

УДК 616.831.31-005.4.-092.913:618.33

**Елизавета Игоревна Бонь¹, Наталия Евгеньевна Максимович², Сергей Михайлович Зиматкин³,
Оксана Борисовна Островская⁴, Никита Витальевич Кохан⁵**

¹канд. биол. наук, доц., доц. каф. патологической физиологии имени Д. А. Маслакова
Гродненского государственного медицинского университета

²д-р мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии имени Д. А. Маслакова
Гродненского государственного медицинского университета

³д-р биол. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии
Гродненского государственного медицинского университета

⁴канд. мед. наук, доц., доц. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии имени С. И. Гельберга
Гродненского государственного медицинского университета

⁵студент 4 курса медико-психологического факультета

Гродненского государственного медицинского университета

Elizaveta Bon¹, Natalia Maksimovich², Sergey Zimatkin³, Oksana B. Ostrovskaya⁴, Nikita Kokhan⁵

¹PhD in Biology, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Pathological
Physiology named after D. A. Maslakov of Grodno State Medical University

²Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of the Department of Pathological Physiology named after D. A. Maslakov
of Grodno State Medical University

³Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology
of Grodno State Medical University

⁴PhD in Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor
of the Department of Microbiology, Virology and Immunology named after S. I. Gelberg
of Grodno State Medical University

⁵4th Year Student of the Faculty of Medicine and Psychology
of Grodno State Medical University

e-mail: ¹asphodela@list.ru; ²mne@grsmu.by; ³zimatkin@grsmu.by;

⁴astrowskaja@gmail.com; ⁵nikita.kokhan1@gmail.com

ИЗМЕНЕНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ НЕЙРОНОВ ТЕМЕННОЙ КОРЫ И ГИППОКАМПА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С ТОТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ

При ишемии головного мозга развивается цепь патогенетических нарушений в его структурах, среди которых одним из ведущих является энергодефицит, что приводит к развитию клеточной патологии из-за нарушений гомеостаза, активности ферментов, целостности мембран и работы энергетических насосов. Нарушается работа ферментов, приводя к дисбалансу ионов и отеку головного мозга. Ультраструктурные характеристики органелл нейронов являются важными показателями степени повреждения головного мозга при ишемическом воздействии, что обуславливает необходимость проведения изучения изменений ультраструктуры нейронов головного мозга. В настоящем исследовании рассматривается характер ультраструктурных нарушений нейронов теменной коры и гиппокампа головного мозга крыс с тотальной церебральной ишемией.

Ключевые слова: нейроны, теменная кора, гиппокамп, церебральная ишемия.

Changes in Ultrastructure of Neurons in the Parietal Cortex and the Hippocampus of the Rat Brain with Total Cerebral Ischemia

With cerebral ischemia, a chain of pathogenetic disorders develops in its structures, among which one of the leading ones is energy deficiency, which leads to the development of cellular pathology due to violations of homeostasis, enzyme activity, membrane integrity and energy pumps. The work of enzymes is disrupted, leading to an imbalance of ions and swelling of the brain. The ultrastructural characteristics of neuron organelles are important indicators of the degree of brain damage during ischemic exposure, which necessitates the study of changes in the ultrastructure of brain neurons. The present study examines the nature of ultrastructural disorders in neurons of the parietal cortex and hippocampus of the brain of rats with total cerebral ischemia.

Key words: neurons, parietal cortex, hippocampus, cerebral ischemia.

Введение

При ишемии головного мозга (ИГМ) развивается цепь патогенетических нарушений в его структурах, среди которых одним из ведущих является энергодефицит,

что приводит к развитию клеточной патологии из-за нарушений гомеостаза, активности ферментов, целостности мембран и работы энергетических насосов. В условиях ИГМ избирательно нарушаются механизмы синаптической передачи, что способствует нарушению ауторегуляции местного кровотока, развитию вазоспазма, усилению агрегации тромбоцитов и развитию внутрисосудистого стаза, усугубляя гипоксию и усиливая энергодефицит. Нарушается работа ферментов, в т. ч. натрий-калиевой АТФазы, приводя к дисбалансу ионов и отеку головного мозга [1; 2; 4; 5].

Ультраструктурные характеристики органелл нейронов являются важными показателями степени повреждения головного мозга при ишемическом воздействии, что обуславливает необходимость проведения изучения изменений ультраструктуры нейронов головного мозга.

В настоящее время отсутствуют данные о степени выраженности данных нарушений в зависимости от вида ишемического повреждения и степени его тяжести. Данные исследования являются актуальными, т. к. позволяют изучить характер нарушений нейронов головного мозга при тотальной ишемии на ультраструктурном уровне.

Цель исследования – изучение характера нарушений нейронов головного мозга на ультраструктурном уровне.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 20 самцах беспородных белых крыс массой 260 ± 20 г с соблюдением требований Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей.

Моделирование ИГМ осуществляли в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40–50 мг/кг). В исследованиях использованы модели тотальной (ТИГМ) и субтотальной (СИГМ) ишемии головного мозга. В контрольную группу вошли 4 самца, в группу СИГМ и ТИГМ – по 8 самцов.

Тотальную ишемию головного мозга моделировали путем декапитации животных. Забор головного мозга осуществляли спустя 1 ч и 24 ч после декапитации. Контрольную группу составили ложно оперированные крысы аналогичных пола и веса. Электронно-микроскопические исследования были выполнены в теменной коре и гиппокампе головного мозга крыс. Сразу после декапитации и быстрого извлечения головного мозга лезвием вырезали участки теменной коры и гиппокампа и помещали их в 1 %-ый осмиевый фиксатор на буфере Миллонига (pH = 7,4) на 2 ч при температуре 4 °С. Далее срезы промывали в смеси буфера Миллонига (20 мл) и сахарозы (900 мг), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, смеси спирта и ацетона, чистом ацетоне; проводили через смесь смол (аралдит М + аралдит Н + дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона и заключали в смесь смол.

Полутонкие срезы (толщиной около 350 нм) изготавливали на ультрамикротоме MT-7000 (RMC, США), окрашивали метиленовым синим и вырезали лезвием необходимые для изучения участки внутреннего пирамидного слоя теменной коры и пирамидного слоя поля СА₁ гиппокампа. Ультратонкие срезы (толщиной около 35 нм) изготавливали на том же ультрамикротоме, собирали на опорные сеточки, контрастировали ацетатом урана и цитратом свинца. Для этого сеточки со срезами опускали в каплю уранилацетата и выдерживали 20 мин. в темноте при комнатной температуре, затем промывали в трех порциях бидистиллированной воды по 5 сек. и контрастировали цитратом свинца в течение 8 мин., промывали в трех порциях бидистиллированной воды по 5 сек.

Полученные препараты изучали под электронным микроскопом JEM-1011 (JEOL, Япония), фотографировали цифровой камерой Olympus MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия).

Морфометрию ультраструктур проводили с помощью программы Image Warp (Bit Flow, США). Измерялись плотность, размеры, форма органелл, плотность и длина крист митохондрий, размеры лизосом и их плотность, количество связанных с эндоплазматической сетью и свободных рибосом, высчитывали коэффициент их отношения.

Так как в эксперименте использованы малые выборки, которые имели ненормальное распределение, анализ проводили методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Данные представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$ (тест Крускала – Уоллиса с поправкой Бонферони).

Результаты исследования

Характеристика изменений ультраструктуры нейронов коры головного мозга крыс с тотальной церебральной ишемией отражена в таблице.

Таблица. – Показатели ультрамикроскопической морфометрии органелл нейронов теменной коры и гиппокампа крыс с тотальной церебральной ишемией, Me (LQ; UQ)

Показатель		теменная кора			гиппокамп		
		Контроль	ТИГМ 1 час	ТИГМ 1 сутки	Контроль	ТИГМ 1 час	ТИГМ 1 сутки
Митохондрии	плотность	1,8 (1,7;2,2)	1,6 (1,5;1,7)	1,2 (1,0;1,3) *+	2,1 (1,7;2,2)	1,7 (1,6;1,7)	1,3 (1,1;1,4) *+
	площадь, мкм ²	0,26 (0,17;0,37)	0,11 (0,06;0,12) *	0,10 (0,08;0,12) *	0,21 (0,17;0,26)	0,10 (0,08;0,12) *	0,09 (0,08;0,11) *
	форм-фактор, ед.	0,63 (0,61;0,72)	0,87 (0,78;0,96)*	0,93 (0,83;0,96)	0,71 (0,60;0,75)*	0,86 (0,84;0,95)*	0,89 (0,85;0,93)*
	фактор элонгации, ед.	3,8 (3,5;4,1)	1,4 (1,3;1,5)	1,4 (1,3;1,5)	2,1 (1,9;2,5)	1,5 (1,3;1,7)*	1,4 (1,2;1,5)*
	плотность крист митохондрий	76 (71;82)	45 (41;51)*	40 (37;45)*	62 (59;72)	45 (41;52)*	40 (37;45)*
	длина крист митохондрий, мкм ²	12 (10;15)	5 (4;6)*	4 (3;6)*	13 (12;18)	6 (4;7)*	5 (4;7)*
Рибосомы	количество, мкм ²	20,9 (19,3;22,7)	17,6 (16,5;18,7) *	17,4 (16,8;19,2)	20 (18,1;22,8)	16,2 (14,6;19,4) *	16,3 (15,0;18,7)*
	свободные, мкм ²	4,7 (4,1;5,8)	16,0 (15,3;16,8)*	16,5 (16,0;17,8)*	6,0 (4,8;7,3)	14,5 (13,3;17,3)*	15,5 (14,3;17,5)*
	связанные, мкм ²	16,2 (15,2;16,9)	1,6 (1,2;1,9)*	0,9 (0,8;1,4)*	14,0 (13,3;15,5)	1,7 (1,3;2,1)*	0,8 (0,7;1,2)*
	коэффициент отношения свя- занных и сво- бодных рибосом	3,4	0,1*	0,05*	2,3	0,1*	0,05*
Лизосомы	плотность	0,4 (0,3;0,5)	0(0;0,1)	0(0;0)	0,5(0,4;0,6)	0(0;0,1)	0(0;0)
	площадь, мкм ²	0,02 (0,01;0,03)	—	—	0,03 (0,02;0,04)	—	—

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с группой контроль, + – по сравнению с группой «ТИГМ 1 час».

При изучении ультраструктуры нейронов изменения количества митохондрий в цитоплазме нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при одночасовой ТИГМ не отмечалось ($p > 0,05$), однако имело место изменение их размера и формы.

При одночасовой ТИГМ, по сравнению с показателями в группе «контроль», в теменной коре площадь митохондрий уменьшилась на 58 % ($p < 0,05$), фактор элонгации (вытянутость органеллы) – на 63 % ($p < 0,05$), а форм-фактор (округлость органеллы) увеличился на 28 % ($p < 0,05$). В гиппокампе отмечались аналогичные изменения: уменьшение площади и фактора элонгации на 52 % ($p < 0,05$) и на 29 % ($p < 0,05$) соответственно и увеличение форм-фактора на 14 % ($p < 0,05$), что свидетельствует об округлении митохондрий в обеих изучаемых структурах.

Плотность крист митохондрий и их длина уменьшились в теменной коре на 40 %, ($p < 0,05$) и на 58 %, ($p < 0,05$) соответственно. В гиппокампе данные показатели уменьшились на 27 % ($p < 0,05$) и на 54 % ($p < 0,05$) соответственно.

При ТИГМ продолжительностью ишемического периода одни сутки происходило уменьшение плотности митохондрий: на 33 % в теменной коре ($p < 0,05$), 38 % в гиппокампе ($p < 0,05$) по сравнению с группой «контроль» и на 25 % ($p < 0,05$), 24 % ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с группой «ТИГМ 1 час».

При этом в теменной коре площадь митохондрий уменьшилась на 59 % ($p < 0,05$), фактор элонгации – на 63 % ($p < 0,05$), а форм-фактор, напротив, увеличился на 32 % ($p < 0,05$). В гиппокампе площадь уменьшилась на 53 % ($p < 0,05$), фактор элонгации – на 33 % ($p < 0,05$), в то время как форм-фактор увеличился на 20 % ($p < 0,05$).

Плотность крист митохондрий и их длина была меньше в теменной коре на 47 % ($p < 0,05$) и на 67 % ($p < 0,05$) соответственно. В гиппокампе данные показатели уменьшились на 35 % ($p < 0,05$) и на 62 % ($p < 0,05$) соответственно. Различий в данных показателях между группами «ТИГМ 1 час» и «ТИГМ 1 сутки» не было ($p > 0,05$).

По сравнению с показателями в группе «контроль» количество свободных рибосом при одночасовой ТИГМ в теменной коре возросло на 71 % ($p < 0,05$), а в гиппокампе – на 57 % ($p < 0,05$). Коэффициент отношения количества связанных и свободных рибосом уменьшился от 3,43 в контрольной группе до 0,11 в теменной коре ($p < 0,05$) и от 2,33 до 0,12 в гиппокампе ($p < 0,05$).

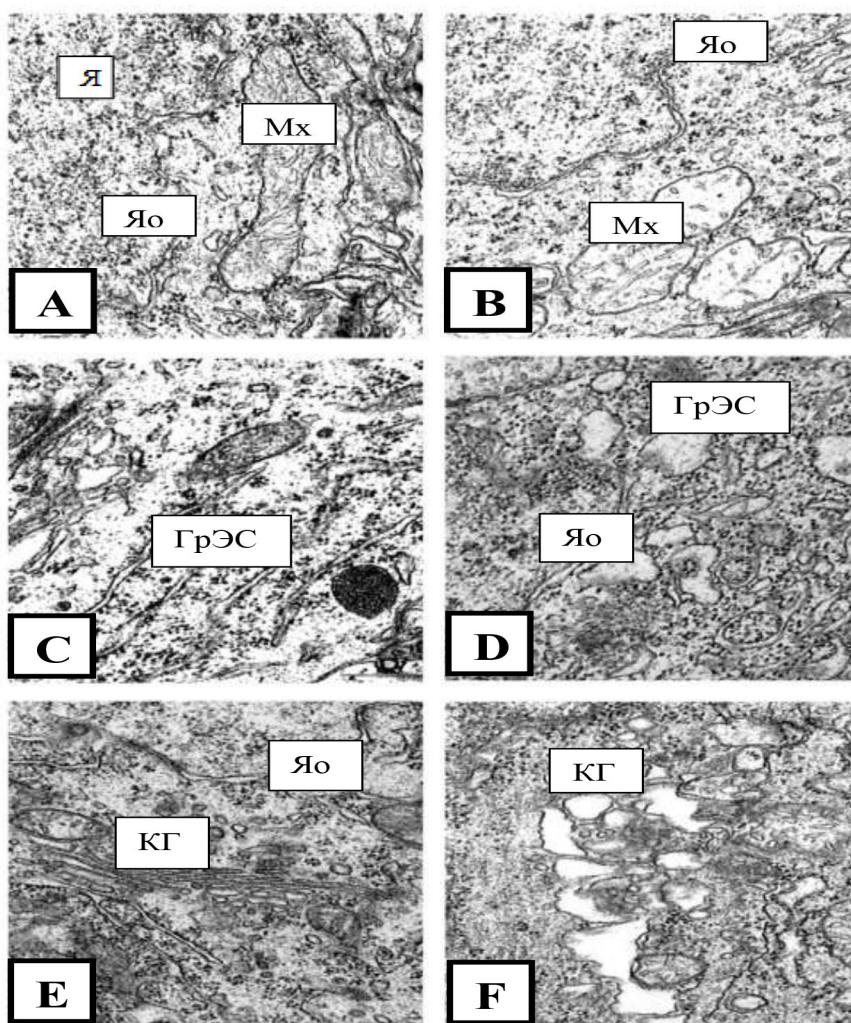
При 1-суточной ТИГМ количество свободных рибосом в цитоплазме нейронов теменной коры и гиппокампа по сравнению с показателями в группе «контроль» возросло на 72 % ($p < 0,05$) и на 58 % ($p < 0,05$), что не отличалось от изменений при ТИГМ продолжительностью 1 ч ($p > 0,05$). Коэффициент отношения количества связанных и свободных рибосом уменьшился от 3,4 в контрольной группе до 0,05 в теменной коре ($p < 0,05$) и от 2,33 до 0,05 в гиппокампе ($p < 0,05$).

Происходило значительное уменьшение плотности лизосом. При одночасовой ТИГМ в цитоплазме нейронов как теменной коры, так и гиппокампа наблюдались только единичные лизосомы ($p < 0,05$). При односуточной ТИГМ в обоих изучаемых отделах головного мозга лизосомы отсутствовали ($p < 0,05$).

Обсуждение полученных данных

Согласно данным литературы, при гипоксии головного мозга отмечаются изменения в митохондриях нейронов: набухание, разрушение их крист, неравномерное распределение в цитоплазме, что свидетельствует о нарушении энергетического обеспечения нейронов [1–4; 6]. К уменьшению количества митохондрий приводит деструкция наружной и внутренней мембран из-за нарушения проницаемости для катионов, что приводит к отеку и разрыву. Активное набухание митохондрий связано с работой цепи пе-

реноса электронов. Происходит расширение канальцев гранулярной и гладкой эндоплазматической сети, изменение их структуры, распад на мелкие гранулы, появление крупных вакуолей и петель [5–8]. Преобладают свободные рибосомы, образуя обширные скопления. Это является одним из проявлений формирующегося в клетке энергодефицита, т. к. фиксация рибосом к мембранам шероховатого эндоплазматического ретикулума при участии белка рибофорина, является энергозависимым процессом. В условиях ишемического воздействия нейрон сокращает экспорт белка и стремится направить его для внутренних потребностей. Дезорганизация гранулярной эндоплазматической сети приводит к накоплению вновь образованных белков в цитоплазме. По мере нарастания клеточной гипоксии и ацидоза усиливается денатурация белка [9].



А – Митохондрии нейронов теменной коры мозга крыс контрольной группы, В – Митохондрии нейронов теменной коры крыс с 1-часовой ТИГМ, С – Эндоплазматическая сеть нейронов теменной коры мозга крыс контрольной группы, D – Эндоплазматическая сеть нейронов теменной коры крыс с 1-часовой ТИГМ, Е – Комплекс Гольджи нейронов пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа крыс контрольной группы, F – Комплекс Гольджи нейронов пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа крыс с 1-суточной ТИГМ. (Мх – митохондрии, Я – ядро, Яо – ядерная оболочка, ГрЭС – гранулярная эндоплазматическая сеть, СР – свободные рибосомы, КГ – комплекс Гольджи). (Увеличение: 50 000. Электроннограмма)

Рисунок – Изменение ультраструктур нейронов

Вследствие накопления воды отмечается расширение цистерн комплекса Гольджи и их частичная фрагментация [7; 10]. Возрастает среднее количество лизосом, увеличиваются их размеры. Отмечается выход в цитоплазму и активация гидролитических ферментов лизосом – катепсина, рибонуклеазы, кислой фосфатазы, дезоксирибонуклеазы, гиалуронидазы и других ферментов, что приводит к аутолизу [4; 5; 8; 9; 11].

Полученные данные соответствуют данным литературы, дополняя их особенностями развития дезорганизации органелл при тотальной ишемии.

Заключение

Таким образом, при тотальной ишемии головного мозга происходит дезорганизация органелл как в нейронах теменной коры, так и в нейронах гиппокампе, что является причиной глубоких нарушений энергопродукции и метаболизма.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hong, A. Mitochondrial quality control in acute ischemic stroke / A. Hong, Zh. Bing, J. Xunming // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2021. – Vol. 41, Nr 12. – P. 3157–3170. – DOI: 10.1177/0271678X211046992.
2. Nicholls, D. G. Mitochondria and neuronal survival / D. G. Nicholls, S. L. Budd // *Physiol. Rev.* – 2000. – Vol. 80, Nr 315. – P. 60. – DOI: 10.1152/physrev.2000.80.1.315.
3. Бонь, Е. И. Темные нейроны мозга / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // *Морфология.* – 2017. – № 6. – С. 81–86. – DOI: 10.1007/s11055-018-0648-7.
4. Ultrastructural Changes of Neuronal Mitochondria After Transient and Permanent Cerebral Ischemia / Nina J. Solenski [et al.] // *Stroke.* – 2021. – Vol. 33, Nr 3. – P. 816–824. – DOI: 10.1161/hs0302.104541.
5. Mattson, M. P. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke / M. P. Mattson, C. Clumsee, Z. F. Yu // *Cell Tissue Re.* – 2000. Vol. 301. – P. 173–87. – DOI: 10.1007/s004419900154.
6. Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke / H. Zhi [et al.] // *Free Radic Biol. Med.* – 2020. – Vol. 146. – P. 45–58. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.005.
7. Neuronal ischemic injury: light microscopy, ultrastructure and biochemistry / J. H. Garcia [et al.] // *Acta Neuropathologica.* – 1978. – Vol. 43. – P. 15–24. – DOI: 10.1007/BF00685002.
8. Snider, B. J. Apoptosis and necrosis in cerebrovascular disease / B. J. Snider, F. J. Gottron, D. W. Choi // *Ann N Y Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 893. – P. 243–253. – DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07829.x.
9. Colbourne, F. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia / F. Colbourne, G. R. Sutherland, R. N. Auer // *J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 19. – P. 4200–4210. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-11-04200.1999.
10. Беленичев, И. Ф. Нейропротекция и нейропластичность : монография / И. Ф. Беленичев. – Киев : Полиграф плюс, 2014. – 512 с. – DOI: 10.1038/s42003-019-0521-4.
11. Zimatkin, S. M. Maternal alcohol intake induces dramatic ultrastructural changes in offspring brain cortex neurons / S. M. Zimatkin, E. I. Bon // *Brain and Nerves.* – 2017. – Vol. 1. – P. 1–4. – DOI: 10.15761/JBN.1000105.

REFERENCES

1. Hong, A. Mitochondrial quality control in acute ischemic stroke / A. Hong, Zh. Bing, J. Xunming // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2021. – Vol. 41, nr 12. – P. 3157–3170. – DOI: 10.1177/0271678X211046992.
2. Nicholls, D. G. Mitochondria and neuronal survival / D. G. Nicholls, S. L. Budd // *Physiol. Rev.* – 2000. – Vol. 80, nr 315. – P. 60. – DOI: 10.1152/physrev.2000.80.1.315.
3. Bon', Ye. I. Tiomnyje nejrony mozga / Ye. I. Bon', S. M. Zimatkin // *Morfologija.* – 2017. – № 6. – S. 81–86. – DOI: 10.1007/s11055-018-0648-7.
4. Ultrastructural Changes of Neuronal Mitochondria After Transient and Permanent Cerebral Ischemia / Nina J. Solenski [et al.] // *Stroke.* – 2021. – Vol. 33, nr 3. – P. 816–824. – DOI: 10.1161/hs0302.104541.
5. Mattson, M. P. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke / M. P. Mattson, C. Clumsee, Z. F. Yu // *Cell Tissue Re.* – 2000. Vol. 301. – P. 173–87. – DOI: 10.1007/s004419900154.
6. Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke / H. Zhi [et al.] // *Free Radic Biol. Med.* – 2020. – Vol. 146. – P. 45–58. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.005.
7. Neuronal ischemic injury: light microscopy, ultrastructure and biochemistry / J. H. Garcia [et al.] // *Acta Neuropathologica.* – 1978. – Vol. 43. – P. 15–24. – DOI: 10.1007/BF00685002.
8. Snider, B. J. Apoptosis and necrosis in cerebrovascular disease / B. J. Snider, F. J. Gottron, D. W. Choi // *Ann N Y Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 893. – P. 243–253. – DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07829.x.
9. Colbourne, F. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia / F. Colbourne, G. R. Sutherland, R. N. Auer // *J. Neurosci.* – 1999. – Vol. 19. – P. 4200–4210. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-11-04200.1999.
10. Bieliénichiev, I. F. Niejroprotekcija i nejroplastichnost' : monografija / I. F. Bieliénichiev. – Kijev : Poligraf Plius, 2014. – 512 s. – DOI: 10.1038/s42003-019-0521-4.
11. Zimatkin, S. M. Maternal alcohol intake induces dramatic ultrastructural changes in offspring brain cortex neurons / S. M. Zimatkin, E. I. Bon // *Brain and Nerves.* – 2017. – Vol. 1. – P. 1–4. – DOI: 10.15761/JBN.1000105.

Рукапіс паступіў у рэдакцыю 16.12.2023