

На правах рукописи

Турок Надежда Ефимовна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ
ЦЕНТРАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ ЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-
МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2002

Работа выполнена в Омской государственной медицинской академии (кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии; центральная научно-исследовательская лаборатория), Омском научно-исследовательском центре Сибирского отделения РАМН (лаборатория гипоксических повреждений мозга и нейрореабилитации)

Научный руководитель:	доктор медицинских наук, профессор В.В.Семченко
Научный консультант:	доктор биологических наук, Е.И. Рябчикова
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук, профессор Н.Н.Ильинских кандидат медицинских наук, И.П.Жураковский

Ведущая организация – Санкт-Петербургский государственный университет.

Защита состоится «_____» _____ 2002 г.
в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при
Сибирском государственном медицинском университете МЗ РФ по адресу
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан «_____» _____ 2002 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент

А.В.Герасимов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение особенностей реакции различных отделов головного мозга на повреждение, выявление закономерностей структурно-функциональной реорганизации нейронных сетей и межнейронных взаимоотношений является важной нейробиологической проблемой (Ярыгин Н.Е, Ярыгин В.Н., 1973; Сотников О.С. и др., 1994; Крыжановский Г.Н., 1997; Боголепов Н.Н. и др., 2001; Семченко В.В. и др., 2002). Более глубокое системное изучение реактивных изменений мозга необходимо для теоретического обоснования целенаправленного воздействия на механизмы пато- и саногенеза в процессе реабилитации больных с диффузно-очаговыми повреждениями мозга. В последнее время одной из основных причин повреждения мозга стала черепно-мозговая травма, которая приводит к значительной инвалидизации пострадавших (Лебедев В.В., Крылов В.В., 2000; Kaufman H.H. et al., 1993; Berney J. et al., 1994; Malisano L.P. et al., 1994; Annegers J.F., Coan S.P., 2000; Feinstein A., Rapoport M., 2000; Lye T.C., Shores ET AL., 2000; Wagner A.K. et al., 2000; Boswell J.E. et al., 2002; Leon-Carrion J. et al., 2002; Narayan R.K. et al., 2002).

Важность изучения лимбической системы мозга определяется тем, что она участвует в организации практически всех основных функциональных систем головного мозга и обеспечивает возможность существования таких явлений как память, эмоции, мотивации (Виноградова О.С., 1975). Однако структурно-функциональные механизмы нейропластичности различных уровней организации лимбической системы после черепно-мозговой травмы изучены слабо, что не позволяет понять роль изменений этой системы в патогенезе посттравматической энцефалопатии.

К центральным отделам лимбической системы относятся энторинальная кора, гиппокамп и ядра миндалина (Оленев С.Н., 1987; Шеперд Г., 1987; Андреева Н.Г., Обухов Д.К., 1999). Для гиппокампа при гипоксических и ишемических воздействиях на мозг характерны обширные поля селективного повреждения нейронов путем некроза и апоптоза (Jensen F.E. et al., 1991; Van-Lookeren Campagne M. et al., 1995). В основе селективного повреждения гиппокампа лежат особенности топографии, микроциркуляции, гематоэнцефалического барьера, состояния афферентных входов и молекулярной организации нейронов различных его зон (Suzuki R. et al., 1983; Schmidt-Kastner R., Freund T.F., 1991).

Согласно доминирующей в настоящее время концепции, центральное место в повреждении нейронов мозга при тяжелой черепно-мозговой травме принадлежит прогрессирующим нарушениям внутриклеточного кальциевого гомеостаза, глутаматергической сигнальной трансдукции и окислительному стрессу (Siesjo B.K. et al., 1995;

Koc R.K. et al., 1999; Shohami E. et al., 1999; Katsura K. et al., 2000; Kulkarni M., Armstead W.M., 2000; Lewen A. et al., 2000; Leker R.R., Shohami E., 2002). Вышеназванные нарушения значительно выражены в нейронах гиппокампа и миндалины (Kato H. et al., 1998; Phillips L.L., Reeves T.M., 2000), что и обуславливает высокую чувствительность этих отделов лимбической системы к вторичным посттравматическим нарушениям микроциркуляции мозга (Siesjo B.K., Siesjo P., 1996).

Селективное выпадение нейронов и активация компенсаторно-восстановительных механизмов в постишемическом (Логвинов С.В. и др., 1994; Семченко В.В. и др., 1999) и посттравматическом (Leker R.R., Shohami E., 2002) периоде неизбежно приводят к реорганизации нейронных сетей мозга. Поэтому для выяснения закономерностей реорганизации межнейронных взаимоотношений в лимбической системе особое значение приобретают работы, в которых предполагается комплексное сравнительное изучение нескольких иерархических уровней структурно-функциональной организации данной системы мозга – таких как неокортекс (энторинальная кора), гиппокамп и миндалина.

Выполнение подобных исследований представляется важным для выяснения общебиологических и специфических для конкретных отделов лимбической системы закономерностей реализации деструктивных и компенсаторно-восстановительных процессов в посттравматическом периоде и определения их связи с психоневрологическими проявлениями. Результаты этих исследований также могут послужить базой для разработки патогенетической терапии посттравматической энцефалопатии.

Цель исследования. Выявить закономерности структурно-функциональной реорганизации энторинальной коры, гиппокампа и миндалины белых крыс при тяжелой черепно-мозговой травме.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности реактивных, дистрофических, некробиотических и компенсаторно-восстановительных процессов в нейрональной популяции энторинальной коры, секторов СА1, СА3 и СА4 гиппокампа, медиального и латерального ядра миндалины белых крыс в различные сроки (3, 7, 14, 21 и 30 суток) после тяжелой черепно-мозговой травмы.

2. Определить закономерности реорганизации синаптоархитектоники энторинальной коры и гиппокампа белых крыс в посттравматическом периоде.

3. Выяснить закономерности изменения ориентировочно-исследовательской деятельности и памяти белых крыс в различные сроки после тяжелой черепно-мозговой травмы.

4. Провести корреляционный анализ структурных изменений в центральных отделах лимбической системы (энторинальная кора, гиппокамп и миндалина) и психоневрологических проявлений травматической болезни мозга.

Новизна исследования. Впервые проведен сравнительный системный анализ реактивных, дистрофических, некробиотических и компенсаторно-восстановительных структурных изменений на различных уровнях организации лимбической системы мозга (энторинальная кора, гиппокамп, миндалина) после тяжелой закрытой черепно-мозговой травмы. Результаты этого исследования позволили выявить особенности реактивных и пластических перестроек центральных отделов лимбической системы и определить их роль в структурно-функциональной реорганизации головного мозга в процессе развития посттравматической энцефалопатии. Сопоставление структурных изменений и психоневрологических проявлений посттравматической болезни позволило впервые показать зависимость нарушений памяти при черепно-мозговой травме от численной плотности, реактивного состояния нейронов и синапсов в энторинальной коре, гиппокампе и миндалине.

Теоретическое и практическое значение работы. Показано, что при закрытой черепно-мозговой травме ведущим механизмом нарушения физиологических и появления патологических систем мозга является перестройка межнейронных отношений, вызванная селективным повреждением нейронов и синапсов. Разработаны теоретические положения о полиморфизме, гетерохронности и фазности изменений citoархитектоники и межнейронных отношений в различных отделах лимбической системы после травмы мозга, совокупность которых является новым достижением в изучении механизмов повреждения и пластичности мозга.

Полученные данные послужат фундаментальной базой для целенаправленного изыскания способов регуляции функций мозга, разработки патогенетически обоснованной профилактики и терапии посттравматической энцефалопатии. Фактические данные настоящего исследования и теоретические положения, разработанные на их основе, могут быть использованы в преподавании на кафедрах гистологии, цитологии и эмбриологии, патологической физиологии, патологической анатомии, неврологии и психиатрии высших медицинских учебных заведений при изучении вопросов морфологии и функционировании нервной ткани, органов центральной нервной системы в условиях нормы и диффузно-очаговых повреждений мозга.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Для центральных отделов лимбической системы мозга белых крыс (энторинальная кора, гиппокамп, миндалина) характерны высокий полиморфизм, гетерохронность и фазность структурно-функциональных изменений в посттравматическом периоде, которые проявляются на уровне ее отделов, локальных нейронных сетей, нейронов и синапсов, носят фазный характер и лежат в основе нарушения поведенческих реакций экспериментальных животных.

2. Селективное повреждение и гибель нейронов энторинальной коры, гиппокампа и миндалина приводят к существенной реорганизации цитоархитектоники и межнейронных отношений в лимбической системе мозга при тяжелой черепно-мозговой травме, которые являются морфологической основой изменения характера восприятия, фиксации, хранения и переработки информации в посттравматическом периоде.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на Российской научной конференции с участием стран СНГ «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической морфологии», посвященной 150-летию со дня рождения А.С.Догеля (апрель 2002 г., Томск), 4-й Международной конференции по функциональной нейроморфологии "Колосовские чтения 2002" (май-июнь 2002 г., Санкт-Петербург), VI конгрессе международной ассоциации морфологов (июнь 2002 г., Уфа), заседании Омского отделения ВрНО АГЭ (июнь 2002 г., Омск).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ.

Объем и структура диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания методик исследования, 3 глав собственных исследований, заключения и выводов. Общий объем диссертации составляет 143 страницы машинописи, фактические данные иллюстрированы 36 рисунками, 6 таблицами. Указатель литературы включает 239 источников, из них иностранных - 167. Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальная модель. Исследование проведено на 154 беспородных белых крысах, самцах массой 200-250 г, которым под нембуталовым наркозом моделировалась вращательная сублетальная травма по способу Нобла-Коллипа (Кулагин В.К., 1978). В ходе эксперимента соблюдались все правила работы с лабораторными животными (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.). В результате травмы летальность составила 51,4%. Животные содержались в виварии ЦНИЛ Омской государственной медицинской академии. Эксперимент проведен совместно со ст. науч. сотр. Т.Ф.Соколовой и канд. мед. наук Н.В.Говоровой.

Морфологическое исследование. Для морфологического анализа мозг экспериментальных животных фиксировали путем транскардиальной перфузии смеси 4% раствора параформальдегида, 1% раствора глютарового альдегида, 5% раствора сахарозы на 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,4) в течение 15-20 минут под давлением 90 мм рт.ст. (Боголепов

Н.Н., 1976). Мозг забирали у контрольных (интактных) крыс, через 3, 7, 21 и 30 суток после травмы.

После фиксации мозг извлекали и дофиксировали в аналогичной смеси фиксатора при +4°C. После фиксации материал промывали в фосфатном буфере и готовили светооптические (заклучали в парафин) и электронномикроскопические препараты (заклучали в смесь эпона и аралдита). Для электронномикроскопического исследования мозг предварительно сепарировали с использованием стереотаксических атласов мозга взрослых крыс (Светухина В.М., 1962; Paxinos G., Watson Ch., 1982). Выделяли энторинальную область коры большого мозга, гиппокамп и миндалину. Затем ориентированные в виде пирамид (для экранных образований) кусочки мозга (по 5 кусочков на случай) обрабатывали для осмий-уранилацетат-цитрат свинцового контрастирования.

Для электронной микроскопии использовали ультратонкие (70-100 нм), а для световой - тонкие фронтальные срезы. Срезы для светооптического исследования помещали на предметные стекла и окрашивали 0,1% толуидиновым синим.

Светооптическое исследование. Проводилось для общей характеристики цитоархитектоники и выявления общей численной плотности и плотности реактивно, дистрофически и некробиотически измененных нейронов в различных слоях энторинальной коры, пирамидных нейронов в секторах CA1, CA3 и CA4 гиппокампа, латеральном и медиальном ядрах миндалины. Численную плотность нейронов в единице плоскости среза (N_s) определяли на фронтальных срезах при увеличении $\times 40$ с помощью микрометра (окуляр $\times 15$). На площади среза 126660 мкм^2 подсчитывали количество нормохромных, гиперхромных несморщенных, гиперхромных сморщенных, гипохромных нейронов и клеток-теней (Miller M.W., Potempa G., 1990). С помощью микрометра определяли продольный (D1) и поперечный (D2) диаметры тела нейронов. Средний диаметр тела нейрона (D_{cp}) рассчитывали как: $(D1+D2)/2$. D_{cp} использовался в формуле A.Abercrombie (1946) для определения численной плотности нейронов в единице объема (N_v). N_v в 1 мм^3 СМК (при $N_s/1 \text{ мкм}^2$) рассчитывалась как: $N_v = [N_s * T / (D_{cp} + T)] * 10^9$ (Блинков С.М., Глезер И.И., 1964).

Электронномикроскопическое исследование. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме "Ultracut-E" (фирма Reichert-Jung), помещали на сетки без подложки и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр и фотографирование ультратонких срезов производили на электронном микроскопе "Hitachi-600H". Часть материала (25 крыс) была обработана с использованием методики, принятой в лаборатории ультраструктуры и патоморфологии института молекулярной биологии научного центра «Вектор» МЗ РФ (зав. лабораторией доктор биол. наук Е.И.Рябчикова).

Исследование осмированных препаратов проводилось для общей оценки состояния нейропиля, цитоплазмы и ядер клеток. Для этого в каждом случае (срок, $n=5$) анализировали по 50 полей зрения нейропиля, отснятых при просмотре материала в электронном микроскопе при увеличении 7000-25000. Определение численной плотности синаптических контактов проводили на электроннограммах при конечном увеличении 30000 и пересчитывали на 100 мкм^2 нейропиля. Для количественной оценки численной плотности синаптических контактов нами использовались только поперечные профили контактов, где четко верифицируются пре- и постсинаптические зоны. Определяли общую численную плотность синапсов и содержание деструктивно измененных межнейронных контактов [Семченко В.В. и др., 1995; Степанов С.С., 1999; Dyson S.E., Jones D.G., 1984; Calverley R.K.S., Jones D.G., 1987; Aubert I. et al., 1995; Sur C. et al., 1995; Geinisman Y. et al., 1996].

Кроме деления синапсов по форме контакта все синапсы по диаметру контакта подразделялись на мелкие ($<100 \text{ нм}$), средние ($101-400 \text{ нм}$), крупные ($401-700 \text{ нм}$) и очень крупные ($> 700 \text{ нм}$) (Семченко В.В. и др., 1995).

Численная плотность синаптических контактов относительно единицы площади среза (N_s) пересчитывалась на 100 мкм^2 нейропиля и выражалась как средняя арифметическая \pm ошибка средней арифметической ($M \pm m$) (Степанов С.С., Семченко В.В., 1995; Mayhew T.M., 1979, 1992; Dyson S.E., Jones D.G., 1984).

Определение психоневрологического статуса. Ориентировочно-исследовательскую деятельность и эмоциональность животных изучали с помощью теста открытого поля (Буреш Я. и др., 1991).

Для выявления нарушений памяти использовали условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) болевого раздражения по модифицированной методике Я.Буреш и др. (1991). Экспериментальная установка для выработки УРПИ состояла из двух отсеков. Первый – светлый, безопасный, под потолком которого была расположена электрическая лампочка. Второй – темный, опасный, пол состоял из металлических прутьев, подключенных к источнику электрического тока. Крыса, стремясь скрыться от света из первой камеры перебежала во вторую – темную, проем за ней закрывался, на пол подавалось напряжение и животное подвергалось трехкратному электрокожному воздействию. При повторном помещении крысы в светлый отсек животное, помня о боли, не покидало его в течение 3 минут. Таким образом УРПИ считалось выработанным (Буреш Я. и др., 1991; Ерениев С.И. и др., 1993; Степанов С.С. и др., 1999). Закономерности нарушений памяти изучались в динамике на 1, 3, 7, 14, 21 и 30-е сутки посттравматического периода. Контрольную группу составили 20 здоровых белых крыс.

Полученные в работе количественные данные обработаны с помощью общепринятых в медико-биологических исследованиях методов

статистического и корреляционно-регрессивного анализа (Венчиков А.И. и др., 1974; Автандилов Г.Г., 1980; Лакин Г.Ф., 1980; Славин М.Б., 1980) с привлечением программ "EXCEL" и "Statistica". Для определения достоверности отличий результатов в разных экспериментальных группах применяли статистический t-критерий Стьюдента. Все эксперименты и исследования выполнены на базе Омской государственной медицинской академии (ЦНИЛ, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии) и частично в лаборатории ультраструктуры и патоморфологии института молекулярной биологии научного центра «Вектор» МЗ РФ (зав. лабораторией доктор биол. наук Е.И.Рябчикова).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ЦЕНТРАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ ЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

Энторинальная кора

В энторинальной коре реактивные, дистрофические и некробиотические изменения нейронов имели диффузно-очаговый характер, а степень их выраженности зависела от длительности посттравматического периода.

Для необратимо измененных нейронов были характерны гидропическая дистрофия с выраженной вакуолизацией цитоплазмы, распад ядра, ядрышка, «клетки-тени», гиперхромные сморщенные клетки с вакуолизацией и без таковой, нейронофагия. Однако, преобладали обратимые дистрофические изменения нейронов (острое набухание нейронов, гидропическая дистрофия нервных клеток с умеренной вакуолизацией цитоплазмы, очаговый хроматолиз, гиперхроматоз и гомогенизация цитоплазмы). Очаговый хроматолиз проявлялся чаще периферическим или сегментарным растворением хромофильной субстанции, что трактовалось как результат длительного раздражения и функционального напряжения нейрона.

Особенностью энторинальной коры большого мозга было очень высокое содержание клеток-теней в первые 7 суток после травмы. Так, в слое V энторинальной коры их содержание через 3 суток после травмы составило 32,8, 7 суток – 26,4, 14 суток – 13,2, 21 сутки – 14,8, а через 30 суток – 4,5%. Динамика изменения содержания гиперхромных нейронов имела противоположную направленность: содержание гиперхромных несморщенных нейронов увеличивалось от 19,8 (3-и сутки) до 45,5% (14-е

сутки), затем снижалось до 40,7% (30-е сутки), а содержание сморщенных прогрессивно увеличивалось от 1,7 (3-и сутки) до 18,4% (30-е сутки).

Таким образом, в посттравматическом периоде в энторинальной коре большого мозга белых крыс были выявлены диффузно-очаговые реактивные, дистрофические и некробиотические изменения нейронов. Основными типами дистрофических и некробиотических изменений нейронов были острое набухание, тяжелое клеточное поражение, ишемическое поражение и атрофия клеток.

Несмотря на значительные реактивные изменения нейронов энторинальной коры общая численная плотность нервных клеток (в единице объема - 1 мм^3) в течение 3 суток после травмы достоверно не изменялась. В последующие сутки посттравматического периода численная плотность нейронов прогрессивно снижалась во всех слоях коры. Через 30 суток в слое II редуцировалось 25,0 ($P < 0,05$), в слое III – 37,9 ($P < 0,05$), слое V – 30,0 ($P < 0,05$) и в слое VI – 37,3% ($P < 0,05$) нейронов. При этом преобладания редукции содержания нейронов в мелкоклеточных комплексах не выявлено.

Гиппокамп

Во всех секторах гиппокампа в результате травмы через 3 суток происходило увеличение содержания несморщенных и сморщенных гиперхромных нейронов, клеток-теней. Однако динамика изменения содержания этих клеток в течение 30 суток (3-30-е сутки) после травмы значительно отличалась по секторам гиппокампа. В секторе СА1 высокое (7,5-9,5% от всех пирамидных нейронов) содержание клеток-теней сохранялось в течение 21 суток, а в секторах СА3 и СА4 – на протяжении 7 суток (4,8-6,7 и 8,0-9,7% соответственно). Содержание сморщенных гиперхромных нейронов прогрессивно увеличивалось на протяжении всего срока наблюдения в секторах СА1 (3,7 → 4,2 → 10,8 → 24,6 → 21,3%) и СА3 (23,9 → 26,1 → 33,8 → 35,7 → 40,0%), а в секторе СА4 содержание этих нейронов менялось волнообразно (15,4 → 27,2 → 22,7 → 16,8 → 24,0%). Общим для всех секторов гиппокампа было высокое содержание реактивно и деструктивно измененных нейронов в отдаленном периоде после травмы (30 суток). Через 30 суток в секторе СА1 таких нейронов было 56,7, в секторе СА3 - 67,9 и в секторе СА4 - 55,5%.

Общая численная плотность пирамидных нейронов в вышеуказанных секторах гиппокампа в посттравматическом периоде прогрессивно снижалась начиная с 7-х суток. В секторе СА1 через 30 суток после травмы дефицит нейронов составил 29%, в секторе СА3 – 15,3%, а в СА4 - 33,6%.

Таким образом, данные морфометрического исследования свидетельствуют о том, что реакция на травму различных секторов

гиппокампа значительно отличается. Максимально повреждаются пирамидные нейроны сектора СА 4, минимально – СА3.

Миндалевидный комплекс

Для медиального и латерального ядер миндалевидного комплекса характерны все вышеописанные качественные изменения нейронов. Однако количественное выражение реактивных, дистрофических и некробиотических изменений в этом отделе лимбической системы иное, чем в энторинальной коре и гиппокампе. Для миндалины в посттравматическом периоде было характерно менее выраженное содержание необратимо измененных по гипер- и гипохромному типу нейронов.

Так содержание гиперхромных сморщенных нейронов увеличивалось с 3,5 (3-и сутки) до 18,7% (30-е сутки), а клеток-теней – с 3,2 (3-и сутки) до 8,1% (7-е сутки).

Менее выраженные реактивные изменения нейронов миндалины соответствовали и менее значительной редукции общей численной плотности этого отдела лимбической системы. Численная плотность нейронов в медиальном ядре в течение 30 суток снижалась на 24,0% ($P < 0,01$), а в латеральном ядре достоверно не изменялась (7,5%, $P > 0,05$).

Таким образом, в различных отделах лимбической системы в силу изначально неодинакового уровня реактивности и повреждения нейронов во время травмы реорганизация межнейронных взаимоотношений в посттравматическом периоде имела свои особенности. Максимально селективное выпадение нейронов проявлялось в слоях III и VI энторинальной коры, в секторе СА4 гиппокампа, в меньшей степени – в слое V энторинальной коры, секторе СА1 гиппокампа, слое II энторинальной коры, медиальном ядре миндалины, секторе СА3 гиппокампа и незначительно – в латеральном ядре миндалины. Через 30 суток после травмы дефицит нейронов (по степени возрастания) составил: в латеральном ядре миндалины – 7,5, секторе СА3 гиппокампа – 15,3, медиальном ядре миндалины – 23,5, слое II энторинальной коры - 25,0, секторе СА1 гиппокампа - 29,0, слое V энторинальной коры - 30,0, секторе СА4 гиппокампа - 33,6, слое VI энторинальной коры – 37,3 и слое III энторинальной коры – 37,9%.

Более значительное повреждение неокортекса, что нетипично для ишемического повреждения мозга (Beck T. et al., 1993), связано с особенностями использованной экспериментальной модели, где животные получали множественные удары в голову, которые оказались причиной первичного мелкоочагового механического повреждения прежде всего коры большого мозга, так как она располагается близко к костям черепа. В пользу этого свидетельствуют наши данные о появлении мелких

некротических очагов и значительном (32,8%) содержании клеток-теней в энторинальной коре в первые трое суток после травмы.

Таким образом, все это подтверждает сложный генез повреждения головного мозга при данной модели политравмы. Для отделов мозга, расположенных ближе к месту удара (неокортекс) большое значение приобретают механизмы непосредственного первичного механического повреждения. В более отдаленных отделах мозга превалируют механизмы вторичного (ишемического) повреждения, связанные с посттравматическим нарушением микроциркуляции. В этих отделах мозга мы не выявили значительного очагового увеличения содержания клеток-теней. В них преобладало прогрессирующее диффузное увеличение количества гиперхромных и гиперхромных сморщенных нейронов, что свидетельствует об ишемической природе их появления (Ярыгин Н.Е., Ярыгин В.Н., 1973; Боголепов Н.Н., 1979; Туманов В.П., 1983; Semchenko V.V. et al., 1996).

Ультраструктурная характеристика капилляров нейронов и межнейронных синапсов

Во всех отделах лимбической системы в раннем посттравматическом периоде (1-3-и сутки) были выявлены ультраструктурные признаки нарушения микроциркуляции, которые проявлялись: 1) значительным очаговым сужением просвета капилляров в результате перикапиллярного отека отростков астроцитов, 2) образованием складок, микровыростов поверхности эндотелиоцитов, 3) вакуолизацией и набуханием цитоплазмы эндотелиоцитов, 4) стазом форменных элементов крови, их адгезией к эндотелиальным клеткам и тромбообразованием. Расширенные просветы микрососудов были заполнены агрегированными, сладжированными и агглютинированными клетками крови.

Изменения нейронов характеризовались мозаичностью проявлений реактивных, дистрофических, некробиотических и компенсаторно-восстановительных процессов, значительной вариабельностью степени и локализации этих изменений.

Реактивные изменения были обратимыми и структурно проявлялись набуханием тел нейронов, частичным хроматолизом цитоплазмы, деструкцией митохондрий и уменьшением их общего количества, увеличением объема ядрышка и степени складчатости мембраны нейронов, уменьшением количества полирибосом, варикозным расширением дендритов, появлением различных вакуолей во всех отделах нейрона.

Основными структурными типами дистрофически и некробиотически измененных нейронов были гипохромные, гиперхромные несморщенные, сморщенные (пикноморфные) нейроны и клетки-тени.

Необратимые изменения ультраструктуры нейронов были характерны только для сморщенных гиперхромных нейронов и клеток-теней.

В отдаленном посттравматическом периоде (14-30-е сутки) дистрофически измененные нейроны во всех изученных отделах лимбической системы характеризовались активацией восстановительных процессов. Об этом свидетельствовало появление признаков репаративных изменений в этих нейронах, которые проявлялись восстановлением тинкториальных свойств цитоплазмы, гиперплазией и гипертрофией субклеточных элементов (митохондрии, лизосомы, рибосомы), гипертрофией сомы, ядра, увеличением ядерно-цитоплазматического отношения за счет образования инвагинаций ядерной мембраны, количества ядрышек, дендритных ветвей, усилением степени арборизации дендритного дерева.

На уровне межнейронных синапсов реактивные изменения проявлялись агрегацией синаптических пузырьков (СП) в центре пресинаптических отростков с отдалением пузырьков от пресинаптической мембраны, появлением вакуолей и уменьшением осмиофильного содержания синаптических пузырьков.

Более чувствительным отделом синапса к травматическому воздействию являлась пресинаптическая терминаль. Терминаль набухала, просветлялась, СП агглютинировались, распадались, появлялись различные вакуоли, свидетельствовавшие о дегенерации и последующей реорганизации фосфолипидов (светлый тип деструкции).

Более устойчивым образованием синапса к травматическому воздействию являлось постсинаптическое уплотнение (ПСУ). Структура ПСУ сохранялась даже после полной деструкции терминали и являлась, вероятно, зоной постсинаптического нейрона, где происходило восстановление и remodelирование межнейронных отношений после гибели части пресинаптических нейронов.

Признаками длительного нарушения межнейронных взаимоотношений после травмы было наличие синапсов с выраженной вакуолизацией. Кроме того, в цитоплазме образующих синапсы аксонов и дендритов появлялось большое количество мультивезикулярных тел, что свидетельствовало об усилении процессов дендритного фагоцитоза и утилизации поврежденных фрагментов нейронов.

Структурные проявления светлого типа деструкции выявлялись во всех изученных отделах лимбической системы. Именно за счет элиминации этих синапсов происходила редукция общей численной плотности синаптических контактов в посттравматическом периоде (таблица 1). В остром периоде после травмы (3-и сутки) деструкции подвергались преимущественно мелкие и средние контакты. В результате этого относительное содержание крупных и очень крупных контактов увеличивалось (таблица 2).

Максимальное снижение численной плотности межнейронных контактов было отмечено в энторинальной коре на 3-7-е сутки посттравматического периода (24,5-26,4%). В гиппокампе и миндалине в этот период редуцировалось содержание 20,3-20,8% синапсов соответственно (таблица 1). В более отдаленном периоде (21-30-е сутки) происходило восстановление численной плотности синапсов во всех изученных отделах лимбической системы за счет появления большого количества мелких и средних синаптических контактов (таблица 2). Это свидетельствовало о длительном (до 14-х суток) преобладании в посттравматическом периоде процессов деструкции синапсов над компенсаторно-восстановительными процессами.

Таблица 1

Общая численная плотность синапсов в молекулярном слое энторинальной коры, сектора СА1 и медиальном ядре миндалины белых крыс в различные сроки посттравматического периода ($M \pm m$)

Срок исследования	Численная плотность синапсов на 100 мкм ² нейропиля		
	энторинальная кора	гиппокамп	миндалина
Контроль	23,5±1,5	53,8±3,5	58,7±4,2
3 сут	17,7±1,0*	43,6±1,8*	48,2±2,0*
7 сут	17,3±0,9**	42,9±1,8**	47,4±2,1*
14 сут	18,8±0,8*	49,9±1,0	46,5±1,5**
21 сут	19,1±1,1*	50,2±1,2	54,2±3,2
30 сут	21,8±1,2	54,8±1,1	53,8±4,1

Примечание: достоверность различий рассчитана в сравнении с контролем.
* - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$.

Как правило, крупные контакты принадлежали к синапсам, имеющим более сложную форму, большее количество активных зон, СП и митохондрий. Увеличение относительного содержания крупных контактов сопровождалось и повышением содержания перфорированных контактов (на 10-12%; $P < 0,05$). Крупные и, особенно, перфорированные синаптические контакты обладают высокой эффективностью, а увеличение их содержания свидетельствует о значительной структурно-функциональной реорганизации межнейронных отношений (Боголепов Н.Н., 1975; Семченко В.В. и др., 1995, 1999; Jones D.G., Calverley R.K.S., 1991; Geinisman Y., 1993; Jones D.G.; Harris R.J., 1995; Geinisman Y. et al., 1996; Boroojerdi B. et al., 2001; Craig A.M., Boudin H., 2001; Poirazi P., Mel B.W., 2001; Sun J.Y., Wu L.G., 2001).

Таблица 2

Численная плотность мелких, средних, крупных и очень крупных синапсов в молекулярном слое энторинальной коры, сектора СА1 и медиальном ядре миндалины белых крыс в различные сроки посттравматического периода ($M \pm m$)

Срок исследования и размер синапса	Численная плотность синапсов на 100 мкм^2 нейропиля		
	энторинальная кора	гиппокамп	миндалина
Контроль			
<100 нм	$2,6 \pm 0,2$	$15,5 \pm 0,6$	$13,8 \pm 1,3$
101-400 нм	$11,0 \pm 0,6$	$22,1 \pm 1,2$	$24,7 \pm 2,1$
401-700 нм	$8,5 \pm 0,7$	$11,6 \pm 0,8$	$15,4 \pm 0,9$
> 700 нм	$1,4 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,3$
3 сут			
<100 нм	$1,4 \pm 0,4^*$	$7,8 \pm 0,6^{**}$	$8,7 \pm 0,9^*$
101-400 нм	$5,5 \pm 0,4^{**}$	$13,4 \pm 1,1^{**}$	$14,6 \pm 0,6^{**}$
401-700 нм	$9,0 \pm 0,6$	$18,9 \pm 1,2^*$	$21,5 \pm 1,5^*$
> 700 нм	$1,8 \pm 0,3$	$3,5 \pm 1,4$	$3,4 \pm 0,4$
7 сут			
<100 нм	$1,2 \pm 0,2^*$	$7,2 \pm 0,5^{***}$	$8,0 \pm 0,8^*$
101-400 нм	$6,8 \pm 0,5^{**}$	$12,5 \pm 0,8^{**}$	$14,5 \pm 1,4^{**}$
401-700 нм	$7,2 \pm 0,7$	$20 \pm 2,4^{**}$	$21,6 \pm 2,2^*$
> 700 нм	$2,3 \pm 0,4^*$	$3,2 \pm 0,5^*$	$3,3 \pm 0,4$
14 сут			
<100 нм	$0,9 \pm 0,2^{**}$	$9,2 \pm 0,6^*$	$7,4 \pm 1,4^{**}$
101-400 нм	$6,4 \pm 0,7^{**}$	$17,5 \pm 1,4^*$	$14,2 \pm 1,8^{**}$
401-700 нм	$8,7 \pm 0,9$	$19,9 \pm 1,4^*$	$21,8 \pm 1,9^*$
> 700 нм	$2,8 \pm 0,6^*$	$3,3 \pm 0,6$	$3,1 \pm 1,0$
21 сут			
<100 нм	$1,8 \pm 0,2^*$	$9,5 \pm 0,6^*$	$10,7 \pm 1,2^*$
101-400 нм	$9,4 \pm 0,7$	$20,5 \pm 1,1$	$19,3 \pm 1,5^*$
401-700 нм	$6,2 \pm 0,8$	$16,9 \pm 0,8^*$	$22,1 \pm 2,2^*$
> 700 нм	$1,7 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,2^*$	$2,1 \pm 0,4^*$
30 сут			
<100 нм	$2,1 \pm 0,4$	$13,4 \pm 0,8$	$10,6 \pm 1,1$
101-400 нм	$11,6 \pm 1,3$	$22,6 \pm 1,4$	$21,2 \pm 1,4$
401-700 нм	$6,4 \pm 0,5$	$16,7 \pm 1,3^*$	$20,0 \pm 0,9^*$
> 700 нм	$1,7 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,5^*$	$2,0 \pm 0,4^*$

Примечание: достоверность различий рассчитана в сравнении с контролем.

* - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$.

Таким образом, по изменению общей численной плотности синапсов и содержания различных типов синаптических контактов можно полагать, что в посттравматическом периоде меняется внутренняя организация межнейронных взаимоотношений, характер и степень конвергентных и дивергентных взаимоотношений клеточных популяций, эффективность активно функционирующих синапсов. Реализация реактивной и репаративной синаптической пластичности приводит к реорганизации межнейронных отношений во всех изученных отделах лимбической системы. Это является структурной основой изменения интегративно-пусковой деятельности мозга в посттравматическом периоде и, вероятно, при определенных условиях может стать основой формирования очагов патологической активности на базе нейронных сетей, содержащих низкопороговые нейроны (гиппокамп, миндалина), и даже патологических (типа эпилептической) систем мозга.

ИЗМЕНЕНИЯ ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА

Посттравматическая энцефалопатия проявлялась выраженными волнообразными изменениями показателей ориентировочно-исследовательской и эмоциональной составляющих поведения животных. Тестирование животных через 1 сутки после травмы выявило снижение показателей ориентировочно-исследовательской активности на 42,9% ($P < 0,05$) по сравнению с контролем. Через 3 суток после травмы структура поведения крыс изменилась. Животные были возбуждены и проявляли высокую двигательную активность. Активация поведения происходила за счет увеличения как горизонтального, так и вертикального компонентов. Продолжительность латентного периода снизилась на 30,6% ($P < 0,01$) по сравнению с предыдущим сроком. Данное увеличение двигательной активности свидетельствовало о состоянии возбуждения животного и сохранении высокого уровня эмоциональной напряженности.

Через 7 суток большинство элементов исследовательского поведения животных, перенесших травму, соответствовало показателям группы контроля. Однако, как и в предыдущие сроки, достижение целесообразного поведенческого результата было затруднено, что подтверждалось частым переключением ориентировочно-исследовательской деятельности на другой вид моторной активности – груминг.

Через 14 суток после травмы экспериментальные животные вновь впадали в пассивность. Число пробежек и заглядываний в норки стало на 50,9% ($P < 0,01$) ниже, чем у интактных животных. В этот период травмированные крысы на 60,0% ($P < 0,01$) дольше, чем через 3 суток, находились в состоянии неподвижности.

Через 21 сутки показатели, входящие в фактор «исследовательская активность» восстанавливались до контрольного уровня. При этом уровень

«тревожности» крыс возрастал. Ориентировочно-исследовательские реакции в 3,4 раза чаще ($P < 0,001$), чем в контроле, сменялись таким видом деятельности, как чистка.

Только через 30 суток после травмы большинство показателей исследовательской деятельности крыс, перенесших травму, соответствовало контролю. Однако нарушения в эмоциональной составляющей поведения животных оставались по-прежнему высокими. Об этом свидетельствовало превышение в данный период контрольного уровня интенсивности груминга в 3,5 раза ($P < 0,001$).

Снижение ориентировочно-исследовательской активности и усиление отрицательных эмоциональных реакций в посттравматическом периоде свидетельствовали о том, что животные не могли построить адекватную форму реагирования на окружающую обстановку для избегания опасности.

Тяжелая механическая травма оказывала разрушительное действие на память. Это проявлялось снижением объема ранее сформированной памяти, сокращением сроков хранения энграммы долговременной памяти и ускорением процессов угасания выработанного рефлекса. Расстройства функции памяти наблюдались не только в ближайшие от нанесения травмы сроки, но и в более отдаленном периоде. Изменения мнестической функции мозга носили фазный характер с резким ухудшением показателей в первые сутки, частичным их восстановлением на 3-и сутки, повторным угнетением УРПИ на 7-е сутки и полным угасанием сформированного навыка к 21-м суткам. Естественное угасание сформированного навыка возникало только к 30-м суткам (таблица 3).

Таблица 3

Время естественного и посттравматического угасания условного рефлекса пассивного избегания у крыс ($M \pm m$)

Срок исследования	Угасание условного рефлекса пассивного избегания, сек		P [#]
	контроль	травма	
1 сут	176,5±3,7	34,3±7,8	<0,001
3 сут	176,2±1,8	114±27,9**	<0,01
7 сут	173,9±2,4	45,7±24,9	<0,001
14 сут	169,5±3,5	72,2±25,4	<0,01
21 сут	118,8±9,5*	16,0±3,6*	<0,001
30 сут	36,1±6,2**	17,3±4,0*	<0,05

Примечание: достоверность различий рассчитана в сравнение с контролем (* - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$) и между группами животных с травмой и без нее (P[#]).

Степень выраженности нарушений извлечения из памяти параметров значимых стимулов, в том числе и параметров полезного результата действия различных функциональных систем на этапах посттравматического периода совпадала с динамикой снижения поведенческих реакций по реализации моторной программы, обеспечивающей достижение запланированного результата. В результате этого в посттравматическом периоде развивались длительные прогрессивные нарушения процессов восприятия и оценки окружающей действительности, мышления и поведения, что значительно затрудняло психоневрологическую реабилитацию травмированных животных.

Указанное выше соответствует данным литературы о том, что любые ишемические и гипоксические воздействия на мозг, приводящие к повреждению и гибели нейронов, сопровождаются выраженными изменениями высшей нервной деятельности (Степанов С.С. и др., 1999; Kiyota Y. Et al., 1991; Babcock A.M. et al., 1993; Nunn J.A. et al., 1994).

Расстройства функции памяти положительно коррелировали со степенью уменьшения численной плотности нейронов ($r = 0,62-0,70$) и синапсов ($r = 0,48-0,70$) во всех изученных отделах лимбической системы.

Однако, высшая нервная деятельность зависела не только от численной плотности нейронов, но и от их состояния. Посттравматическое нарушение памяти отрицательно коррелировало с уровнем содержания нормохромных нейронов ($r = - 0,87-0,93$) и положительно – с содержанием гиперхромных несморщенных ($r = 0,72-0,83$) и сморщенных нейронов ($r = 0,63-0,77$). Следовательно, на сохранении энграмм памяти отрицательно сказывалось увеличение количества реактивно измененных гиперхромных нейронов.

Какой-либо корреляционной зависимости между содержанием клеток-теней и состоянием высшей нервной деятельности не выявлено. Относительное содержание клеток-теней в посттравматическом периоде сначала (3-и сутки) нарастало, а затем снижалось. Изменения памяти имели иную динамику – сначала ухудшение (1-е сутки), затем улучшение (3-и сутки), вновь ухудшение (7-е сутки) и улучшение (14-30-е сутки).

Общая двигательная активность животных не имела достоверной корреляционной зависимости от изученных морфометрических показателей структурно-функционального состояния нейронов.

Таким образом, нами выявлена зависимость высшей нервной деятельности животных, перенесших тяжелую черепно-мозговую травму, от реактивного состояния и численной плотности нейронов и синапсов в центральных отделах лимбической системы. Степень этой зависимости, судя по показателям коэффициента корреляции, была несколько больше связана с состоянием нейронов гиппокампа и медиального ядра миндалина. Сохранение энграмм памяти в большей степени зависело от реактивного состояния нейронов и реорганизации синаптоархитектоники, чем от численной плотности нейронов и синапсов.

Показатели, характеризующие ориентировочно-исследовательскую деятельность животных, на протяжении всего изученного посттравматического периода не имели корреляционной зависимости от численной плотности нейронов, синапсов и от реактивного состояния нейронов. Только в первые 7 суток общая двигательная активность положительно коррелировала ($r = 0,74$) с содержанием нормохромных нейронов. Это свидетельствовало о том, что увеличение содержания реактивно измененных нейронов после травмы в этот период являлось причиной нарушения ориентировочно-исследовательской деятельности животных. В более отдаленном периоде происходило, вероятно, замещение функции поврежденных нейронов за счет активации и гипертрофии нормохромных нейронов. Это позволило частично восстановить ориентировочно-исследовательскую деятельность уже через 7-14 суток после травмы.

ВЫВОДЫ

1. Для лимбической системы мозга белых крыс (энторинальная кора, гиппокамп, миндалина) характерны высокий полиморфизм и гетерохронность структурно-функциональных изменений в посттравматическом периоде, которые проявляются на уровне ее отделов, локальных нейронных сетей, нейронов и синапсов, носят фазный характер и лежат в основе нарушения поведенческих реакций.

2. На уровне энторинальной коры, гиппокампа и миндалины структурно-функциональные изменения выявляются в виде диффузно-очаговых реактивных, деструктивных и компенсаторно-восстановительных процессов. Реорганизация синаптоархитектоники направлена на усиление эффективности функционирующих синапсов и нейронных сетей.

3. Максимальное содержание (40,0%) необратимо измененных сморщенных гиперхромных нейронов определяется в секторе СА3 гиппокампа на 30-е сутки, а клеток-теней (32,8%) – в энторинальной коре на 3-и сутки после травмы.

4. По степени редукции численной плотности нейронов к 30-м суткам после травмы изученные отделы лимбической системы мозга в посттравматическом периоде располагаются следующим образом: латеральное ядро миндалины (7,5%), сектор СА3 гиппокампа (15,3%), медиальное ядро миндалины (23,5%), слой II энторинальной коры (25,0%), сектор СА1 гиппокампа (29,0%), слой V энторинальной коры (30,0%), сектор СА4 гиппокампа (33,6%), слой VI (37,3%) и слой III энторинальной коры (37,9%).

5. Реорганизация синаптоархитектоники центральных отделов лимбической системы в посттравматическом периоде проявляется изменениями численной плотности и структурно-функционального состояния синапсов. Основными структурными механизмами

синаптической пластичности, обеспечивающей компенсаторное повышение эффективности межнейронной интеграции, является активация сохранившихся синапсов, гиперплазия структурных компонентов пре- и постсинаптической зоны функционально активных синапсов, гипертрофия, расщепление и рекомбинация межнейронных контактов с усложнением синаптического устройства по конвергентному или дивергентному типам.

6. Реорганизация межнейронных отношений в центральных отделах лимбической системы при тяжелой закрытой черепно-мозговой травме сопровождается выраженными длительными изменениями ориентировочно-исследовательской и высшей нервной деятельности (память) экспериментальных животных. Сохранение энграмм памяти в большей степени зависит от реактивного состояния нейронов ($r = 0,63-0,93$) и реорганизации синаптоархитектоники, в меньшей – от численности плотности нейронов ($r = 0,62-0,70$) и синапсов ($r = 0,48-0,70$).

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ В ПРАКТИКУ

Данные о закономерностях структурно-функциональной реорганизации центральных отделов лимбической системы в посттравматическом периоде внедрены в учебный процесс на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии и кафедре медицинской биологии с основами генетики и экологии Омской государственной медицинской академии при изучении нервной ткани и гистофизиологии органов нервной системы, использованы при написании монографии Г.В.Алексеевой, А.М.Гурвича и Семченко В.В. «Постреанимационная энцефалопатия (патогенез, клиника, профилактика и лечение)»: 2-е изд., доп. и перераб. – Омск: Омская областная типография, 2002. – 152 с.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Турок Н.Е. Структурные особенности реакции различных секторов гиппокампа белых крыс на политравму // IV Международная конференция по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения 2002». – СПб., 2002. – С.288-289.

2. Соколова Т.Ф., Турок Н.Е., Хижняк А.С., Говорова Н.В. Нейроглио-сосудистые взаимоотношения в энторинальной коре белых крыс в посттравматическом периоде // IV Международная конференция по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения 2002». - СПб., 2002. – С.268.

3. Турок Н.Е., Соколова Т.Ф., Степанов С.С., Хижняк А.С. Лимбическая система мозга белых крыс при тяжелой политравме// Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии: Сб. науч. тр. - Томск, 2002. – Вып. 2. – С.71-72.

4. Соколова Т.Ф., Турок Н.Е., Степанов С.С. Цитоархитектоника лимбического мозга и иммунологическая реактивность организма при политравме // Морфология. – 2002. – Т. 121, №2-3. – С. 147.

5. Соколова Т.Ф., Турок Н.Е., Степанов С.С., Емельянов Ю.В. Экспериментальное изучение закономерностей нарушения долговременной памяти при травматической болезни // VIII Всероссийский съезд анестезиологов и реаниматологов: Тез. докл. – Омск, - С. 370.