА к значительным изменениям интегративно-пусковой деятельности неокортекса и связанных с ним отделов головного мозга.

Список источников / References

1. 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).
2. Макарьева Л.М., Акулинин В.А., Степанов С.С., Шоронова А.Ю., Авдеев Д.Б., Коржук М.С. Морфологическое и морфометрическое описание нейронов сенсомоторной коры головного мозга крыс после перевязки общих сонных артерий. Журнал анатомии и гистопатологии. 2022;11(1):49–58 [Makar'eva LM, Akulinin VA, Stepanov SS, Shoronova AY, Avdeev DB, Korzhuk MS. Morphological and morphometric

- description of neurons in the sensorimotor cortex of the rat brain after ligation of the common carotid arteries. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2022 Mar 30;11(1):49–58] (in Russian). EDN: HWPPMD. doi: 10.18499/2225-7357-2022-11-1-49-58
3. 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;11(2):43–51 [Makar'eva LM, Korzhuk MS, Akulinin VA, Stepanov SS, Shoronova AY, Avdeev DB. 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 Jun 30;11(2):43–51] (in Russian). EDN: UWTZLX. doi: 10.18499/2225-7357-2022-11-2-43-51
4. Питерс А., Палей С., Уэбстер Г. Ультраструктура нервной системы: Пер. с англ. 1972 [Piters A, Palei S, Uebster G. Ul'trastruktura nervnoi sistemy: Per. s angl. 1972] (in Russian).
5. Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). Омск: Омская областная типография; 2008 [Semchenko VV, Stepanov SS, Bogolepov NN. Sinapticheskaya plastichnost' golovnogogo mozga (fundamental'nye i prikladnye aspekty). Omsk: Omskaya oblastnaya tipografiya; 2008] (in Russian).
6. Степанов А.С. Сравнительная характеристика синаптоархитектоники неокортекса, гиппокампа и миндалевидного комплекса белых крыс в норме и после острой ишемии. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2017;6(4):47–54 [Stepanov AS. Comparative characteristics of the white rats neocortex, hippocampus and amygdale complex synaptarchitectonics 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
7. Степанов А.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б., Горбунова А.В. Коммуникация нейронов поля СА3 гиппокампа головного мозга белых крыс после острой ишемии. *Общая реаниматология*. 2018;14(5):38–49 [Stepanov AS, Akulinin VA, Stepanov SS, Avdeev DB, Gorbunova AV. Neurons Communication in the Hippocampus of Field CA3 of the White Rat Brain after Acute ischemia. *General Reanimatology*. 2018 Oct 28;14(5):38–49] (in Russian). EDN: VJVWPO. doi: 10.15360/1813-9779-2018-5-38-49
8. Bergsman JB, Krueger SR, Fitzsimonds RM. Automated criteria-based selection and analysis of fluorescent synaptic puncta. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006 Apr;152(1-2):32–9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2005.08.008
9. Black MM. Axonal transport: The orderly motion of axonal structures. *Methods in Cell Biology*. 2016;(131):1–19. doi: 10.1016/bs.mcb.2015.06.001
10. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of Neurocytology*. 1996 Jan;25(1):821–8. doi: 10.1007/BF02284844
11. Chen KS, Masliah E, Mallory M, Gage FH. Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neuroscience*. 1995 Sep;68(1):19–27. doi: 10.1016/0306-4522(95)00099-5
12. Clare R, King VG, Wirenfeldt M, Vinters HV. Synapse loss in dementias. *Journal of Neuroscience Research*. 2010 Apr 5;88(10):2083–90. doi: 10.1002/jnr.22392
13. Gordon-Weeks PR, Fournier AE. Neuronal cytoskeleton in synaptic plasticity and regeneration. *Journal of Neurochemistry*. 2013 Nov 11;129(2):206–12. doi: 10.1111/jnc.12502
14. Guillaumón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astroцитос en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*. 2015 Mar;30(2):119–29. doi: 10.1016/j.nrl.2012.12.007
15. Herold J, Schubert W, Nattkemper TW. Automated detection and quantification of fluorescently labeled synapses in murine brain tissue sections for high throughput applications. *Journal of Biotechnology*. 2010 Sep 15;149(4):299–309. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.03.004
16. Hu W, An C, Chen WJ. Molecular Mechanoneurobiology: An Emerging Angle to Explore Neural Synaptic Functions. *BioMed Research International*. 2015 Apr 14;2015:e486827. doi: 10.1155/2015/486827
17. Ippolito DM, Eroglu C. Quantifying Synapses: an Immunocytochemistry-based Assay to Quantify Synapse Number. *Journal of Visualized Experiments*. 2010 Nov 16;(45):2270. doi: 10.3791/2270
18. Jing Z, Shi C, Zhu L, Xiang Y, Chen P, Xiong Z, et al. Chronic Cerebral Hypoperfusion Induces Vascular Plasticity and Hemodynamics but Also Neuronal Degeneration and Cognitive Impairment. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2015 Apr 8;35(8):1249–59. doi: 10.1038/jcbfm.2015.55
19. Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B. Serial Section Scanning Electron Microscopy of Adult Brain Tissue Using Focused Ion Beam Milling. *Journal of Neuroscience*. 2008 Mar 19;28(12):2959–64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3189-07.2008
20. Koizumi S, Hirayama Y, Morizawa YM. New roles of reactive astrocytes in the brain: an organizer of cerebral ischemia. *Neurochemistry International*. 2018 Oct;119(10):107–14. doi: 10.1016/j.neuint.2018.01.007
21. Kreshuk A, Straehle CN, Sommer C, Koethe U, Cantoni M, Knott G, et al. Automated Detection and Segmentation of Synaptic Contacts in Nearly Isotropic Serial Electron Microscopy Images. Barnes S, editor. *PLoS ONE*. 2011 Oct 21;6(10):e24899. doi: 10.1371/journal.pone.0024899
22. Merchan-Pérez A, Rodríguez J-R, Alonso-Nanclares L, Schertel A, DeFelipe J. Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2009;3(18):1–14. doi: 10.3389/neuro.05.018.2009
23. Mishchenko Y. Automation of 3D reconstruction of neural tissue from large volume of conventional serial section transmission electron micrographs. *Journal of Neuroscience Methods*. 2009

- Jan;176(2):276–89.
doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.09.006
24. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5-th ed. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press; 2005.
25. Uyeda A, Muramatsu R. Molecular Mechanisms of Central Nervous System Axonal Regeneration and Remyelination: A Review. International Journal of Molecular Sciences. 2020 Oct 30;21(21):8116. doi: 10.3390/ijms21218116
26. Wu C-C, Reilly JF, Young WG, Morrison JH, Bloom FE. High-throughput Morphometric Analysis of Individual Neurons. Cerebral Cortex. 2004 May;14(5):543–54. doi: 10.1093/cercor/bhh016
27. Xing Y, Bai Y. A Review of Exercise-Induced Neuroplasticity in Ischemic Stroke: Pathology and Mechanisms. Molecular Neurobiology. 2020 Jul 20;57(10):4218–31. doi: 10.1007/s12035-020-02021-1

Информация об авторах

Степанов Сергей Степанович – д-р мед. наук, serg_stepanov@mail.ru;
<https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>
Макарьева Любовь Михайловна, lyuba.mamontova.07@gmail.com;
<https://orcid.org/0000-0002-1133-6541>
✉ Акулинин Виктор Александрович – д-р. мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета. Ул. Ленина, 12, Омск, 644099; v_akulinin@outlook.com;
<https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>
Коржук Михаил Сергеевич – д-р. мед. наук, профессор; gensurg@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4579-2027>
Шоронова Анастасия Юрьевна, nastasya1994@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0936-3137>
Авдеев Дмитрий Борисович – канд. ветеринар. наук, доцент; avdeev86@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>
Цускман Ирина Геннадьевна; v_akulinin@outlook.com

Information about the authors

Sergei S Stepanov – Doct. Med. Sci., serg_stepanov@mail.ru;
<https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>
Lyubov' M Makar'eva, lyuba.mamontova.07@gmail.com;
<https://orcid.org/0000-0002-1133-6541>
✉ 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>
Mikhail S Korzhuk – Doct. Med. Sci., Prof.; gensurg@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4579-2027>
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>
Irina G. Tsuskman; v_akulinin@outlook.com

Статья поступила в редакцию 2.08.2022; одобрена после рецензирования 12.09.2022; принята к публикации 15.09.2022.
The article was submitted 2.08.2022; approved after reviewing 12.09.2022; accepted for publication 15.09.2022.