

В.А. Шаврин, Т.В. Шулятникова

## Ультраструктурные особенности синапсов в критических зонах инфаркта головного мозга в эксперименте

Запорожский государственный медицинский университет

**Ключевые слова:** ишемия мозга, инфаркт мозга, ультраструктура мозга, синапсы.

Приведены результаты электронномикроскопического исследования синапсов коры головного мозга в перифокальных критических зонах формирующихся очагов ишемического инфаркта мозга у крыс линии Вистар в разные сроки (1, 6, 24 и 48 часов) после двусторонней перевязки общих сонных артерий. Выявлено, что в пределах критических зон в синапсах во всех изученных сроках одновременно наблюдаются изменения различного характера: от разнообразных ультраструктурных признаков «функциональной асинапсии» до грубой деструкции и необратимого разрушения и, наоборот, признаков активации синаптических связей.

### Ультраструктурні особливості синапсів у критичних зонах інфаркту головного мозку в експерименті

В.О. Шаврін, Т.В. Шулятникова

Наведено результати електронномікроскопічного дослідження синапсів кори головного мозку в перифокальних критичних зонах вогнищ ішемічного інфаркту мозку у щурів лінії Вістар у різні терміни (1, 6, 24 і 48 годин) після двобічної перев'язки загальних сонних артерій. Виявлено, що в межах критичних зон у синапсах у всіх вивчених термінах одночасно відбуваються зміни різного характеру – від різноманітних ультраструктурних ознак «функціональної асинапсії» до грубої деструкції та необоротного руйнування і, навпаки, ознак активації синаптичних зв'язків.

**Ключові слова:** ішемія мозку, інфаркт мозку, ультраструктура мозку, синапси.**Патологія.** – 2011. – Т.8, №3. – С. 90–93

### Ultrastructural features of synapses in critical zones of brain infarction in experiment

V.A. Shavrin, T.V. Shulyatnikova

This work presents the results of electron microscopical research of cerebral cortex synapses in perifocal critical zones of brain ischemic infarction forming focuses in Wistar's rats depending on different terms (1, 6, 24 and 48 hours) after bilateral ligation of common carotid arteries. It is revealed that in all studied terms within critical zones in synapses various character changes simultaneously take place – from various ultrastructural signs of «functional asynapsia» to rough and irreversible destruction on the one hand, and signs of activation of synaptic communications – on the other part.

**Key words:** brain ischemia, brain infarction, brain ultrastructure, synapses.**Pathologia.** 2011; 8(3): 90–93

Патоморфологическая концепция «критической зоны» инфаркта головного мозга, предложенная ранее по результатам целенаправленного светооптического и электронномикроскопического исследования секционного и экспериментального материала [5–7], оказывается продуктивной в практическом плане: при патологоанатомической оценке прогрессирования или стабилизации ядра инфаркта на момент смерти, в теоретическом – при анализе механизмов патогенеза инфаркта мозга. Некоторые детали морфогенеза тканевых изменений в критических зонах уже раскрыты в предыдущих работах, однако почти не изученными в этих зонах остаются ультраструктурные особенности синаптических связей между нейронами.

#### Цель работы

На ультраструктурном уровне изучить особенности изменений синапсов коры головного мозга в очагах ишемического некроза и в перифокальных критических зонах в динамике экспериментальной ишемии головного мозга.

#### Материалы и методы исследования

В работе использованы крысы линии Вистар, у которых путем одномоментной двусторонней перевязки

общих сонных артерий удается вызвать образование мелких ишемических инфарктов коры больших полушарий в зонах смежного кровообращения передних и средних, а также средних и задних мозговых артерий, идентифицируемых на светооптических – полутонких и гематоксилин-эозиновых – срезах. В опытах использовано 25 взрослых крыс обоего пола в возрасте 1–1,5 лет весом 200–250 г, содержащихся при комнатной температуре на стандартном полноценном рационе. Перевязку сонных артерий производили под внутрибрюшинным нембуталовым наркозом (0,005 г на 100 г веса). Через срединный разрез шеи открывали доступ к обеим сонным артериям, после чего их осторожно отделяли от вены и нерва, на уровне общих сонных артерий (ниже места отхождения восходящих глоточных артерий) под них последовательно проводили лигатуры. Перевязку обеих сонных артерий производили одномоментно. Операционное поле орошали антибиотиками, рану зашивали наглухо. После операции животные находились под постоянным наблюдением. После выхода из наркоза у всех наблюдали неврологическую симптоматику: клонические и (или) тонические судороги, птоз век, заваливание на бок при попытке передвижения и пр.

Забой проводили путем одномоментной декапитации в условиях повторного нембуталового наркоза в сроки: I группа (5 животных) – через 1 час, II (5 животных) – через 6 часов, III (5 животных) – через 24 часа, IV (5 животных) – через 48 часов после операции. Для контроля использовано 5 крыс, которым производили ложную перевязку с повторением всех этапов операции, но без связывания лигатур. У всех животных использована стереотипная методика взятия материала: вначале в условиях наркоза вскрывали черепную коробку над левым полушарием мозга, поверхность последнего орошали нормосмолярным глутаральдегидным фиксатором, через 20–30 с производили декапитацию. После извлечения мозга вырезали узкие полоски коры из зоны смежного кровообращения средней и передней мозговых артерий левого полушария для электронно-микроскопического исследования, а также фронтальные полоски мозга на этом же уровне для светооптического исследования. Измельченные кусочки фиксировали в глутаральдегидном и затем в осмиевом фиксаторах, заливали в аралдит по стандартной методике. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим и основным фуксином. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме OmU3 («Reichert»), контрастировали водным раствором уранилацетата и лимоннокислым свинцом по Рейнольдсу, изучали в электронном микроскопе ПЭМ-100-01. Светооптическое исследование фронтальных срезов мозга проводили с помощью окраски гематоксилином и эозином.

#### Результаты и их обсуждение

Через 1 час после перевязки сонных артерий в корковых зонах смежного кровоснабжения на светооптических срезах наблюдали появление мелких (до 1 мм) мозаичных очагов перинейронального и периваскулярного отека с набуханием нейронов и глиальных клеток. Через 6 часов в этих очагах появляются признаки лизиса некоторых набухших нейронов, а к 24 часам удается идентифицировать в той или иной мере четко очерченные очажки энцефалолизиса, которые к 48 часам достигают диаметра 1–3 мм. Вокруг этих очагов всегда наблюдается зона неравномерно выраженного отека с разнонаправленными изменениями нейронов, преимущественно по ишемическому типу. В поле зрения электронного микроскопа очаги энцефалолизиса представляют собой зоны колликвационного некроза и тотального тканевого распада, сходные с очагами ишемического инфаркта у людей. Среди распадающихся тканевых элементов всегда обнаруживаются и разрушающиеся синапсы, в значительной части из них активные зоны остаются в сцепленном состоянии пре- и постсинаптических мембран в течение длительного времени (рис. 1), что свидетельствует о высокой прочности и структурной устойчивости соединения в условиях ишемического распада. Отмечены и другие формы разрушения синапсов с признаками предварительного разобщения синаптических терминалей и последующего их лизиса или фагоцитоза.

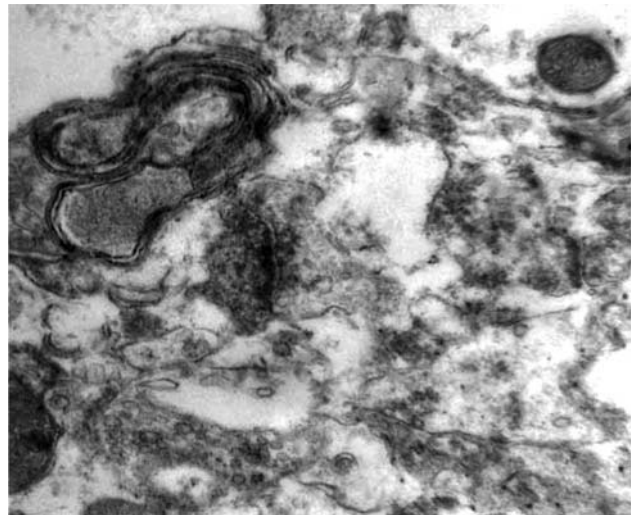


Рис. 1. Колликвационный распад тканевых структур в очаге энцефалолизиса (ядре инфаркта) в коре мозга крысы через 48 часов после перевязки сонных артерий. Разрушающиеся синапсы сохраняют сцепление терминалей в активных зонах.  $\times 22000$ .

В перифокальных зонах ультраструктурные изменения синапсов в сравнении с контролем отчетливо выражены во всех изученных сроках и отличаются большим разнообразием, в том числе, в пределах небольшой территории ткани. У животных I группы (1 час после операции) преобладают различные ультраструктурные проявления «функциональной асинапсии» [3,4]. Характерна агрегация синаптических пузырьков и сосредоточение их в центральных отделах пресинаптической терминали на некотором расстоянии от активных зон. Часть из них слипается между собой, многие приобретают удлиненную форму, некоторые – искривленную бобовидную; в пределах одной группы заметны существенные различия по диаметру – от минимального (15–20 нм) до максимального (60–65 нм). На многих профилях таких синапсов идентифицировать активные зоны не удастся, что свидетельствует, скорее всего, о небольшой протяженности последних (рис. 2).

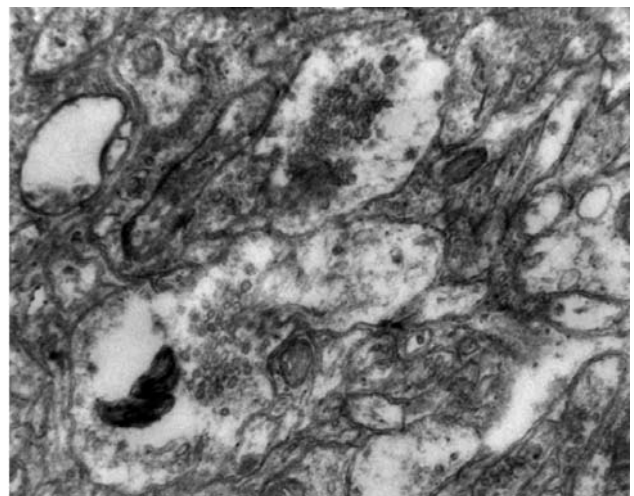


Рис. 2. Агрегация синаптических пузырьков в центральных зонах пресинаптических терминалей. Перифокальная зона очага формирующегося энцефалолизиса. 1 час после операции.  $\times 22000$ .

Для синапсов контрольных животных аналогичных территорий не характерен подобного рода полиморфизм пузырьков – они более однородны в пределах терминали, как по размерам, так и по форме – в возбуждающих синапсах круглые, диаметром 40–50 нм, в тормозных – уплощенные, диаметром 20–30 нм. Во многих синапсах у оперированных животных пузырьки равномерно распределены по терминали, в том числе, вблизи активной зоны, однако, проявления их экзоцитоза в синаптическую щель (равно как и обратного эндоцитоза) обнаруживаются намного реже, чем в контрольном материале. Характерно также наличие синапсов (как тормозного, так и возбуждающего типов) с достаточно хорошо выраженными активными зонами, но почти свободными от синаптических пузырьков. Не менее часто можно обнаружить противоположную ситуацию, когда пре-синаптическая терминаль оказывается переполненной пузырьками, занимающими все ее внутреннее пространство, но при этом их экзоцитоз отсутствует. Еще одним характерным признаком перифокальных зон является появление в постсинаптических терминалях конгломератов электронноплотного вещества, примыкающих к активным зонам и тесно связанных с ними, что, по мнению ряда авторов [1–3], также является свидетельством нарушения синаптической передачи (рис. 3).

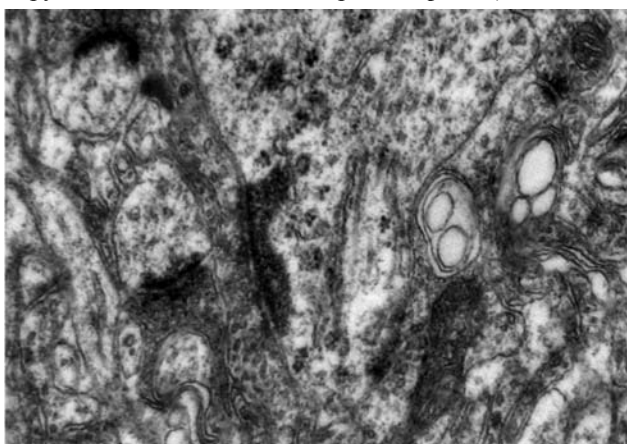


Рис. 3. Скопление вблизи постсинаптической мембраны электронноплотного вещества в виде уплощенного конгломерата, покрывающего активную зону на всем ее протяжении. Перифокальная зона очага формирующегося энцефалолизиса. 1 час после операции.  $\times 22000$

Большим разнообразием отличаются изменения активных зон. Преобладает неравномерное снижение электронной плотности и уменьшение толщины пре- и постсинаптической мембран (рис. 4). Чаще, чем в контроле, встречаются активные зоны небольшой протяженности – 300–400 нм и менее (в то время как для контрольных животных более характерны размеры от 600 до 1500 нм), а также точечные (60–100 нм) и фрагментированные. Грубых деструктивных изменений синапсов, свидетельствующих о полном их разрушении в этом сроке в перифокальных зонах еще не наблюдали, в том числе, в непосредственной близости к формирующемуся очагу энцефалолизиса, где доминирующей ультраструктурной особенностью является разобщение «неактивных зон» контактов между пре- и постсинап-

тическими терминалями за счет межзоточного отека, обусловленного разрушением астроцитарных отростков (клязматодендрозом) так, что связанными между собой они остаются только в области активных зон.

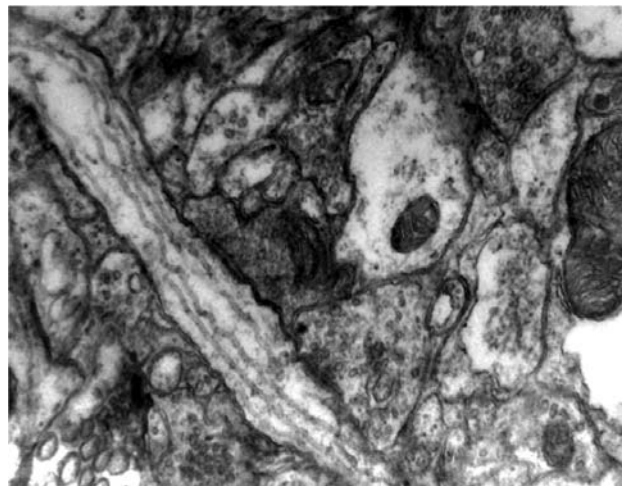


Рис. 4. Снижение электронной плотности и толщины пре- и постсинаптических мембран. Перифокальная зона очага формирующегося энцефалолизиса. 1 час после операции.  $\times 28000$ .

Через 6 часов после операции в перифокальных зонах усиливается мозаичный межзоточный отек и разобщение «неактивных» участков становится более распространенным. Остаются характерными и все изменения, обнаруженные в первой группе, но с наметившейся тенденцией к более выраженной мозаичности на территории, окружающей очаг начинающегося энцефалолизиса.

Эта тенденция становится четко выраженной особенностью в остальных двух группах животных (24 и 48 часов после операции), когда очаги колликвационного некроза приобретают более или менее отчетливую конфигурацию. В перифокальных зонах правилом становится чередование участков с выраженными описанными изменениями синапсов с участками, в которых ультраструктура синапсов сходна с таковой у контрольных животных (рис. 5).

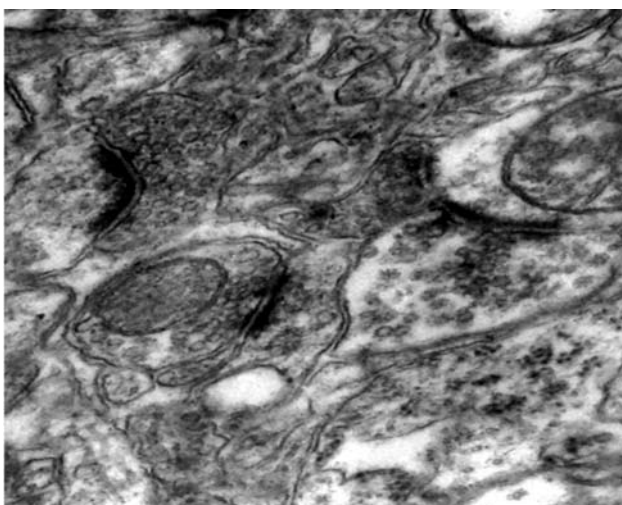


Рис. 5. Активно функционирующие аксо-дендритные синапсы в перифокальной зоне очага энцефалолизиса. 48 часов после операции.  $\times 28000$ .

Для этих групп также очень характерно наличие множества синапсов, подверженных грубой деструкции и разрушению, подобных таковым в зоне некроза (рис. 1). Они встречаются по всей территории перифокальных зон: как в участках, отмеченных признаками «функциональной асинапсии», так и в участках с более или менее восстановленной ультраструктурой синапсов. Как правило, разрушающиеся синапсы охватываются астроцитарными отростками, изолируясь таким образом от окружающих тканевых элементов. Нередкими находками являются синапсы, подверженные частичному коагуляционному некрозу, при этом коагуляции подвергается только пресинаптическая терминаль (рис. 6).

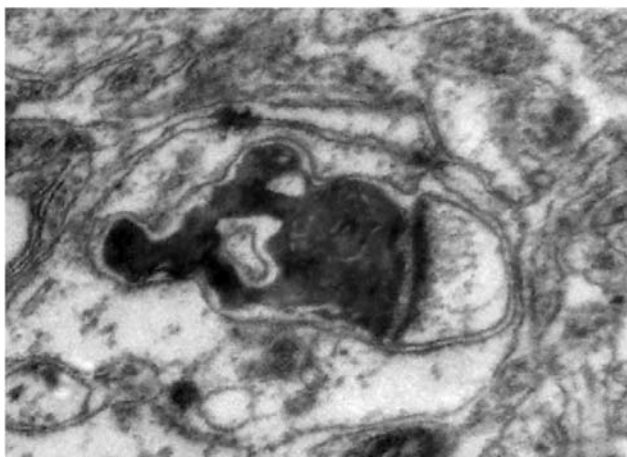


Рис. 6. Коагуляционный некроз пресинаптической терминали. Перифокальная зона очага энцефалолиза. 48 часов после операции.  $\times 28000$ .

Учитывая описанные особенности, логично полагать, что деструктивно измененные синапсы одной из своих терминалей (чаще пресинаптической) принадлежат отдаленным нейронам, погибшим в очаге некроза (ядре инфаркта).

Результаты исследования показывают, что при двусторонней перевязке сонных артерий у крыс линии Вистар, приводящей к образованию очагов ишемического энцефалолиза в корковых зонах смежного кровообращения мозговых артерий, значительные изменения синапсов появляются не только на территории очагов, но и за их пределами в перифокальных территориях (критических зонах). Характер этих изменений свидетельствует о нарушениях синаптической передачи на сравнительно больших территориях ткани, не ограниченных небольшими территориями формирующихся очагов некроза, что объясняет наличие соответствующей неврологической симптоматики у животных в послеоперационном периоде.

## Выводы

1. В перифокальных критических корковых зонах формирующегося инфаркта мозга у крыс, в динамике его развития от 1 до 48 часов, появляются разнообразные ультраструктурные изменения синапсов, свидетельствующие о нарушении синаптической проводимости.

2. В раннем сроке (до появления отчетливой зоны некроза) на территории критических зон преобладают диффузно распространенные изменения типа «функциональной асинапсии» в разных сочетаниях без выраженных процессов разрушения синапсов.

3. Ультраструктурными признаками «функциональной асинапсии» в критических зонах инфаркта мозга являются отсутствие синаптических пузырьков в пресинаптической терминали или агрегация их вдали от активной зоны, резко выраженный полиморфизм пузырьков, переполнение слипающимися пузырьками всего объема пресинаптической терминали, отсутствие или резкое снижение экзоцитоза, снижение электронной плотности и толщины пре- и постсинаптических мембран в активной зоне, появление в постсинаптической терминали конгломератов электронноплотного вещества, прикрывающего активную зону на всем ее протяжении.

4. По мере формирования очага ишемического некроза (6–48 часов) изменения синапсов в критических зонах приобретают отчетливую разнонаправленность: синапсы, измененные по одному из вариантов «функциональной асинапсии», чередуются с деструктивно измененными и разрушающимися, а также с участками полного восстановления их ультраструктуры и функции.

## Литература

1. *Ennio Pannese*. Neurocytology: fine structure of neurons, nerve processes, and neuroglial cells / Ennio Pannese – Thieme, 1994. – 264 p.
2. *Gordon M. Shepherd* The synaptic organization of the brain / M. Gordon – Oxford University Press, 2004 – 719 p.
3. *Боголепов Н.Н.* Ультраструктура синапсов коры большого мозга человека в старческом возрасте / Н.Н. Боголепов // *Анналы неврологии*. – 2008. – Т. 2, №4. – С. 22–27.
4. *Боголепов Н.Н.* Закономерности пластичности и стабильность синапсоархитектоники мозга / Н.Н. Боголепов // *Вестник международной академии наук (русская секция)*. – 2010. – №1. – С. 18–21.
5. *Шаврин В.А.* Патоморфология перифокальных критических зон (пенумбры) при инфарктах головного мозга / В.А. Шаврин, Т.В. Шулятникова // *Патология*. – 2007. – Т. 4, №3. – С. 39–41.
6. *Шаврин В.А.* Морфогенез «ишемически-гомогенизирующих» изменений нейронов и их значение в патогистологической диагностике ишемических заболеваний головного мозга / В.А. Шаврин, Т.В. Шулятникова, Ю.Ф. Полковников // *Патология*. – 2008. – Т. 5, №4. – С. 73–78.
7. *Шулятникова Т.В.* Ультраструктурные особенности микроциркуляторного русла в критических зонах ишемии головного мозга в эксперименте / Т.В. Шулятникова // *Патология*. – 2010. – Т. 7, №2. – С. 32–34.

## Сведения об авторах:

Шаврин В.А., д. мед. н., профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины с основами права ЗГМУ.

Шулятникова Т.В., ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины с основами права ЗГМУ.

## Адрес для переписки:

Шаврин В.А. 69035, г. Запорожье, пр-т Маяковского, 26, каф. патанатомии ЗГМУ.