

УДК 611-018.83+616.8-091.81+616.005.4+616-091.8
© А. С. Степанов, 2017
<https://doi.org/10.18499/2225-7357-2017-6-4-47-54>

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СИНАПТОАРХИТЕКТониКИ НЕОКОРТЕКСА, ГИППОКАМПА И МИНДАЛЕВИДНОГО КОМПЛЕКСА БЕЛЫХ КРЫС В НОРМЕ И ПОСЛЕ ОСТРОЙ ИШЕМИИ

А. С. Степанов

ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Омск, Россия

Цель исследования – изучение межнейронных синапсов и митохондрий соматосенсорной коры (ССК), СА1 гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса (МК) головного мозга белых крыс (n=35) после 20-минутной двусторонней окклюзии общих сонных артерий.

Материал и методы. Использовалась электронная микроскопия, морфометрические и статистические методы. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, а также фосфорновольфрамовой кислотой.

Результаты. Через 3 сут после ишемии общая численная плотность контактов (ОЧПК) в ССК снижалась на 55,2, СА1 гиппокампа – на 44,8, а МК – на 26,7%. Восстановление ОЧПК в ССК и СА1 гиппокампа до контрольного уровня происходило через 21 и 30 сут, а в МК – через 14 сут. Дефицит ОЧПК в постischemическом периоде зависел от количества синапсов и площади срезов митохондрий на единицу поля зрения в изученных отделах мозга до ишемии (норма).

Выводы. Чем меньше количество синапсов и больше площадь митохондрий в норме, тем меньше повреждались синапсы после ишемии.

Ключевые слова: крыса, реперфузия, неокортекс, гиппокамп, миндалевидный комплекс, синапсы, митохондрии, ультраструктура, морфометрия.

© A. S. Stepanov, 2017

Omsk State Medical University, Omsk, Russia

Comparative Characteristics of the White Rats Neocortex, Hippocampus and Amygdale Complex Synaptoarchitectonics in Norm and After Acute Ischemia

The aim of this study was to interneuronal synapses and mitochondria somatosensory cortex (SSC), CA1 of the hippocampus and the central nucleus of the amygdaloid complex (MC) of the brain of albino rats (n=35) after a 20-minute bilateral occlusion of common carotid arteries.

Material and methods. Used electron microscopy, morphometric and statistical methods. Ultrathin sections were contrasted by uranyl acetate and analyzed by lead citrate, and phosphonofomate acid.

Results. After 3 days after ischemia the total number density of contacts (TNDC) in the SSC declined by 55.2, CA1 hippocampus – 44.8, and MC – 26.7%. The restoration of TNDC in SSC and CA1 of the hippocampus to control levels occurred in 21 and 30 days, and in MC – in 14 days. Deficit TNDC in the postischemic period depended on the number of synapses and square slices of mitochondria per unit field of view in the studied parts of the brain to ischemia (norm).

Conclusions. The smaller the number of synapses and the larger the area of mitochondria in normal, the less damaged synapses after ischemia.

Key words: rat, reperfusion, neocortex, hippocampus, amygdaloid complex, synapses, mitochondria, ultrastructure, morphometry.

Введение

Экспериментальное сравнительное изучение закономерностей реорганизации межнейронных связей в разных отделах головного мозга при ишемии и реперфузии является актуальной задачей нейроморфологии [2, 3]. Это связано с изучением феномена селективной повреждаемости нейронов некоторых отделов мозга [8]. Разработаны различные экспериментальные модели ишемии [5], изучены молекулярные механизмы повреждения нейронов путем некроза и апоптоза [6, 9, 13]. В настоящее время существует огромная база данных по изучению синапсов при острой и хронической ишемии, которые обобщены и

проанализированы в тематических обзорах и монографиях [2, 4]. Имеются исследования ключевой роли митохондрий в регуляции «жизни» и «смерти» нейронов при патологических состояниях головного мозга [7, 12].

Однако, существенно меньше работ, касающихся сравнительного изучения синаптоархитектоники разных отделов головного мозга после острой ишемии и роли состояния митохондрий в норме на исход ишемии.

Целью настоящего исследования было изучение ультраструктуры синапсов, синаптоархитектоники и митохондрий соматосенсорной коры, СА1 гиппокампа и миндалевидного комплекса в норме и после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на базе ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России. Данное исследование одобрено этическим комитетом ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России.

В качестве экспериментальных животных использовали белых беспородных крыс (самцов) массой 180–200 г. Животные содержались в обычной виварии в условиях, регламентированных требованиями Постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Качественный и количественный состав рациона определяли по нормам, утвержденным Приказом МЗ РФ № 163 от 10.03.96. Исследования проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77 №755) и с рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

В экспериментальном исследовании проведено сравнение структурно-функционального состояния синапсов и митохондрий соматосенсорной коры, СА1 гиппокампа и центрального ядра миндалевидного комплекса головного мозга белых крыс через 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут после острой 20-минутной ишемии мозга, вызванной пережатием общих сонных артерий (2-сосудистая модель неполной глобальной ишемии без гипотонии).

Экспериментальная модель. На фоне премедикации (сульфат атропина 0.1 мг/кг, подкожно) и общей анестезии (Zoletil 100, 10 мг/кг) животным делали воротничкообразный разрез кожи на шее. Селективно выделяли и поднимали на лигатуры обе общие сонные артерии, затем артерии пережимали на 20 минут микрохирургическими зажимами. После снятия зажимов происходило восстановление артериального кровотока. Рану ушивали и обрабатывали раствором бриллиантовой зелени. После острой ишемии выживших и пронумерованных животных (основная группа, $n=30$) с помощью рандомизации (использование генератора случайных чисел) распределяли по шести подгруппам: взятие материала через 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут. Контролем (норма, $n=5$) служили животные без окклюзии артерий того же возраста.

Головной мозг фиксировали путем перфузии смеси 1% раствора глутарового

альдегида, 4% раствора параформа на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) и 5% раствора сахарозы через восходящую часть дуги аорты под давлением 90–100 мм рт. ст. в течение 15 мин. Затем животных помещали в холодильник при +4°C на 1 час, после этого извлекали головной мозг, выделяли, согласно атласу [10], фрагменты соматосенсорной коры (ССК), гиппокампа и миндалевидного комплекса (МК), которые хранили в растворе фиксатора при +4°C. На завершающем этапе крупные фрагменты ткани рассекали на пирамидные (ССК и СА1 гиппокампа) и кубические (МК) блоки, контрастировали 1–2 ч в 1% незабуференном растворе четырехоксида осмия. Промывали, обезвоживали и заключали в смесь эпона и аралдита. Для электронной микроскопии использовали ультратонкие (70–100 нм) срезы, которые окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца на сетках без подложки. Часть блоков, для изучения синаптических контактов и митохондрий сразу после фиксации и рассекания контрастировали в 5% спиртовом растворе фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК) в течение 1 часа [2]. Для получения срезов (70–100 нм) использовали ультрамикротомы УМТП-4 (Сумский завод, Украина) и LKB-8800 (Швеция), а для их просмотра – микроскопы ЭМВ-100ЛМ (Украина) и Hitachi-600Н (Япония). В каждом случае фотографировали по 10 полей зрения (на пластины 9×12 см) при увеличении ×12000.

На оцифрованных электронограммах проводили качественную оценку нейропиля, а также, с помощью программы ImageJ 1.46, определяли общую численную плотность межнейронных контактов (ОЧПК) и митохондрий, содержание функционально зрелых (асимметричные со сформированной пресинаптической решеткой – ПР) и незрелых (мелкие симметричные без ПР) контактов, площадь срезов митохондрий в нейропиле.

Получение основных статистик, определение характера распределения вариационных рядов, проверка статистических гипотез осуществлялась с помощью программ MedCalc© и StatSoft Statistica 8.0. Проверку статистических гипотез проводили при помощи непараметрических критериев U-критерия Манна–Уитни, ANOVA (однофакторный дисперсионный анализ) Краскела–Уоллиса и критерия χ^2 . Результаты представлены как медиана (нижний, верхний квартили) и в процентах. В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0.05$. Мощность исследований была > 0.85 , что свидетельствовало о достоверности полученных результатов [1].

Результаты и их обсуждение

Межнейронные синапсы. Через 1 и 3 сут после ишемии значительная часть синапсов разрушалась путем светлого (отечного) типа

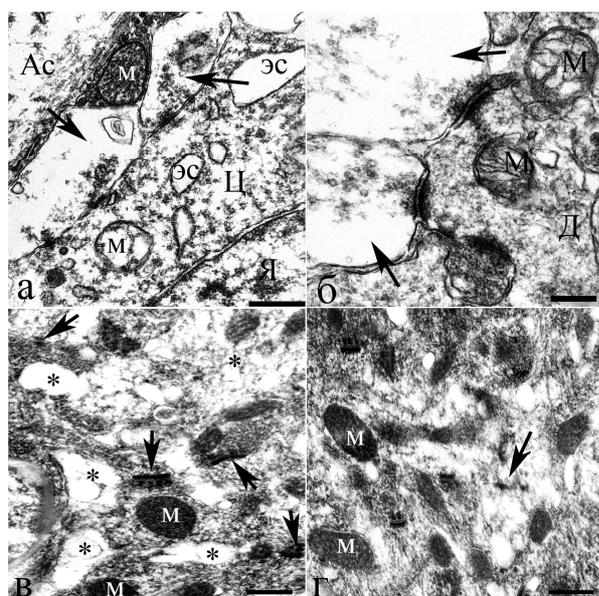


Рис. 1. Типичные ультраструктурные изменения синапсов соматосенсорной коры после острой ишемии (1 сут): светлый тип разрушения в аксосоматических (а) и аксодендритических (б) синапсах (стрелки) на фоне отека (*) нервной ткани; в – высокая устойчивость парамембранных филаментозных образований цитоскелета контактов (стрелки – ПП, ПСУ); г – очаги локальной разрушения контактов (стрелка). Ас – отросток аксоцита, Д – дендрит, М – митохондрии, Ц – цитоплазма, ЭС – эндоплазматическая сеть. Я – ядро. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца (а, б), фосфорновольфрамовой кислотой (в, г). Шкала (а, в, г) – 500 нм, б – 200 нм

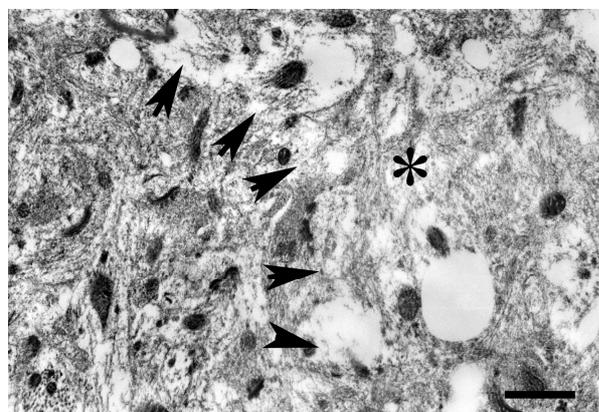


Рис. 2. Очаговое разрушение (*) межнейронных контактов после острой ишемии (1 сут) в зоне нейротилиа (отмечено стрелками) соматосенсорной коры белой крысы. Окраска фосфорновольфрамовой кислотой. Шкала – 1 мкм.

деструкции терминали с последующим разрывом контакта. Наиболее чувствительной частью синапсов была терминаль, которая набухла, просветлялась, в ней уменьшалось содержание синаптических пузырьков (СП), появлялись вакуоли, филаментозные и мембранные фигуры. Оставшиеся СП подвергались агглютинации, группировались либо в центре, либо около активных зон. Наиболее устойчивыми к ишемии были постсинаптические уплотнения (ПСУ) и вещество синапти-

ческой щели. Страдали все виды синапсов – аксосоматические, аксодендритические и аксошипииковые (рис. 1а, б). При этом часть синапсов полностью разрушалась уже в течение 1-х суток.

По данным морфометрического исследования ультратонких срезов, при контрастировании с помощью спиртового раствора ФВК (рис. 1 в, г), установлено, что после острой ишемии в ССК, СА1 гиппокампа и МК статистически значимо уменьшалось количество функционально зрелых (наличие ПР, структурная асимметрия контакта) и незрелых (ПР не сформирована, мелкие, симметричные) контактов (рис. 1 в; табл. 1, 2, 3).

Так, в ССК в период выраженного отека-набухания нервной ткани (1 и 3 сут) отмечалось статистически значимое уменьшение общей численной плотности контактов (ОЧПК) на 55.2%. При этом дефицит функционально зрелых контактов в это время составил 46.0%, а мелких незрелых – 84.2%. То есть, зрелые, а, соответственно, более крупные контакты были более устойчивыми. Тем не менее, встречались очаги почти полного разрушения межнейронных контактов рядом с нейропилем, содержащим большое количество неповрежденных контактов (рис. 2).

Наибольшее диффузно-очаговое разрушение зрелых и незрелых контактов отмечалось через 3 сут после ишемии (табл. 1).

В молекулярном слое гиппокампа ОЧПК в остром постишемическом периоде снижалась на 44.8% (3 сут), зрелых – 32.9% (3 сут), а мелких незрелых – 82.7% (3 сут). До контрольного уровня все показатели восстанавливались через 21 сут после ишемии (табл. 2).

В нейропиле миндалевидного комплекса в остром постишемическом периоде (3 сут) ОЧПК снижалась на 26.7%, зрелых – 19.0%, незрелых – 50.7%. До контрольного значения показатели этих переменных восстанавливались через 14 сут после ишемии (табл. 3).

Таким образом, в остром периоде (1–3 сут), когда имелись признаки выраженного отека-набухания нервной ткани, ОЧПК в ССК статистически значимо уменьшалась на 55.2%, СА1 гиппокампа – на 44.8%, а МК – на 26.7%. Различия между ССК и гиппокампом были статистически незначимы (10.4%, ДИ=7.1–27.2%; $\chi^2=1.13$, $p=0.29$), а различия между ССК и МК, гиппокампом и МК были значимы: на 28.5% (ДИ=11.3–43.9%; $\chi^2=10.6$, $p=0.001$) и 18.1% (ДИ=1.3–33.9%; $\chi^2=4.2$, $p=0.039$) соответственно. При этом дефицит функционально зрелых контактов в это время составил 46.0, 32.9 и 19.0%, а мелких незрелых – 84.2, 82.7 и 50.7% в изучаемых отделах мозга соответственно. Значимые различия по зрелым контактам выявлены между ССК и МК – 28.0% (ДИ=10.6–41.9%; $\chi^2=10.4$, $p=0.001$), а по незрелым между ССК и МК – 33.5%

Таблица 1

Численная плотность функционально зрелых и незрелых межнейронных контактов молекулярного слоя соматосенсорной коры белых крыс в норме и в постишемическом периоде, Me (QL-QH), окраска фосфорновольфрамовой кислотой

Посттшемический период	Показатели, на 100 мкм ²		
	Все контакты	Зрелые	Незрелые
1 сут	16.9 (13.5–21.6) <i>p</i> = 0.0001 [^]	15.4 (12.8–19.0) <i>p</i> = 0.001 [^]	1.5 (1.1–1.6) <i>p</i> = 0.0001 [^]
3 сут	14.1 (12.0–16.5) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.0001#	12.9 (9.0–15.1) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.003#	1.2 (0.9–1.4) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.047#
7 сут	18.2 (15.6–19.5) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.0001#	15.3 (12.7–19.2) <i>p</i> = 0.001 [^] <i>p</i> = 0.003#	2.9 (2.3–3.4) <i>p</i> = 0.01 [^] <i>p</i> = 0.0003#
14 сут	27.2 (22.6–28.6) <i>p</i> = 0.02 [^] <i>p</i> = 0.0001#	18.8 (14.5–21.8) <i>p</i> = 0.001 [^] <i>p</i> = 0.1#	8.4 (6.7–8.8) <i>p</i> = 0.047 [^] <i>p</i> = 0.0003#
21 сут	32.0 (27.7–33.4) <i>p</i> = 0.6 [^] <i>p</i> = 0.0001#	24.5 (19.6–27.5) <i>p</i> = 0.01 [^] <i>p</i> = 0.0001#	7.5 (6.2–8.7) <i>p</i> = 0.69 [^] <i>p</i> = 0.23#
30 сут	27.8 (26.8–32.7) <i>p</i> = 0.6 [^] <i>p</i> = 0.1#	20.6 (16.6–24.8) <i>p</i> = 0.47 [^] <i>p</i> = 0.045#	7.2 (3.8–7.7) <i>p</i> = 0.62 [^] <i>p</i> = 0.23#
ANOVA	<i>n</i> = 70; <i>df</i> = 5; <i>H</i> = 25.4; <i>p</i> = 0.001*	<i>n</i> = 70; <i>df</i> = 5; <i>H</i> = 30.5; <i>p</i> = 0.001*	<i>n</i> = 70; <i>df</i> = 5; <i>H</i> = 45.9; <i>p</i> = 0.001*
Контроль	31.5 (24.6–40.3)	23.9 (18.9–23.5)	7.6 (3.2–8.1)

Примечание: * – изменение переменной в течение всего периода наблюдения (1–30 сут) статистически значимы при *p* < 0.05 (ANOVA Краскела–Уоллиса); ^ – различия в сравнении с контролем статистически значимы при *p* < 0.05 (критерий Манна–Уитни); # – различия в сравнении с предыдущим сроком статистически значимы при *p* < 0.05 (критерий Манна–Уитни). Me – медиана, QL – нижний квартиль, QH – верхний квартиль.

Таблица 2

Численная плотность функционально зрелых и незрелых межнейронных контактов молекулярного слоя гиппокампа крыс в норме и в постишемическом периоде, Me (QL-QH), окраска фосфорновольфрамовой кислотой

Посттшемический период	Показатели, на 100 мкм ²		
	Все контакты	Зрелые	Незрелые
1 сут	29.7 (13.5–21.6) <i>p</i> = 0.0001 [^]	26.4 (19.6–28.5) <i>p</i> = 0.0001 [^]	3.3 (2.1–4.9) <i>p</i> = 0.0001 [^]
3 сут	27.8 (18.1–27.4) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.02#	25.7 (16.2–23.1) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.04#	2.1 (0.7–2.7) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.04#
7 сут	29.1 (22.6–31.7) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.01#	24.5 (18.4–26.3) <i>p</i> = 0.01 [^] <i>p</i> = 0.003#	4.6 (4.1–5.9) <i>p</i> = 0.01 [^] <i>p</i> = 0.001#
14 сут	43.5 (35.4–46.7) <i>p</i> = 0.01 [^] <i>p</i> = 0.0001#	30.1 (23.5–32.9) <i>p</i> = 0.001 [^] <i>p</i> = 0.01#	12.2 (7.6–13.5) <i>p</i> = 0.7 [^] <i>p</i> = 0.0001#
21 сут	49.6 (41.1–52.1) <i>p</i> = 0.2 [^] <i>p</i> = 0.03#	40.2 (31.6–45.5) <i>p</i> = 0.1 [^] <i>p</i> = 0.0001#	9.4 (7.8–14.5) <i>p</i> = 0.06 [^] <i>p</i> = 0.07#
30 сут	45.6 (37.8–54.4) <i>p</i> = 0.6 [^] <i>p</i> = 0.1#	33.8 (25.5–39.9) <i>p</i> = 0.08 [^] <i>p</i> = 0.03#	11.8 (9.2–12.1) <i>p</i> = 0.07 [^] <i>p</i> = 0.08#
ANOVA	<i>n</i> = 70; <i>df</i> = 5; <i>H</i> = 26.6; <i>p</i> = 0.0001*	<i>n</i> = 70; <i>df</i> = 5; <i>H</i> = 29.2; <i>p</i> = 0.0001*	<i>n</i> = 70; <i>df</i> = 5; <i>H</i> = 35.2; <i>p</i> = 0.0001*
Контроль	50.4 (41.4–61.2)	38.3 (29.7–42.4)	12.1 (9.3–12.9)

Примечание: * – изменение переменной в течение всего периода наблюдения (1–30 сут) статистически значимы при *p* < 0.05 (ANOVA Краскела–Уоллиса); ^ – различия в сравнении с контролем статистически значимы при *p* < 0.05 (критерий Манна–Уитни); # – различия в сравнении с предыдущим сроком статистически значимы при *p* < 0.05 (критерий Манна–Уитни); Me – медиана, QL – нижний квартиль, QH – верхний квартиль.

Численная плотность функционально зрелых и незрелых межнейронных контактов в нейропиле миндалевидного комплекса в норме и в постишемическом периоде, Me (QL-QH), окраска фосфорновольфрамовой кислотой

Постишемический период	Показатели, на 100 мкм ²		
	Все контакты	Зрелые	Незрелые
1 сут	23.5 (18.2–26.6) <i>p</i> = 0.001 [^]	18.2 (15.2–19.1) <i>p</i> = 0.03 [^]	5.3 (4.4–5.9) <i>p</i> = 0.02 [^]
3 сут	20.9 (15.7–22.8) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.01 [#]	17.5 (13.2–20.2) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.3 [#]	3.4 (2.1–3.8) <i>p</i> = 0.0001 [^] <i>p</i> = 0.001 [#]
7 сут	21.5 (16.5–23.2) <i>p</i> = 0.001 [^] <i>p</i> = 0.6 [#]	16.6 (14.7–21.3) <i>p</i> = 0.04 [^] <i>p</i> = 0.2 [#]	4.9 (4.3–5.4) <i>p</i> = 0.001 [^] <i>p</i> = 0.01 [#]
14 сут	26.6 (24.2–29.9) <i>p</i> = 0.2 [^] <i>p</i> = 0.01 [#]	20.2 (19.3–23.5) <i>p</i> = 0.6 [^] <i>p</i> = 0.1 [#]	6.4 (5.1–7.2) <i>p</i> = 0.3 [^] <i>p</i> = 0.001 [#]
21 сут	25.5 (24.1–31.0) <i>p</i> = 0.6 [^] <i>p</i> = 0.7 [#]	18.3 (17.7–26.2) <i>p</i> = 0.08 [^] <i>p</i> = 0.2 [#]	7.2 (6.3–7.5) <i>p</i> = 0.7 [^] <i>p</i> = 0.06 [#]
30 сут	30.3 (24.4–37.8) <i>p</i> = 0.5 [^] <i>p</i> = 0.2 [#]	24.0 (19.1–25.3) <i>p</i> = 0.02 [^] <i>p</i> = 0.5 [#]	6.3 (4.4–7.4) <i>p</i> = 0.2 [^] <i>p</i> = 0.07 [#]
ANOVA	<i>n</i> = 70; <i>df</i> = 5; <i>H</i> = 22.1; <i>p</i> = 0.01 [*]	<i>n</i> = 70; <i>df</i> = 5; <i>H</i> = 19.6; <i>p</i> = 0.01 [*]	<i>n</i> = 70; <i>df</i> = 5; <i>H</i> = 18.5; <i>p</i> = 0.01 [*]
Контроль	28.5 (22.6–36.3)	21.6 (17.8–22.7)	6.9 (3.5–7.8)

Примечание: * – изменение переменной в течение всего периода наблюдения (1–30 сут) статистически значимы при *p* < 0.05 (ANOVA Краскела–Уоллиса); ^ – различия в сравнении с контролем статистически значимы при *p* < 0.05 (критерий Манна–Уитни); # – различия в сравнении с предыдущим сроком статистически значимы при *p* < 0.05 (критерий Манна–Уитни); Me – медиана, QL – нижний квартиль, QH – верхний квартиль.

(ДИ=17.3–47.9%; $\chi^2=16.4$, *p*=0.0001), гиппокампом и МК – 22.0% (ДИ=4.9–37.8%; $\chi^2=6.3$, *p*=0.01).

В таблице 4 показаны центральные тенденции (медианы) показателя ОЧПК. Выявлено наличие статистически значимых изменений в динамике постишемического периода и между отделами. В норме и после ишемии ОЧПК в СА1 гиппокампа была значимо выше, чем в ССК и МК.

Полученные данные свидетельствовали о том, что после ишемии межнейронные контакты ССК, гиппокампа и МК подвергались значительной деструкции, но затем восстанавливались. Через 1 и 3 сут реперфузии во всех изученных отделах в большей степени страдали незрелые мелкие контакты. Функционально зрелые контакты были более устойчивыми. Восстановление межнейронных связей происходило на фоне исчезновения признаков отека-набухания нервной ткани. В МК количество межнейронных контактов достигало контрольного уровня уже через 14 сут после ишемии, а в ССК и гиппокампе – только через 21 и 30 сут. Через 7, 14, 21 и 30 сут после ишемии ОЧПК ССК, гиппокампа и МК увеличивалась как за счет неосинаптогенеза (образования пресинапсов – незрелых мелких контактов), так и за счет реорганизации функционально зрелых контактов.

Межнейронные синапсы нервной ткани головного мозга млекопитающих являются

ключевыми структурами, связанными с активацией механизмов некроза и апоптоза. Возбуждающие нейромедиаторы после повреждения синаптических пузырьков и выхода в межклеточное пространство запускают кальций-зависимые эксайтотоксические механизмы гибели нейронов [2, 3, 8]. Вполне вероятно, что более высокая (в сравнении с МК,) плотность синапсов в нейропиле гиппокампа и неокортекса в норме может быть причиной повышенной концентрации эксайтотоксических нейромедиаторов при разрушении терминалей после ишемии. По данным литературы, это способствует необратимым изменениям нейронов гиппокампа и неокортекса [6, 8]. По нашим данным, синапсы обладают высокой пластичностью, что обеспечивает восстановление и перестройку межнейронных отношений изученных отделов мозга после ишемии. Последнее также отмечено другими авторами [2].

Митохондрии. Форма, размеры и количество митохондрий в нервной ткани изученных отделов головного мозга белых крыс варьировали в зависимости от их локализации (проксимальные и дистальные отростки дендритного дерева, синаптические терминали) (рис. 3 а и б). Однако все митохондрии нейропиля (дендритов и синапсов) имели сходную структуру: матрикс – внутреннее пространство, ограниченное от цитоплазмы внутренней и внешней мембранами; внутрен-

Таблица 4

Сравнительная характеристика общей численной плотности межнейронных контактов нейропиля молекулярного слоя соматосенсорной коры, СА1 гиппокампа и миндалевидного комплекса белых в постишемическом периоде, Me (QL-QH), окраска фосфорновольфрамовой кислотой

Пост-ишемический период	Показатели, на 100 мкм ²			
	ССК	СА1	МК	Сравнение трех отделов (ANOVA)
1 сут	16.9 (13.5–21.6) $p = 0.0001^{\wedge}$	29.7 (13.5–21.6) $p = 0.0001^{\wedge}$	23.5 (18.2–26.6) $p = 0.001^{\wedge}$	$n = 30$; $df = 2$; $H = 15.2$; $p = 0.001$
3 сут	14.1 (12.0–16.5) $p = 0.0001^{\wedge}$ $p = 0.0001^{\#}$	27.8 (18.1–27.4) $p = 0.0001^{\wedge}$ $p = 0.02^{\#}$	20.9 (15.7–22.8) $p = 0.0001^{\wedge}$ $p = 0.01^{\#}$	$n = 30$; $df = 2$; $H = 16.5$; $p = 0.001$
7 сут	18.2 (15.6–19.5) $p = 0.0001^{\wedge}$ $p = 0.0001^{\#}$	29.1 (22.6–31.7) $p = 0.0001^{\wedge}$ $p = 0.01^{\#}$	21.5 (16.5–23.2) $p = 0.001^{\wedge}$ $p = 0.6^{\#}$	$n = 30$; $df = 2$; $H = 14.3$; $p = 0.002$
14 сут	27.2 (22.6–28.6) $p = 0.02^{\wedge}$ $p = 0.0001^{\#}$	43.5 (35.4–46.7) $p = 0.01^{\wedge}$ $p = 0.0001^{\#}$	26.6 (24.2–29.9) $p = 0.2^{\wedge}$ $p = 0.01^{\#}$	$n = 30$; $df = 2$; $H = 12.1$; $p = 0.01$
21 сут	32.0 (27.7–33.4) $p = 0.6^{\wedge}$ $p = 0.0001^{\#}$	49.6 (41.1–52.1) $p = 0.2^{\wedge}$ $p = 0.03^{\#}$	25.5 (24.1–31.0) $p = 0.6^{\wedge}$ $p = 0.7^{\#}$	$n = 30$; $df = 2$; $H = 17.5$; $p = 0.0001$
30 сут	27.8 (26.8–32.7) $p = 0.6^{\wedge}$ $p = 0.1^{\#}$	45.6 (37.8–54.4) $p = 0.6^{\wedge}$ $p = 0.1^{\#}$	30.3 (24.4–37.8) $p = 0.5^{\wedge}$ $p = 0.2^{\#}$	$n = 30$; $df = 2$; $H = 11.2$; $p = 0.01$
ANOVA	$n = 70$; $df = 5$; $H = 25.4$; $p = 0.001^*$	$n = 70$; $df = 5$; $H = 26.6$; $p = 0.0001^*$	$n = 70$; $df = 5$; $H = 22.1$; $p = 0.01^*$	-
Контроль	31.5 (24.6–40.3)	50.4 (41.4–61.2)	28.5 (22.6–36.3)	$n = 30$; $df = 2$; $H = 12.2$; $p = 0.01$

Примечание: * – изменение переменной в течение всего периода наблюдения (1–30 сут) статистически значимы при $p < 0.05$ (ANOVA Краскела–Уоллиса); \wedge – различия в сравнении с контролем статистически значимы при $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни); # – различия в сравнении с предыдущим сроком статистически значимы при $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни); Me – медиана, QL – нижний квартиль, QH – верхний квартиль.

Таблица 5

Основные морфометрические характеристики митохондрий нейропиля молекулярного слоя соматосенсорной коры, СА1 гиппокампа и миндалевидного комплекса белых крыс контрольной группы

Показатель	Me (QL-QH)
Соматосенсорная кора (ССК). 50 полей зрения	
Общая численная плотность на 100 мкм ² нейропиля	83.9 (52.3–92.1)
Площадь среза одной митохондрии (мкм ²)	0.112 (0.092–0.136)
Площадь всех митохондрий на 100 мкм ² нейропиля	9.4 (7.4–12.7)
СА1 гиппокампа. 50 полей зрения	
Общая численная плотность на 100 мкм ² нейропиля	42.4 (34.5–54.2); $p < 0.0000^*$
Площадь среза одной митохондрии (мкм ²)	0.141 (0.128–0.165); $p = 0.01^*$
Площадь всех митохондрий на 100 мкм ² нейропиля	6.0 (5.5–8.0); $p = 0.001^*$
Миндалевидный комплекс (МК). 50 полей зрения	
Общая численная плотность на 100 мкм ² нейропиля	74.5 (50.4–78.2); $p = 0.02^*$; $p < 0.0001^{\wedge}$
Площадь среза одной митохондрии (мкм ²)	0.150 (0.060–0.170); $p = 0.001^*$; $p = 0.3^{\wedge}$
Площадь всех митохондрий на 100 мкм ² нейропиля	11.1 (2.1–12.3); $p = 0.1^*$; $p = 0.001^{\wedge}$
ANOVA Краскела–Уоллиса	
Общая численная плотность	$n = 70$; $df = 2$; $H = 12.8$; $p = 0.001^{\#}$
Площадь среза одной митохондрии	$n = 70$; $df = 2$; $H = 9.5$; $p = 0.03^{\#}$
Площадь всех митохондрий	$n = 70$; $df = 2$; $H = 10.4$; $p = 0.02^{\#}$

Примечание: * – различия в сравнении с ССК и \wedge – гиппокампом статистически значимы при $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни); # – различия между всеми отделами статистически значимы при $p < 0.05$; Me – медиана, QL – нижний квартиль, QH – верхний квартиль.

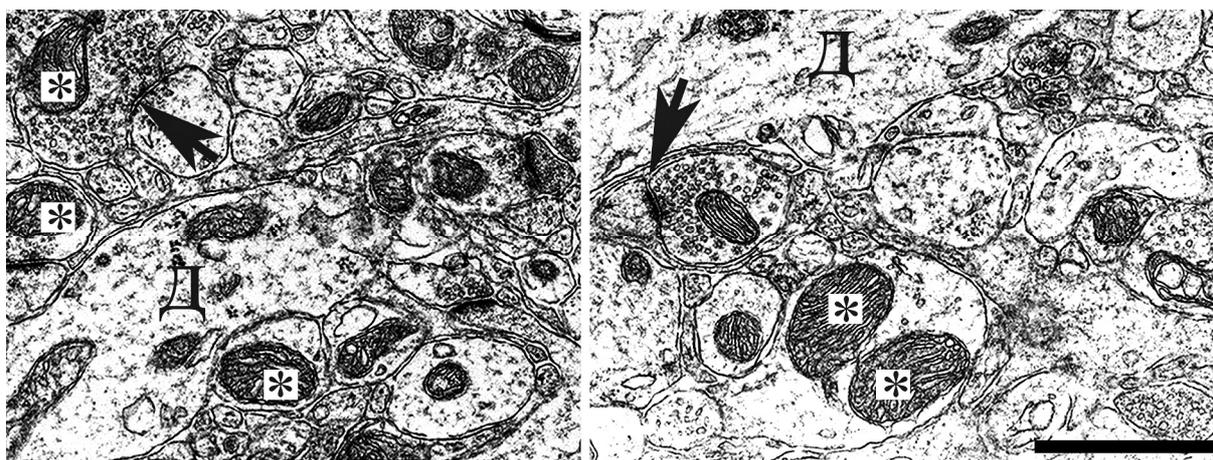


Рис. 3. Митохондрии (*) молекулярного слоя соматосенсорной коры головного мозга белой крысы, норма (контроль): ультраструктура митохондрий имеет сходное строение. Д – дендрит, стрелка – межнейронный контакт. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение $\times 15000$, шкала – 1 мкм.

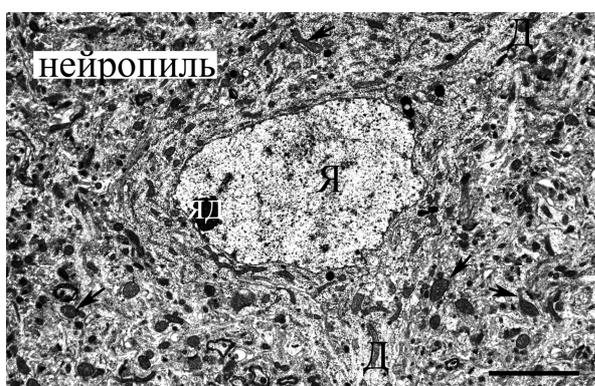


Рис. 4. Нейропиль и мультиполярный нейрон центрального ядра миндалевидного комплекса головного мозга белой крысы в норме (контроль): ультраструктура всех составляющих нейропиля без признаков повреждения, в нейропиле большое количество мелких митохондрий располагались в дистальных дендритах. Д – дендриты, Я – ядро, Яд – ядрышко, стрелки – крупные митохондрии. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение $\times 5000$, шкала – 4 мкм

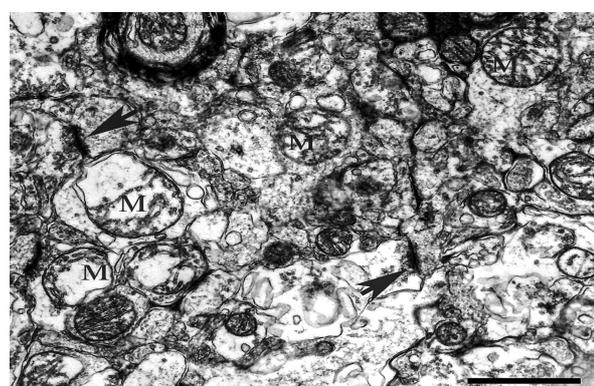


Рис. 5. Фрагмент молекулярного слоя соматосенсорной коры белой крысы с набуханием и частичным разрушением митохондрий в остром постиншемическом периоде (1 сут). Стрелка – межнейронный контакт. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение $\times 15500$, шкала – 1 мкм.

ная мембрана образовывала многочисленные кристы – гребневидные складки, обращенные во внутреннее пространство и увеличивающие площадь ее контакта с матриксом (рис. 3).

Митохондрии интенсивно окрашивались цитратом свинца (рис. 3), а также являлись ФВК-позитивными структурами (рис. 1 в, г). Это позволяло точно оценить количество и площадь этих органелл на срезе (табл. 5).

Существенно то, что в контроле площадь срезов всех митохондрий и их доля в единице поля зрения нейропиля МК были статистически значимо выше, чем в ССК и СА1 гиппокампа (табл. 5). Кроме того, в МК выявлялось очень много мелких (площадь среза до 0.027 мкм^2) митохондрий в дистальной части дендритного дерева нейронов (рис. 4). Диаметр таких митохондрий соответствовал уровню мелких дендритов.

Таким образом, в контроле на единицу площади среза нейропиля МК доля митохондрий была больше, чем в ССК и гиппокампе.

В дистальных дендритах нейронов МК выявлено много мелких митохондрий, что, вероятно, обеспечивало лучшее снабжение энергией аксодендритических синапсов. Так, площадь всех митохондрий (на 100 мкм^2) нейропиля в МК была $11.1 (2.1-12.3)$, ССК – $9.4 (7.4-12.7)$, а гиппокампа – $6.0 (5.5-8.0) \text{ мкм}^2$. Мы полагаем, что митохондриальный пул нейропиля МК вырабатывал больше энергии и это способствовало сохранению межнейронных синапсов в остром постиншемическом периоде.

Через 1 и 3 сут после ишемии на всех уровнях дендритного дерева нейронов появлялось большое количество набухших митохондрий с разрушенными кристами, вакуолизация митохондрий (рис. 5). По литературным данным, утрата цитохрома С поврежденными митохондриями активизирует процесс апоптоза [11, 13, 3].

Восстановление структуры и количества митохондрий в нейропиле ССК, гиппокампа и МК происходило по мере исчезновения при-

знаков отека-набухания нервной ткани и параллельно увеличению ОЧПК.

Существенно то, что дефицит ОЧПК в постишемическом периоде зависел от количества митохондрий в нейропиле изученных отделов мозга до ишемии. В меньшей степени (дефицит 26.7%) страдали межнейронные контакты МК, а больше – ССК (55.2%) и гиппокампа (44.8%), нейропиле которых содержал митохондрий меньше, чем МК.

Подобная идеология изучения связи синапсов и митохондрий нервной ткани головного мозга млекопитающих может быть перспективной для понимания структурно-функциональных основ селективности повреждений нейронов коры и гиппокампа, а также их защиты и восстановления после любой реперфузии.

Выводы

Высокая численная плотность межнейронных синапсов и меньшая относительная площадь срезов митохондрий в поле зрения неокортекса и гиппокампа до острой ишемии могут способствовать селективной деструкции этих отделов головного мозга в период реперфузии.

Список литературы

1. Боровиков В. П. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. СПб.: Питер; 2003. 688.
2. Семченко В. В., Степанов С. С., Боголепов Н. Н. *Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты)*. М.; 2014. 408.
3. Baron J-C., Yamauchi H., Fujioka M., Endres M. Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2014; 34: 2–18.
4. Clare R., King V.G., Wirenfeltd M., Vinters H. V. Synapse loss in dementias. *J. Neurosci. Res.* 2010; 88 (10): 2083–2090.
5. Hossmann K. A. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacol.* 2008; 55: 257–270.
6. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 3–10.
7. Martin L. J. Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2012; 107: 355–415.
8. Maurer L. L. The mechanisms of neurotoxicity and the selective vulnerability of nervous system sites. *Handb. Clin. Neurol.* 2015; 131: 61–70.
9. Merino J. G. Imaging of acute stroke. *Nat. Rev. Neurol.* 2010; 6: 560–571.
10. Paxinos G. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5-th ed. Elsevier Academic Press, SD, CA; 2005. 367.

Для цитирования: 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. doi: 10.18499/2225-7357-2017-6-4-47-54

For citation: Stepanov A.S. Comparative characteristics of the white rats neocortex, hippocampus and amygdale complex synaptoarchitectonics in norm and after acute ischemia. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2017; 6(4): 47–54. doi: 10.18499/2225-7357-2017-6-4-47-54

11. Plesnila N. Role of mitochondrial proteins for neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl.* 2004; 89: 15–19.
12. Rugarli E. I. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *J. EMBO.* 2012; 31 (6): 1336–1349.
13. Zille M., Farr T. D., Przesdzin I. et al. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2012; 32: 213–231.

References

1. Borovikov V. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. [Statistica. The art of analyzing data on a computer] St. Petersburg: Piter; 2003. 688 (in Russian).
2. Semchenko V.V., Stepanov S.S., Bogolepov N.N. *Sinapticheskaya plastichnost' golovnoego mozga (fundamental'nye i prikladnye aspekty)*. [Synaptic plasticity of the brain (fundamental and applied aspects)] Moscow; 2014. 408 (in Russian).
3. Baron J-C., Yamauchi H., Fujioka M., Endres M. Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2014; 34: 2–18.
4. Clare R., King V.G., Wirenfeltd M., Vinters H.V. Synapse loss in dementias. *J. Neurosci. Res.* 2010; 88 (10): 2083–2090.
5. Hossmann K. A. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacol.* 2008; 55: 257–270.
6. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 3–10.
7. Martin L. J. Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2012; 107: 355–415.
8. Maurer L. L. The mechanisms of neurotoxicity and the selective vulnerability of nervous system sites. *Handb. Clin. Neurol.* 2015; 131: 61–70.
9. Merino J. G. Imaging of acute stroke. *Nat. Rev. Neurol.* 2010; 6: 560–571.
10. Paxinos G. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5-th ed. Elsevier Academic Press, SD, CA; 2005. 367.
11. Plesnila N. Role of mitochondrial proteins for neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl.* 2004; 89: 15–19.
12. Rugarli E. I. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *J. EMBO.* 2012; 31 (6): 1336–1349.
13. Zille M., Farr T.D., Przesdzin I. et al. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2012; 32: 213–231.

Сведения об авторе

Степанов Александр Сергеевич – аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России. 644043, г.Омск, ул. Ленина,12. E-mail: stepan55@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.06.2017 г.