

М.Э. СУЛТАНЛЫ

## УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКСО-ДЕНДРИТИЧЕСКИХ И АКСО-СОМАТИЧЕСКИХ СИНАПСОВ В ОРБИТО-ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ БЕЛЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС НА ФОНЕ МАЛОБЕЛКОВОЙ ПИЩИ ПОСЛЕ ОСТРОГО ЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

*Научно-исследовательский институт физиологии им. акад. А. Караева Национальной Академии Наук, г. Баку, Азербайджан*

*Актуальность.* Ультраструктурные изменения аксо-дендритических (ахо-dendritic synapses; ADS) и аксо-соматических синапсов (ахо-somatic synapses; ASS) в орбито-фронтальной коре (ОФК) головного мозга белых лабораторных крыс при белковом дефиците в пище после острого звукового воздействия остаются малоизученными.

*Цель.* Электронно-микроскопическое изучить состояние аксо-дендритических и аксо-соматических синапсов в I-IV слоях ОФК половозрелых белых лабораторных крыс в условиях сбалансированной и малобелковой пищи после острого звукового воздействия

*Материал и методы.* Опыты выполнены на 64-х белых нелинейных половозрелых лабораторных крысах-самцах массой 180,0-230,0 гр (8 – интактных, 56– экспериментальных) После непрерывного звонка интенсивностью 120 db в течении 120 секунд 56 крыс разделены на 2 группы: с сбалансированной пищей (контрольная - 28) и малобелковой пищей (основная – 28); с 2-мя подгруппами в каждой из них: стресс-устойчивые (по 12) и стресс-неустойчивые (по 16 животных). Прием воды – без ограничений. Животные из эксперимента выведены на 10-е, 20-е, 30-е и 40-е сутки после звукового воздействия. Параллельно с гистологическими и иммуногистохимическими анализами образцы I-IV слоев ПФК изучены также трансмиссионной электронной микроскопией.

*Результаты.* Электронно-микроскопические изменения строения ADS и ASS выявлены во всех слоях ПФК. Отмечены нарушения тонкой структуры как пресинаптического, так и постсинаптического полюсов. Максимальная выраженность ультраструктурных изменений присуща ADS поверхностного (I, молекулярного), наружного зернистого (II), пирамидного (III) и внутреннего зернистого (IV) слоев ПФК. Дезорганизация ASS отмечена преимущественно в контактах, постсинаптический полюс которых сформирован телами мелких пирамидных нейронов III слоя, а также - пирамидных и звездчатых нейронов IV слоя ПФК. Во всех сроках наблюдений нарушения тонкой организации наиболее выражены у стресс-неустойчивых животных основной группы опытов, особенно – на 10-е и 20-е сутки после воздействия.

*Заключение.* Острое звуковое воздействие инициирует нарушения тонкой организации аксо-дендритических и аксо-соматических синапсов в I-IV слоях ПФК белых лабораторных крыс. Очаговая деструкция части отмеченных синапсов у крыс с малобелковой пищей после острого аудиогенного стресса имеет необратимый характер и может рассматриваться как проявление нарушений межнейрональных связей в ПФК у животных в условиях малобелковой пищи.

*Ключевые слова:* орбито-фронтальная кора, электронная микроскопия, крыса, стресс, малобелковая пища.

*Актуальность.* Орбито-фронтальная кора (ПФК) – часть сложной интегративной функциональной системы, регулирующей в том числе и поведенческие реакции у различных млекопитающих. В настоящее время комплексно изучаются морфологические, нейрохимические и физиологические особенности ПФК в динамике адаптации центральной нервной системы к стрессу [1, 2, 3]. При этом недостаточно освещены вопросы тонкой (ультраструктурной) организации различных морфологических типов межнейрональных контактов в условиях различных экстремальных воздействий, в частности, синаптических связей в I-IV слоях ОФК у белых лабораторных крыс – важнейших объектов при моделировании различных патологических состояний [2, 3, 4]. Не систематизированы ультраструктурные нарушения двух основных морфологических типов синапсов – аксо-дендритических (ахо-dendritic synapses; ADS) и аксо-соматических (ахо-

somatic synapses; ASS) – в ОФК, а также динамика их восстановления у крыс с малобелковым пищевым рационом после острого звукового воздействия.

Учитывая вышеизложенное, **целью** настоящего исследования явилось электронно-микроскопическое изучение аксо-дендритических и аксо-соматических синапсов в I-IV слоях ОФК половозрелых белых лабораторных крыс в условиях сбалансированной и малобелковой пищи после острого звукового воздействия.

**Материал и методы.** Объектом исследования послужили 64 белых нелинейных половозрелых лабораторных крыс-самцов массой 180,0-230,0 гр. Из них 8 животных содержались в условиях вивария с достаточной шумоизоляцией, адекватными освещением и вентиляцией, без ограничения приема пищи и воды, выводились из опытов параллельно животным контрольной и основной групп эксперимента (интактные животные; «норма»). Остальные 56 крыс в специальной камере-клетке были подвержены непрерывному звуковому воздействию звонком интенсивностью 120 дБ (db) в течении 120 секунд. При подборе фактора-раздражителя за основу были взяты данные о стрессогенности острого звука у крыс [4, 5]. Показателями неустойчивости к острому стрессорному звуковому воздействию послужили появление судорог у животных, избегание освещенных участков клетки, избегание центральных квадратов в клетке, резкое увеличение продолжительности неподвижности, уменьшение числа пищевых болюсов, уменьшение числа вертикальных стоек и вращательных движений головы, хаотичный и продолжительный груминг [4, 5]. По совокупности вышеперечисленных параметров подопытные животные после звукового воздействия были разделены на «стресс-устойчивые» (24) и «стресс-неустойчивые» (32). Далее были сформированы 2 группы по 28 животных в каждой (12 – стресс-устойчивые; 16 – стресс-неустойчивые): 1) «контрольная (с сбалансированным пищевым рационом) и 2) «основная» (с малобелковой пищей).

Животные контрольной группы с момента звукового воздействия до конца опытов (40-е сутки) получали сбалансированную или богатую белками пищу по рецепту, предложенному М. Nikinorov et al. 6 (табл. 1).

**Табл. 1.** Состав пищи у животных контрольной группы опытов (из расчета на 100,0 гр массы животного)

Ингредиенты	Количество
Казеин	20,0 гр
Крахмал	65,0 гр
Растительное масло	5,0 мл
Клетчатка (целлюлоза)	5,0 гр
Комплекс витаминов	1,0 гр
Пищевая соль (NaCl)	0,4 гр

Примечание: Прием воды – без ограничений (свободный доступ к резервуару воды).

В основной экспериментальной группе в пищевом рационе 80,0% белка казеина (16,0 гр из 20,0 гр на 100,0 гр массы животного) было заменено крахмалом и растительной клетчаткой. Следовательно, животные основной группы с момента звукового воздействия до конца опытов - 40-х суток – содержались на бедной белками пище. Как и у животных контрольной группы, ограничений в приеме воды не было.

Животные из эксперимента выводились внезапной массивной воздушной эмболизацией на 10-е, 20-е, 30-е и 40-е сутки после звукового воздействия. Сразу после умерщвления животных извлекались орбито-фронтальные области обоих полушарий головного мозга. При уходе за животными и их умерщвлении были соблюдены принципы декларации Европейского сообщества о животных (86/609/ЕЕС), используемых в экспериментах, а также для других научных целей [7]. Руководствуясь атласами и стереотаксическими картами головного мозга белой лабораторной крысы [1, 8], в каждом случае были обозначены 3 зоны ОФК с обеих сторон: 1) медиальная; 2) вентральная и 3) латеральная. Наряду с гистологическими и иммуногистохимическими анализами, часть материала была взята на электронно-микроскопические исследования. Так, кусочки ПФК объемом 1-2 мм<sup>3</sup> были зафиксированы в смеси 2,5% глутарового альдегида, 2,0% параформальдегида, 4,0% глюкозы и 0,1% пикриновой кислоты на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) с последующей промывкой 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,4) и постфиксацией 1,0% четырехокисью осмия (OsO<sub>4</sub>) и 1,5% красной кровяной солью в течении 1,5 ч. В дальнейшем, после очередной промывки 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,4) кусочки были проведены через ряд спиртов 50<sup>0</sup>-96<sup>0</sup>, ацетона и залиты в эпон-аральдитовую смесь. На основе предварительного (ориентировочного) изучения окрашенных 0,5% метиленовой синью + 0,1% фуксином полутонких срезов (0,5-1,0 мкм) соответствующих

блоков были отобраны наиболее информативные участки и нарезаны из них ультратонкие срезы (50,0-60,0 nm) на микротоме "Leica EM UC7". Последние были окрашены 2,0% уранилацетатом и 0,6% цитратом свинца. Готовые контрастированные ультратонкие срезы были исследованы в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL) при напряжении катода 80,0 kv. При выполнении электронно-микроскопических процедур обработки материала и интерпретации результатов анализа руководствовались общепринятыми научно-методическими изданиями [9, 10].

Интенсивность (выраженность) электронно-микроскопических изменений была оценена визуально-полуколичественно по 4-х бальной шкале: 0,0 - отсутствие изменения; 1,0+ - до 25,0% изученных синапсов; 2,0+ - 26,0-50,0% изученных синапсов; 3+ - 51,0-75,0% изученных синапсов; 4,0+ - более 75,0% изученных синапсов.

**Результаты и их обсуждение.** Полученные авторами изображения по ультраструктурной организации ADS и ASS в ОФК у интактных белых лабораторных крыс, в целом, совпадает с результатами ранее проведенных работ [11, 12]. У экспериментальных животных электронно-микроскопические изменения строения ADS и ASS с той или иной частотой и степенью выраженности выявлены во всех слоях исследованных зон ОФК. Отмечены нарушения тонкой структуры составных частей как пресинаптического, так и постсинаптического полюсов обоих типов синапсов. В синапсах ADS типа максимальная выраженность ультраструктурных изменений присуща синапсам в поверхностном (I, молекулярном), наружном зернистом (II), пирамидном (III) и внутреннем зернистом (IV) слоях во всех изученных зонах ОФК. Дезорганизация ASS же отмечена преимущественно в контактах, постсинаптический полюс которых сформирован телами мелких пирамидных нейронов III слоя, а также пирамидных и звездчатых нейронов IV слоя ПФК. Обнаруженные изменения синапсов касаются как электронной плотности матрикса аксоплазмы, дендроплазмы, перикариона, так и тонкого строения их субструктур. Различные проявления нарушений электронно-микроскопической организации ADS и ASS частично отражены в сводной таблице (табл.2).

**Табл. 2.** Динамика основных электронно-микроскопических нарушений тонкого строения аксо-дендритических (ADS) и аксо-соматических (ASS) синапсов в орбито-фронтальной коре головного мозга у белых лабораторных крыс после острого звукового воздействия

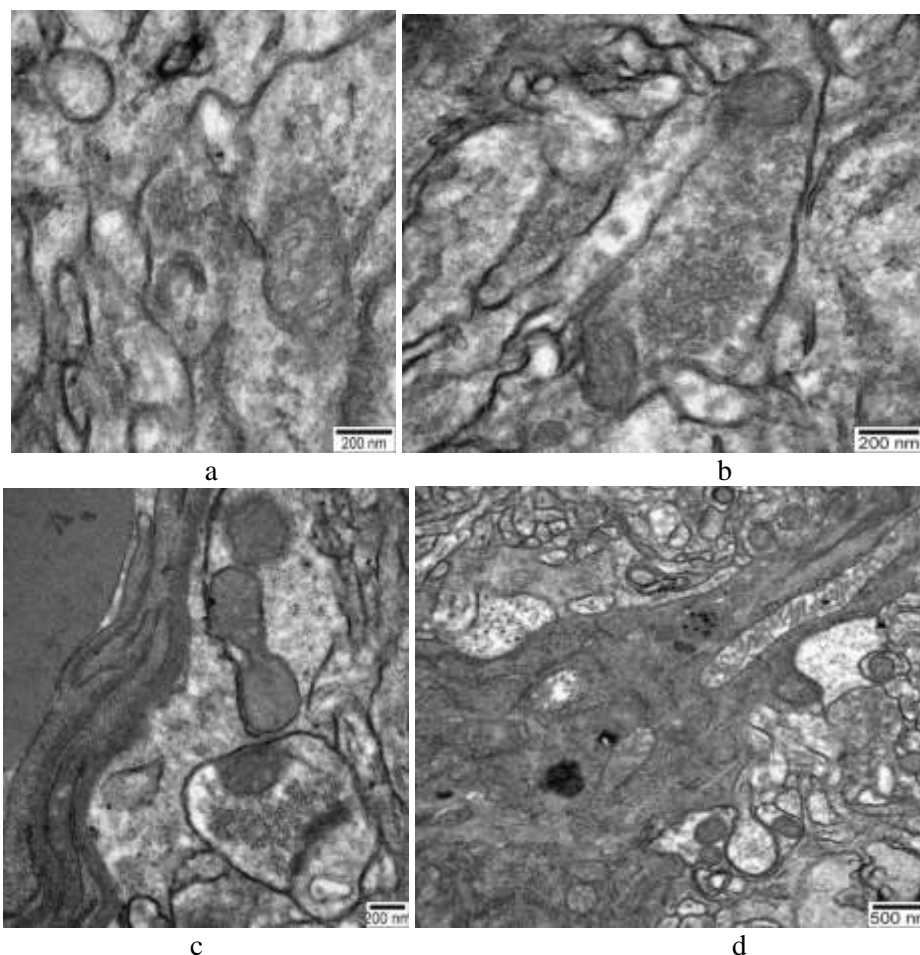
	Контрольная группа (балансированная пища)				Основная группа (малобелковая пища)			
	Стресс-устойчивые		Стресс-неустойчивые		Стресс-устойчивые		Стресс-неустойчивые	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Набухание пресинаптического конца (терминаля) аксона	+	-	++	-	++	+	+++	++
Отек и просветление матрикса пре- и постсинаптических полюсов	+	-	++	+	++	+	+++	++
Агглютинация, перераспределение и частичная деструкция синаптических везикул	++	-	++	+	++++	++	++++	+++
Отек, просветление матрикса и частичная фрагментация крист митохондрий	++	-	++	-	+++	+	++++	++
Сморщивание и уплотнение матрикса митохондрий	+	-	++	+	+++	+	+++	++
Накопление электронно-плотных остаточных микротелец	-	-	-	+	+	++	+	+++
Частичная или точечная фрагментация пресинаптической мембраны	-	-	+	-	++	+	+++	++
Частичная или точечная фрагментация постсинаптической мембраны	-	-	+	+	++	+	+++	+++
Деформация и редукция синаптической щели	-	-	+	-	++	-	++	+
Расширение синаптической щели с отложениями аморфного электронно-плотного субстрата в ней	-	-	+	+	+	+	+	+

Примечание: I – 10-е сутки после острого звукового воздействия; II – 40-е сутки после острого звукового воздействия

Как видно из представленной таблицы, наиболее выраженные ультраструктурные изменения обоих типов синапсов отмечены у животных, содержащихся на малобелковом пищевом рационе после звукового воздействия. Так, у стресс-неустойчивых животных основной группы опытов выявлены сложные сочетания просветления (набухания) и уплотнения матрикса, очаговой деструкции и «темной» дегенерации структур пре- и постсинаптического полюсов, а также размеров, форм, электронной плотности и количества (плотности распределения) синаптических везикул в динамике эксперимента. У животных данной подгруппы начиная с 20-х суток наблюдений обнаружены относительно многочисленные аморфные и кристаллоидные осмиофильные отложения размерами 40,0-380,0 нм. Возможно, указанные отложения представляют собой скопления остаточных телец после аутофагосомии в пре- и постсинаптических структурах, особенно в подмембранной полосе перикариона ASS пирамидных нейронов III слоя ОФК у животных, содержащихся на малобелковой пище после острого звукового воздействия. Вместе с тем, данное предположение нуждается в дальнейшем подкреплении в комплексных исследованиях.

В целом, к 40-м суткам эксперимента, при частичном восстановлении электронной плотности, продолжают оставаться фокусы уплотнения («тёмной» дегенерации) синапсов, особенно – на телах (постсинаптических полюсах) звездчатых и пирамидных нейронов II-IV слоев ОФК.

Электронно-микроскопическая организация аксо-дендритических и аксо-соматических синапсов в различных слоях ОФК у крыс с малобелковым пищевым рационом после острого звукового воздействия частично представлена в рис. 1 (рис. 1).



**Рис. 1.** Электронно-микроскопические особенности синапсов в ОФК у стресс-неустойчивых белых лабораторных крыс на фоне малобелковой пищи после острого звукового воздействия. Набухание (просветление) матрикса, полиморфизм и частичное разрушение синаптических везикул в аксо-дендритических синапсах в I слое вентральной зоны ОФК (а, b); деформация и уплотнение митохондрий, аномальное сосредоточение синаптических везикул в центре пресинаптического полюса, аномально-зернистый матрикс в аксо-дендритическом синапсе в I слое медиальной зоны ОФК (с); мозаичные поля просветления и уплотнения аксо-дендритических и аксо-соматических синапсов, осмиофильные включения на фоне уплотнения и темной дегенерации тела нейрона в I слое вентральной зоны ОФК. а – 10-е сутки, б – 20-е сутки, с – 30-е сутки, d – 40-е сутки эксперимента. Увеличение: см. масштабы на рисунках.

Установлено, что некоторые электронно-микроскопические нарушения строения ASS и ADS в ПФК у стресс-неустойчивых животных основной группы опытов остаются даже спустя 40 суток от начала эксперимента и, скорее всего, приобретают необратимый характер. Функциональные проявления же выявленных остаточных ультраструктурных изменений части ADS и ASS I-IV слоев различных зон ОФК нуждаются в дополнительном комплексном нейрофизиологическом и морфологическом исследовании.

**Выводы.**

- Острое звуковое воздействие инициирует нарушения тонкой организации аксо-дендритических и аксо-соматических синапсов в I-IV слоях различных зон орбито-фронтальной коры белых лабораторных крыс
- Очаговая деструкция тонкой организации отдельных аксо-дендритических и аксо-соматических синапсов у крыс с малобелковой пищей после острого аудиогенного стресса имеет необратимый характер и может рассматриваться как проявление нарушений межнейрональных связей в орбито-фронтальной коре у животных в условиях малобелковой пищи.

**Литература**

- [1]. Fuster J.M. The prefrontal cortex. Fourth Edition. London, Burlington, San Diego, 2008, Academic Press, 410 p.
- [2]. Dalley J.W., Cardinal R.N., Robbins T.W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates // *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2004, V. 28. № 7, p. 771-784.
- [3]. Holmgren C., Harkany T., Svennenfors B., Zilberter Y. Pyramidal cell communication within local networks in layer 2/3 of rat neocortex // *J. Physiol.*, 2003, Vol.551 (Pt. 1), p. 139-153.
- [4]. Формирование поведения животных в норме и патологии. К 100-летию со дня рождения Л.В. Крушинского (2013). Составители И.И. Полетаева, З.А. Зорина, Изд-во «Языки славянских культур», РФФИ, Москва, 2013, 489 с.
- [5]. Кузнецова Г.Д. Аудиогенные судороги у крыс разных генетических линий // *Журнал ВНД*, 1998, т.48, вып.1, с.143-152.
- [6]. Nikinorov M., Urbanek-Karłowska B., Karłowska K. Protein deficient diets. Activity of selected enzymes of protein and carbohydrate metabolism // *Toxicology*. 1973, vol.1, pp. 263-276.
- [7]. Guidelines for accommodation and care of animals (article 5 of the convention) approved by the multilateral consultation. Strasbourg, 15 June 2006, cons. 123 (2006).
- [8]. Watson C., Paxinos G. The Rat Brain in stereotaxis coordinates. London, San Diego: Academic Press, 2007. – 456 p.
- [9]. Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols. Tokyo: Humana Press, 2007, 625 p.
- [10]. Springer Handbook of Microscopy / Ed. P. Hawkes, J.C.H. Spence. – Springer Nature Switzerland AG, 2019, 1543 p.
- [11]. Зайцев А.В. Морфофункциональные свойства разных типов нейронов и их синаптические связи в префронтальной коре макаки и крысы: Дисс. ... докт. биол. наук, Санкт-Петербург, 2013, 278 с.
- [12]. Harris K.M., Weinberg R.J. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain // February 21, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a005587 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012, 31 p.

*M.E. SULTANLY*

**ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF AXO-DENDRITIC AND AXO-SOMATIC SYNAPSE IN THE ORBITO-FRONTAL CORTEX OF WHITE LABORATORY RATS ON A BACKGROUND OF LONG-PROTEIN FOOD AFTER ACUTE SOUND EXPOSURE**

*Research Institute of Physiology. acad. A. Karaev National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan*

**Summary**

**Relevance.** Ultrastructural changes in axo-dendritic synapses (ADS) and axo-somatic synapses (ASS) in the orbitofrontal cortex (OFC) of the brain of white laboratory rats with protein deficiency in food after acute sound exposure remain poorly understood.

**Goal.** Electron-microscopic study of the state of axo-dendritic and axo-somatic synapses in I-IV layers of the OFC of sexually mature white laboratory rats under conditions of balanced and low-protein food after acute sound exposure

**Material and methods.** Experiments were performed on 64 white non-linear sexually mature laboratory male rats weighing 180.0-230.0 g (8 intact, 56 experimental) After a continuous call with an

intensity of 120 db for 120 seconds, 56 rats were divided into 2 groups: food (control - 28) and low-protein food (basic - 28); with 2 subgroups in each of them: stress-resistant (12 animals each) and stress-unstable animals (16 animals each). Water intake is unlimited. The animals were taken out of the experiment on the 10th, 20th, 30th and 40th days after the sound exposure. In parallel with histological and immunohistochemical analyzes, samples of PFC layers I-IV were also studied by transmission electron microscopy.

*Results.* Electron microscopic changes in the structure of ADS and ASS c were found in all layers of PFC. Violations of the fine structure of both the presynaptic and postsynaptic poles were noted. The maximum severity of ultrastructural changes is inherent in the ADS of the surface (I, molecular), outer granular (II), pyramidal (III), and inner granular (IV) layers of PFC. ASS disorganization was noted mainly in contacts, the postsynaptic pole of which was formed by the bodies of small pyramidal neurons of layer III, as well as pyramidal and stellate neurons of layer IV of the PFC. In all periods of observation, violations of fine organization were most pronounced in stress-unstable animals of the main group of experiments, especially on the 10th and 20th days after exposure.

*Conclusion.* Acute sound exposure initiates disturbances in the fine organization of axo-dendritic and axo-somatic synapses in PFC layers I-IV of white laboratory rats. Focal destruction of a part of the noted synapses in rats with low-protein food after acute auditory stress is irreversible and can be considered as a manifestation of disturbances in interneuronal connections in the PFC in animals under conditions of low-protein food.

*Key words:* orbitofrontal cortex, electron microscopy, rat, stress, low-protein food.