

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 18, №1

2019



УДК 612.823

ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМАТОФИЛИИ ЦИТОПЛАЗМЫ БОЛЬШИХ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ НОВОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫСЫ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© Бонь Е.И., Зиматкин С.М.

Гродненский государственный медицинский университет, 230009, Беларусь Гродно, ул. Горького, 80

Цель. Анализ изменений хроматофилии цитоплазмы больших пирамидных нейронов новой коры головного мозга крысы в постнатальной онтогенезе.

Методика. Эксперименты выполнены на 156 беспородных белых крысятах, родившихся от 75 самок крыс. Для последующего гистологического и электронно-микроскопического исследования брали крысят на 2-е, 5-е, 10-е, 20-е, 45-е и 90-е сут. после рождения.

Результаты. На светооптическом были изучены особенности соотношения в популяции нейронов различных по хроматофилии нейронов. На ультрамикроскопическом уровне выявлены характерные для каждого из них особенности.

Заключение. Полученные данные об изменении хроматофилии цитоплазмы больших пирамидных нейронов неокортекса в постнатальном онтогенезе дают основу для дальнейшего изучения возрастных изменений данного отдела центральной нервной системы как в норме и в условиях эксперимента, создавая фундаментальную базу для лечения и профилактики церебральной патологии различного генеза.

Ключевые слова: крысы, нейроны, неокортекс, хроматофилия

CHANGES IN CYTOPLASM CHROMATOPHILIA OF LARGE PYRAMID NEURONS OF RATS NEOCORTEX IN POSTNATAL ONTOGENY

Bon L.I., Zimatkin S.M.

Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic Belarus

Abstract

Objective. Analysis of changes in the chromatophilia of the cytoplasm of large pyramidal neurons in the rat cerebral cortex in postnatal ontogenesis.

Methods. The experiments were performed on 156 outbred white rats, born from 75 female rats. The rats were taken for the subsequent histological and electron microscopic examination on the 2nd, 5th, 10th, 20th, 45th, and 90th days after birth.

Results. At the light-optical level, the peculiarities of the ratio in the population of various chromatophilia neurons were studied. At the ultramicroscopic level, the features of each of them were revealed.

Conclusion. The obtained data on the change in chromatophilia of the cytoplasm of the large pyramidal neurons of the neocortex in postnatal ontogenesis give rise to further study of the age-related changes in this section of the central nervous system both in normal conditions and in the experiment, creating a fundamental basis for the treatment and prevention of cerebral pathology of various genesis.

Keywords: rats, neurons, neocortex, chromatophilia

Введение

Многочисленные экспериментальные исследования, в том числе, и по изучению центральной нервной системы, проводятся на крысах. Углубление понимания процессов созревания и дифференцировки головного мозга данных животных создают фундаментальную базу и для клинических исследований.

Неокортекс, или новая кора, является в филогенетическом плане новейшей структурой коры больших полушарий головного мозга. Именно в неокортексе происходит сложный анализ и синтез поступившей в мозг информации, а также реализация условных рефлексов. Неокортекс является материальной основой когнитивных функций центральной нервной системы. Неокортекс крыс образован такими формациями, как лобная, теменная, височная и затылочная кора [2].

Тигроид представляет собой хроматофильную субстанцию, располагающуюся в цитоплазме нейронов. Под электронным микроскопом заметно, что тигроид не что иное, как цистерны гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС).

Расположение тигроида различно – он может быть равномерно распределен по всей цитоплазме (характерно для нейронов молекулярного слоя неокортекса), либо образовывать обширные сгустки в районах отхождения нейропиля (пирамидные нейроны и большие звездчатые нейроны неокортекса). У более высоко развитых животных, например, млекопитающих, глыбки тигроида в нейронах крупнее, чем у рептилий. При изучении структуры и расположения тигроида в различных формациях центральной нервной системы было выдвинуто предположение, что количество тигроида в цитоплазме нервных клеток связано с функциональной активностью нейрона [9, 11].

Целью исследования явился анализ изменений хроматофилии цитоплазмы больших пирамидных нейронов новой коры головного мозга крысы в постнатальной онтогенезе.

Методика

Эксперименты выполнены на 156 беспородных белых крысятах, родившихся от 75 самок крыс. Крыс содержали в стандартных условиях в соответствии с правилами содержания лабораторных животных [10]. На выполнение данных исследований получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета (протокол №1, 11.03.2014).

Так как морфофункциональные свойства коры больших полушарий мозга формируются поэтапно, то для изучения брались крысята на разных этапах онтогенеза: на 2-е, 5-е, 10-е, 20-е, 45-е и 90-е сут. По достижении крысятами выше обозначенных сроков, проводилась их декапитация. Фрагменты больших полушарий головного мозга, извлеченные из черепной коробки, фиксировали для дальнейшего гистологического, гистохимического, иммуногистохимического и электронно-микроскопического исследования. От потомства одной крысы-самки брали по 2 крысенка.

Гистологическое исследование. Участки коры головного мозга опускали в фиксатор Карнуа, затем проводили через спирты и просветляли в ксилолы и заливали в парафин. Срезы неокортекса производили на микротоме (Leica RM2125, Германия), а затем окрашивали по методу Ниссля (0,1% толуидином). Используя стереотаксический атлас, определяли местоположение участков неокортекса на срезах [13].

На парафиновых срезах определяли число больших пирамидных нейронов на единицу площади срезов коры мозга. Среди общего количества градуировали клетки по интенсивности окраски цитоплазмы (хроматофилии). Выделяли несколько типов: нормохромные – умеренно окрашенные; гиперхромные – темные; гиперхромные – очень темные, с деформированными перикарионами; гипохромные – светло окрашенные; клетки-тени – почти прозрачные. Подсчитывалось количество каждого типа клеток.

Участки для электронной микроскопии фиксировали 1% осмием на буфере Миллонига (pH=7,4). Для промывания материала брали смесь буфера Миллонига (20 мл) и сахарозы (900 мг). Затем кусочки неокортекса проводили последовательно через спирты, смесь спирта и ацетона, ацетон, смесь смол и ацетона и заливали в смолу. На ультрамикротоме MT-7000 (RMC, США) готовили полутонкие срезы и ультратонкие срезы. Контрастировали препараты ацетатом урана и цитратом свинца [14]. Для изучения ультратонких срезов использовали электронный микроскоп JEM-1011 (JEOL, Япония) с камерой Olympus MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия). Количественный анализ ультраструктуры нейронов выполняли, используя программу Image Warp (Bit Flow, США).

Полученные данные изучались в лицензионной компьютерной программе Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Использовалась описательная статистика – критерий Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test) с применением поправки Бонферони. Данные представлялись как медиана (Me), нижний квартиль (LQ) и верхний квартиль (UQ) [1].

Результаты исследования

На гистологических препаратах, окрашенных по методу Ниссля, наблюдалось преобладание нормохромных нейронов, как на ранних этапах онтогенеза, так и на более поздних. На 2-е сут. постнатального развития гиперхромные нейроны составили в неокортексе 8% от общего

количества нейронов, на 45-е сут. – 11%, а на 90-е – 9%. Гиперхромные сморщенные нейроны выявляются только на 20-е (2%) и 45-е сут. (3%), а на 90-е они практически не встречаются. Доля гипохромных нейронов минимальна на 5-е сут. (1%), а затем, на 20 и 45-е сут. несколько возрастает (7% и 11% от общего количества нейронов, соответственно). Клетки-тени у 2-х суточных крысят не обнаруживаются, затем их количество постепенно возрастает, достигая максимума на 45-е сут., когда они составляют 8% от общего количества нейронов ($p < 0,05$), а к 90-м суткам вновь снижается (рис. 1) [3].

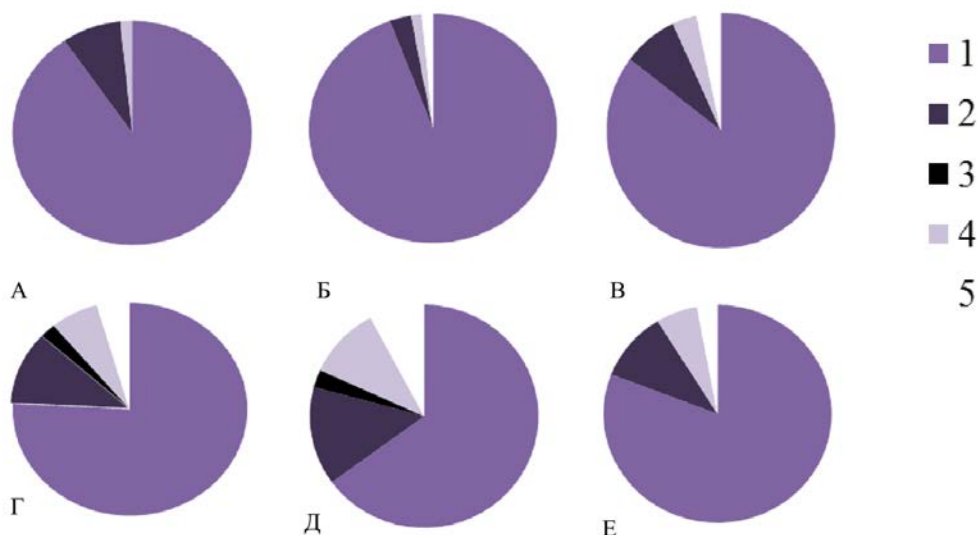


Рис. 1. Соотношение форм нейронов с разной хроматофилией на 2-е (А), 5-е (Б), 10-е (В), 20-е (Г), 45-е (Д) и 90-е (Е) сут. после рождения в лобной коре, %. 1 – нормохромные нейроны; 2 – гиперхромные нейроны; 3 – гиперхромные сморщенные нейроны; 4 – гипохромные нейроны; 5 – клетки-тени

Цитоплазма нормохромных большие пирамидные нейроны неокортекса крыс в содержит цистерны гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС), на которых находится большое число рибосом. Митохондрии на 45-е сут. вытянутые, с содержат много хорошо различимых крист, в то время как на 20-е сут. митохондрии по размерам гораздо больше, но содержат меньше крист. В перинуклеарной области находится комплекс Гольджи. Плоские цистерны его располагаются стопками и имеют характерную конфигурацию. Небольшое количество свободных рибосом распределены по всей цитоплазме (рис. 2-А, Б).

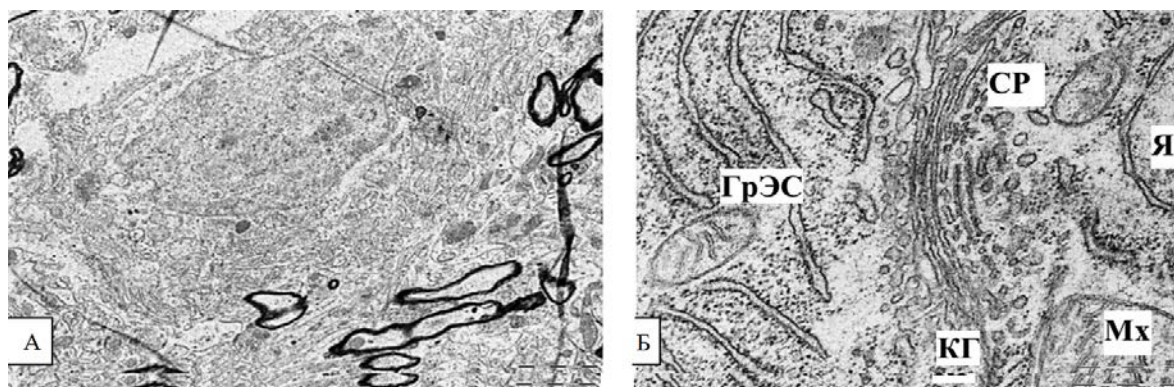


Рис. 2. Нормохромные нейроны внутреннего пирамидного слоя неокортекса крыс. А – общий вид нейрона; Б – фрагменты ядра и цитоплазмы. Ядро нейрона (Я), митохондрии (Мх), гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), свободные рибосомы (СР), комплекс Гольджи (КГ). Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б – 0,5 мкм. Электронограмма. Ув.: А – 8000, Б – 50000

Ядра и цитоплазма гиперхромных сморщенных нейронов темные и образуют многочисленные

складки. Для данного типа нейронов характерны дезорганизация и деструктивные изменения органелл. Наблюдается значительное расширение канальцев ГрЭС и комплекса Гольджи. Свободные рибосомы образуют поля и скопления. Отмечается набухание митохондрий и деградация их крист (рис. 3-А, Б).

Цитоплазма гиперхромных несморщенных нейронов содержит больше канальцев ГрЭС. Повышено и количество свободных рибосом. В то же время, гиперхромные нейроны имеют меньшее, по сравнению с нормохромными, число митохондрий (рис. 4-А, Б).

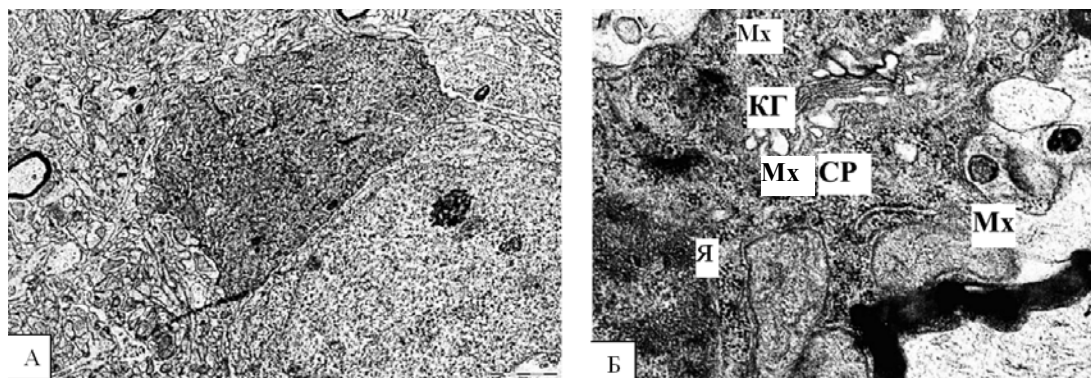


Рис. 3. Гиперхромные сморщенные нейроны внутреннего пирамидного слоя неокортекса крыс. А – общий вид нейрона; Б – фрагменты ядра и цитоплазмы. Митохондрии (Мх), свободные рибосомы (СР), комплекс Гольджи (КГ). Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б – 0,5 мкм. Электронограмма. Ув.: А – 8000, Б – 50000

Перинуклеарное пространство гипохромных нейронов часто расширено, цитоплазма содержит малое количество органелл, особенно и рибосом. Митохондрии меньшего, по сравнению с нормохромными нейронами, размера и содержат малое число крист. Данные характеристики говорят о снижении функциональной активности и торможении протеинового синтеза в гипохромных нейронах. Нарастание этих нарушений, вероятно, ведет к превращению данного типа нейронов в клетки-тени и последующей деструкции (рис. 5- А, Б) [6-8, 11].

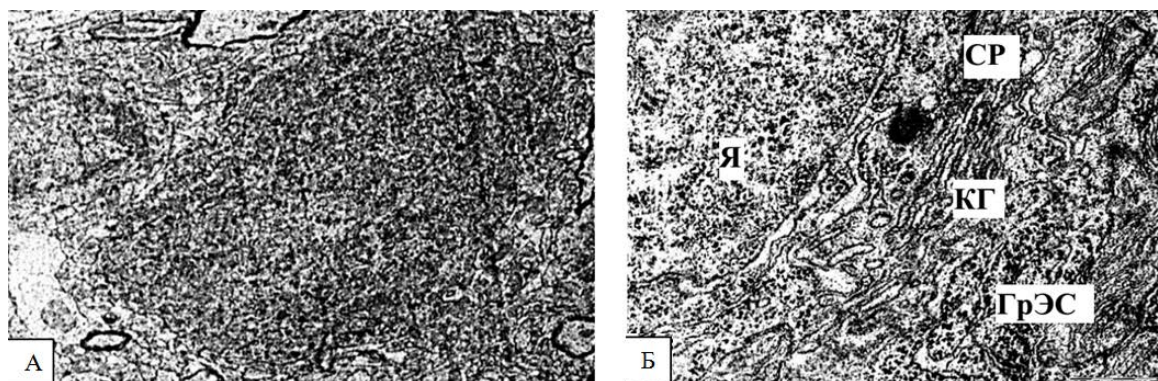


Рис. 4. Гиперхромные нейроны внутреннего пирамидного слоя неокортекса крыс. А – общий вид нейрона; Б – фрагменты ядра и цитоплазмы. Ядро нейрона (Я), гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), свободные рибосомы (СР), комплекс Гольджи (КГ). Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б – 0,5 мкм. Электронограмма. Ув.: А – 8000, Б – 50000

Обсуждение результатов исследования

Впервые мысль о том, что степень интенсивности окраски цитоплазмы нейронов связан с их различной функциональной активностью высказана Нисселем в 1889 году. Схожие предположения высказывались и позднее, но четкой взаимосвязи установлено не было. В 50-е годы 20-го века появилось много работ, претендовавших на решение сложных вопросов функциональной морфологии. Наиболее распространенной стала точка зрения о наличии в ЦНС 3 основных групп нервных клеток: нормохромных, гипохромных и гиперхромных, отражающих различные

функциональные состояния нейронов [9,11].

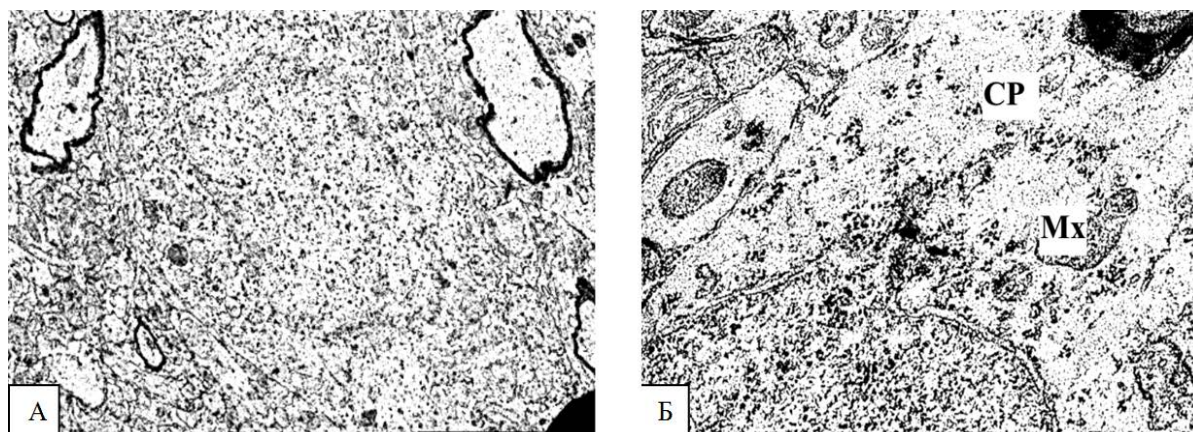


Рис. 5. Гипохромные нейроны внутреннего пирамидного слоя неокортекса крыс. А – общий вид нейрона; Б – фрагменты ядра и цитоплазмы. Свободные рибосомы (СР), митохондрии (Мх). Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б – 0,5 мкм. Электронограмма. Ув.: А – 8000, Б – 50000

Наибольшее количество гиперхромных нейронов наблюдается на 20-е и 45-е сут. постнатального онтогенеза. К этому возрасту становится дефинитивным число шипиков на дендритах, а количество синапсов продолжает расти, но еще не достигает уровня, присущего взрослому животному. Основным процессом в период с 20-х по 45-е сут. является интенсивная миелинизация в коре. В этот период обмен гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), ассоциированный с метаболизмом в дендритах и аксонах нейронов, особенно высок. При этом скорость образования ГАМК превышает интенсивность ее использования [4].

В данный период постнатального развития нервная система крайне уязвима для любых воздействий. Вероятно, что именно эта уязвимость, связанная с миелинизацией и завершением формирования шипикового аппарата, и вызывает появление гиперхромных сморщенных и гипохромных нейронов – тех клеток, у которых проявляется та или иная дисфункция. Можно предположить, что гиперхромные сморщенные – это те нейроны, которые не смогли образовать синаптических контактов, или клетки с дефектами миелинизации отростков. В дальнейшие периоды онтогенеза они могут быть элиминированы нейроглией.

Существуют мнения, что интенсивная окраска цитоплазмы нейронов характеризует преобладание образования белка над его утилизацией. Но есть сведения и о том, что гиперхромный нейрон, посредством суперэкспрессии амплифицированных генов, является клеткой, интенсивно синтезирующей белки. Некоторые исследователи расценивают гиперхромные нейроны как гиперфункциональные и считают, что синтезируемый ими белок идет на собственные их потребности [5, 9, 11].

Сморщенные нейроны – это клетки с угнетением функциональной активности. Характерная их форма связана с патологическими необратимыми изменениями водно-солевого обмена [5,12]. Для гипохромных нейронов, по видимому, характерно энергодефицитное состояние, синтетическая активность их невелика [8]

Имеется взаимосвязь между хроматофилией цитоплазмы этих нейронов на светооптическом уровне и электронной плотностью, цитоплазмы на электрономикроскопическом уровне. Последняя обусловлена рибосомами, особенно свободными, а в гиперхромных сморщенных нейронах ещё и скоплениями гомогенного осмиофильного вещества, образующегося вероятно в результате обезвоживания клетки в результате нарушения водно-солевого обмена [5].

Заключение

Полученные в нашей работе результаты свидетельствуют об определённой динамике хроматофилии цитоплазмы больших пирамидных нейронов неокортекса в постнатальный период развития крысы. Эти изменения носят преимущественно не линейный, а волнообразный характер. Данные об изменении хроматофилии цитоплазмы больших пирамидных нейронов неокортекса в

постнатальном онтогенезе дают основу для дальнейшего изучения возрастных изменений данного отдела центральной нервной системы как в норме и в условиях эксперимента, создавая фундаментальную базу для лечения и профилактики церебральной патологии различного генеза.

Литература (references)

1. Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных: учеб.-метод. пособие. Минск.: Институт подготовки научных кадров Национальной Академии Наук Беларуси – 2008. – 235 с. [Batin N.V. *Komp'yuternyy statisticheskiy analiz dannykh*. Computer statistical data analysis: proc. Method. allowance. – Minsk.: Institute for the Training of Scientific Personnel of the National Academy of Sciences of Belarus, 2008. – 235 p. (in Russian)]
2. Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Микроскопическая организация изокортекса крысы // Новости медико-биологических наук. – 2017. – №4. – С. 80-88 [Bon E.I., Zimatkin S.M. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of Biomedical Sciences. – 2017. – N4. – P. 80-88. (in Russian)]
3. Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Динамика гистологических изменений в париетальной коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя // Новости медико-биологических наук. – 2015. – №2. – С. 146-151. [Bon E.I., Zimatkin S.M. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of Biomedical Sciences. – 2015. – N2. – P. 146-151. (in Russian)]
4. Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Онтогенез коры головного мозга крысы // Новости медико-биологических наук. – 2014. – №4. – С. 238-244. [Bon E.I., Zimatkin S.M. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of Biomedical Sciences. – 2014. – N4. – P. 238-244. (in Russian)]
5. Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Темные нейроны мозга // Морфология. – 2017. – №6. – С. 81-86. [Bon E.I., Zimatkin S.M. *Morfologia*. Morphology. – 2017. – N6. – P. 81-86. (in Russian)]
6. Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Постнатальный органеллогенез в пирамидных нейронах коры большого мозга крысы // Морфология. – 2017. – №2. – С. 20-24. [Zimatkin S.M., Bon E.I. *Morfologia*. Morphology. – 2017. – N2. – P. 20-24. (in Russian)]
7. Зиматкин С.М., Бонь Е.И., Островская О.Б. Ультраструктура нейронов фронтальной коры мозга 20-суточных крыс после антенатальной алкоголизации // Весті НАН Беларусі. – 2016. – №3. – С. 43-46. [Zimatkin S.M., Bon Ye.I., Otrovskaya O.B. *Vesci NAN Belarusi*. Conduct of the National Academy of Sciences of Belarus. – 2016. – N3. – P. 43-46. (in Russian)]
8. Зиматкин С.М., Бонь Е.И., Островская О.Б. Ультраструктурные изменения нейронов фронтальной коры мозга у 45-суточных крыс после пренатального воздействия алкоголя // Новости медико-биологических наук. – 2016. – №3. – С. 33-37. [Zimatkin S.M., Bon Ye.I., Otrovskaya O.B. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. News of Biomedical Sciences. – 2016. – N3. – P. 33-37. (in Russian)]
9. Калимуллина Л.Б. К вопросу о темных и светлых клетках // Морфология. – 2002. – №4. – С. 75-80. [Kalimullina L.B. *Morfologia*. Morphology. – 2002. – N4. – P. 75-80. (in Russian)]
10. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль-2С. – 2010, 241 с. [Karkishchenko N.N., Gracheva S.V. *Rukovodstvo po laboratornym zhitotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh*. Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical research. – Moscow: Profil-2S, 2010. – 241 p. (in Russian)]
11. Попова Э.Н. Ультраструктура мозга, алкоголь и потомство: монография. – М.: Изд. Научный мир, 2010. – 155 с [Popova E.N. *Ul'trastruktura mozga, alkohol' i potomstvo*. Ultrastructure of the brain, alcohol and offspring. – Moscow: The scientific world, 2010. – 155 p. (in Russian)]
12. Gallyas F., Pal J., Bukovics P. Supravital microwave experiments support that the formation of "dark" neurons is propelled by phase transition in an intracellular gel system // *Brain Research*. – 2009. – N1270. – P. 152-156.
13. Parnavelas J.G., Lieberman A.R. An ultrastructural study of the maturation of neuronal somata in the visual cortex of the rat // *Embriology*. – 1979. – N157. – P. 311-328.
14. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Australia, 1998. – 242 p.
15. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // *Cell Biology*. – 1963. V.17. – P. 208-212.

Информация об авторах

Бонь Елизавета Игоревна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь. E-mail: e_bon@list.ru

Зиматкин Сергей Михайлович – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный университет», Беларусь. E-mail: smzimatkin@mail.ru