

tal exposure to lead on brain development in rats // Neurosci. Behav. Physiol. – 2008. – № 2. – P. 145–149.

14. Toews A.D. Effect of inorganic lead exposure on myelination in the rat / A.D. Toews, M.R. Krigman, D.J. Thomas, P. Morell // Neurochem Res. – 1980. – № 5 (6). – P. 605–616.

15. Weihong Yuan, Scott K. Holland, Kim M. Cecil, et al. The Impact of Early Childhood Lead Exposure on Brain Organization: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study of Language Function // Pediatrics. – 2006. – 118. – P. 971–977.

Координаты для связи с авторами: Еременко Инна Рамазановна – канд. мед. наук, доцент кафедры гистологии ДВГМУ; Васильева Елена Васильевна – канд. мед. наук, доцент кафедры гистологии ДВГМУ; Рыжавский Борис Яковлевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии ДВГМУ, тел. +7-924-303-99-77; Демидова Ольга Викторовна – канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры физиологии ДВГМУ.



УДК 616.831-018-077:611-019:[616.092.9:599.329.4]

Б.Я. Рыжавский, Е.М. Литвинцева

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОТЛИЧИЯ МОЗГА КРЫС ИЗ ПОМЕТОВ РАЗНОЙ ЧИСЛЕННОСТИ

*Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск*

Резюме

Исследован мозг 40-дневных животных 2 групп: 1-й группы – 2 помётов, состоявших из 24 крысят (многочисленные помёты), 2-й группы – из 3 помётов, состоявших из 11 крысят (малочисленные помёты). Исследовали переднетеменную (ПТД) и собственно теменную доли (СТД) неокортекса, поле I-го гиппокампа. Животные из 2-й группы превосходили животных из 1-й группы по массе тела, абсолютной массе мозга и полушария. Толщина коры ПТД не имела достоверных межгрупповых различий, в СТД у животных 2-й группы она была меньшей, чем в 1-й. Неокортекс ПТД и СТД крыс 2-й группы имел меньшую плотность расположения нейронов в слое II. Размеры ядрышек, ядер и цитоплазмы большинства исследованных нейронов неокортекса и гиппокампа у крыс из малочисленных помётов были достоверно меньше таковых у крыс из многочисленных помётов. Концентрация РНК в цитоплазме нейронов исследованных локализаций не имела достоверных межгрупповых различий, активность НАДФН-д в нейронах неокортекса и гиппокампа, а также НАДФН-д в слое II мозга крыс 2-й группы была достоверно меньшей, чем у крыс 1-й группы. Полученные данные свидетельствуют, что мозг крыс из малочисленных помётов, имевших признаки акселерации, характеризовался целым рядом морфологических отличий от мозга крыс из многочисленных помётов.

Ключевые слова: мозг, кора, развитие, морфометрия.

B.Ya. Rizhavskiy, E.M. Litvintseva

MORPHOMETRIC AND HISTOCHEMICAL DIFFERENCES IN THE BRAIN OF RATS TAKEN FROM BROOD OF DIFFERENT NUMBER

Far Eastern State Medical University, Khabarovsk

Summary

We studied the brain of 40-days old animals in two groups: 1-st group – 2 broods included 24 rats (multiple brood), 2-nd group – 3 broods including 11 rats (non-multiple brood). We investigated anterior parietal (APL) and parietal proper (PPL) lobes of neocortex, field of 1-st hypothalamus. Animals from the 2-nd group exceeded the animals from the 1-st group in body mass, absolute brain and hemispheres mass. Thickness of APL cortex did not show any significance differences between the groups, PPL in rats of the 2-nd group was less than that of the 1-st. APL and PPL neocortex in the rats of the 2-nd group had a less density of neurons located in layer II. Nucleoli, nucleoli cytoplasm sizes of the majority-studied neurons of neocortex and hippocampus in rats from non-multiply brood were reliably less than that of the rats from multiple broods. RNA concentration in cytoplasm in the studied concentrations did not show any significant differences between the groups. NADFN-d activity in neurons of neocortex and hippocampus as well as NADFN-d in the layer II мозга in the rats of the 2-nd group was reliably lower than that of the 1-st group. The received findings demonstrate that a number of morphological differences compared to the brain of the rats from non-multiple brood characterizes the brain of the rats from non-multiple brood showing signs of acceleration.

Key words: brain, cortex, development, morphometry.

Данные многочисленных исследований свидетельствуют о выраженном влиянии средовых условий на показатели развития головного мозга как в пре-, так и в постнатальном онтогенезе [2-5, 7-18]. В частности, было показано, что новорожденные крысы, рожденные в пометах малой численности, имеют массу мозга и полушария большую, чем у крысят из пометов большой численности [9, 12]. Экспериментальное уменьшение численности пометов у крыс сразу после родов приводит к тому, что в возрасте 14, 30 и 40 суток крысы отличаются большей, чем в контроле, массой мозга, тогда как воспитание животных в экспериментально сформированных, смешанных, пометах обуславливает противоположный эффект [4, 9-12]. При этом межгрупповые отличия массы мозга и полушария сочетаются с отличиями морфометрических и гистохимических показателей развития коры мозга, ее нейронов, а также поведения животных в приподнятом крестообразном лабиринте [9, 11]. В то же время известно, что в природных и лабораторных условиях плодовитость животных, численность рождаемого ими потомства значительно варьирует [5, 9]. В связи с этим, возникает вопрос о том, как эта «естественная» вариабельность отражается на морфологических показателях развития мозга животных, различия которых, как известно, взаимосвязаны с различиями функциональных характеристик органа [2, 7, 9, 16-18]. Данный вопрос, по нашему мнению, представляет не только академический интерес. Известно, что большая масса мозга у животных из пометов малой численности сочетается с рядом признаков их акселерации: большей массой тела, гонад, большей продвинутостью последних в развитии. У крыс из пометов малой численности это может быть следствием более комфортных условий развития: лучшей обеспеченностью нутриентами, меньшей конкуренцией за внимание матери, меньшей стрессогенностью среды и т. д. [9] С другой стороны, процессы акселерации наблюдаются и в человеческой популяции. В связи с этим, изучение особенностей мозга животных, развитие которых имеет признаки акселерации, представляет интерес для медиков, психологов, педагогов [1, 3, 9, 13]. В связи с изложенным, настоящая работа посвящена изучению особенностей показателей развития мозга крыс, родившихся и развивавшихся в пометах разной численности.

Материалы и методы

Исследованы животные 2 групп, потомство 4-5-месячных самок и самцов, которые содержались в условиях одного вивария, корм и воду получали *ad libitum*. Животные 1-й группы включали в себя 2 помета, состоявшие из 24 крысят (многочисленные пометы), животные 2-й группы включали 3 помета, состоявших из 11 крысят (малочисленные пометы). Забой животных проводили в возрасте 40 суток (препубертатный период) декапитацией, определяли массу тела, мозга, полушария, гонад и надпочечников. Левое полушарие фиксировали в жидкости Карнуа. Затем его разрезали в переднетеменной (ПТД) и собственнетеменной долях (СТД), заливали в парафин готовили срезы толщиной 7 мкм, которые окрашивали метиленовым синим, а также галлоцианином на нуклеиновые кислоты по Эй-

нарсону. Проводилось обзорное изучение препаратов ПТД и СТД, их морфо-метрическое и гистохимическое исследование, как описано [9]. На криостатных срезах правого полушария толщиной 20 мкм проводили определение активности НАДН-д и НАДФН-д [6] в цитоплазме нейронов слоев II и V СТД и поля СА I гиппокампа. Результат оценивали по оптической плотности продуктов реакции в цитоплазме на аппарате «Мекос» ($\lambda=550$ нм). Исследовали 25 нейронов каждой из указанных областей. Поведение животных тестировалось в 30-дневном возрасте в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ). Статистический анализ проведен с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Межгрупповые различия считались достоверными при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Животные из 2-й группы (пометы малой численности) превосходили животных из 1-й группы по массе тела в 14, 21, 30 и 40-дневном возрасте, причем различия увеличивались в исследованном возрастном интервале и были максимальными у 40-дневных крыс. Таким образом, темпы роста животных 1-й группы были большими, чем во 2-й как во время молочного периода онтогенеза, так и после его окончания (таблица). Масса надпочечников, яичников и семенников у животных 1-й группы также были несколько большими, чем у животных 2-й группы ($p>0,05$). Таким образом, можно говорить о более высоких темпах соматического развития крысят из пометов малой численности в постнатальном онтогенезе.

Эти животные отличались также большей, чем у крыс 2-й группы, абсолютной массой мозга и полушария (на 8,4 % и на 11,7 % соответственно). При этом их относительная масса у них была меньшей, чем в 1-й группе (таблица). Полученные данные свидетельствуют, таким образом, о том, что у животных, имеющих признаки акселерации, темпы роста мозга больше, чем у не имеющих их. Однако при этом они увеличены в меньшей степени, чем темпы роста массы тела, в связи с чем, на единицу массы мозга у них приходится большая величина регулируемой массы тела.

Изучение гистологических показателей, отражающих уровень развития мозга, его коры, выявило, что толщина коры ПТД не имела достоверных межгрупповых различий, в СТД у животных 2-й группы она была достоверно меньшей, чем в 1-й. Оценивая эти различия, необходимо учитывать, что масса полушария (а, следовательно, и его размер) у крыс 2-й группы был большим, чем в 1-й, что могло обуславливать большую степень «растяжения» их коры, что происходит при завершении развития мозга [9]. Неокортекс ПТД и СТД крыс 2-й группы характеризовался также меньшей плотностью расположения нейронов в слое II (таблица), что говорит о большем развитии нейропилля и может расцениваться как отражение большей продвинутоности в развитии. Это согласуется с выявленным ранее у крыс из экспериментально уменьшенных пометов более высоким уровнем миелинизации мозга по сравнению с таковым у контрольных животных [4].

Морфометрический анализ показал, что размеры ядрышек, ядер и цитоплазмы большинства исследо-

ванных нейронов неокортекса и гиппокампа у крыс из малочисленных пометов были достоверно меньше таковых у крыс из многочисленных пометов (таблица). Цитоспектрофотометрическое исследование при этом не выявило достоверных межгрупповых различий концентрации РНК в цитоплазме нейронов всех локализаций. В то же время, активность НАДФН-д в нейронах неокортекса и гиппокампа, а также НАДН-д в слое II мозга крыс 2-й группы была достоверно меньшей, чем у крыс 1-й группы (таблица), то есть межгрупповые отличия активности данных ферментов касались преимущественно внемитохондриальных окислительно-восстановительных реакций, участвующих в синтетических процессах ряда высокомолекулярных соединений. Вышеизложенное свидетельствует о том, что мозг животных сравниваемых групп, отличающийся по массе, имеет также морфометрические и гистохимические различия, не одинаковые в разных зонах коры и в разных ее слоях. Изучение поведения животных в ПК Л в 30-дневном возрасте показало, что у крыс из пометов меньшей численности было достоверно уменьшено время бездействия, а также время и число стоек.

Таким образом, мозг 40-дневных крыс из естественных малочисленных пометов имел целый набор отличий макро- и микропоказателей от мозга крыс из многочисленных пометов. Ранее нами было показано, что мозг животных из экспериментально уменьшенных пометов по многим морфометрическим параметрам отличается от мозга контрольных животных. При этом их выраженность и направленность не одинаковы в возрасте 14, 30 и 40 суток [10-12]. В настоящей работе, в отличие от этих исследований, изучались особенности мозга 40-дневных крыс из пометов, на численность которых не оказывались воздействия экспериментаторов, то есть изученные нами животные были рождены в пометах, значительно различавшихся по численности. Сопоставления межгрупповых различий, обусловленных искусственным формированием пометов разной численности, с одной стороны, и пометов с разным числом рожденных крысят, с другой, показало, что в обоих случаях в 40-дневном возрасте животные из малочисленных и многочисленных пометов сходным образом различаются по большинству исследованных параметров.

В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что факторы, ускоряющие темпы соматического развития животных (лучшая обеспеченность нутриентами, меньшая степень стрессогенности среды, большее внимание матери), оказывают одновременно влияние на макроскопические и микроскопические характеристики развития мозга, отражаются на поведении. Механизмы, определяющие взаимосвязи между темпами соматического развития, с одной стороны, и развития мозга, с другой, требуют специального изучения. Однако можно предположить, что ускоренные темпы роста массы тела обуславливают ускоренный рост массы мозга, интенсификацию синтетических процессов в его нейронах и глиоцитах, ускоряя темпы миелинизации [4, 9-12]. Кроме того, на состоянии структур мозга, по-видимому, отражается увеличенная нагрузка, обусловленная снижением относительной массы моз-

га при повышенных темпах соматического развития. Оценивая выявленные межгрупповые различия, следует иметь в виду полученные ранее данные, свидетельствующие, что в интервале между 30 и 40-суточным возрастом (в отличие от более ранних периодов) темпы роста мозга у крыс из экспериментально уменьшенных пометов становятся ниже, чем у животных из контрольных (многочисленных) пометов, в связи с чем характер морфометрических и гистохимических различий между животными из экспериментально уменьшенных и контрольных пометов в 40-дневном возрасте «инвертирован» по сравнению с различиями в 14 и 30-дневном возрасте [11-12]. В связи с этим, сложно априорно ответить на вопрос о том, каковыми будут межгрупповые морфологические и функциональные различия у взрослых животных, воспитанных в малочисленных и многочисленных пометах. Данный вопрос, по нашему мнению, заслуживает специального изучения.

Показатели соматического развития и развития головного мозга крысят из пометов различной численности

Показатели	Многочисленные пометы	Малочисленные пометы
Масса тела (г) в 14 сут. 21 сут. 30 сут. 40 сут.	20±0,23 32±0,53 54±0,91 80±2,36	26±0,6* 40±0,87* 67±2,1* 111±3*
Масса (мг) мозга полушария надпочечников семенников яичников Масса относительная (мг/г) мозга полушария	1 481±11,2 547±9 10,4±0,45 462±13 18,7±1,6 18,7±0,47 6,91±0,18	1 606±14,4* 610±14* 12,5±0,9 546±44 22,7±1,2 14,5±0,39* 5,53±0,19*
Толщина коры (мкм) ППД СТД	1 586±12 1 360±17	1 618±29 1 233±18*
Число нейронов в поле зрения ППД, слой II слой V СТД, слой II слой V	20±0,7 6,8±0,16 20,8±0,54 7,2±0,23	17,3±0,52* 7,2±0,28 17,7±0,45* 7,3±0,28
Размеры, мкм ² ППД, ядрышки, слой II ядра, слой II цитоплазма, слой V ядрышки, слой V ядра, слой V цитоплазма, слой V СТД, ядрышки, слой II ядра, слой II цитоплазма, слой II ядрышки, слой V ядра, слой V цитоплазма, слой V Гиппокамп ядрышки ядра цитоплазма	2,47±0,12 61,4±1,35 45,8±1,22 4,78±0,12 105±2,47 88,7±2,47 2,56±0,18 60,1±1,59 45,3±1,27 4,36±0,09 95±2,4 82,1±2,0 2,94±0,2 73,8±1,9 50,6±2,1	1,84±0,09* 56,1±2,12 40,2±1,05* 4,64±0,16 105,1±2,32 90,9±3,66 1,7±0,06* 55,4±1,5* 39,8±1,38* 4,3±0,14 103,1±3,54 91,6±4,16 2,08±0,1* 68,3±1,51* 44,5±1,0*
Активность (усл. ед.) НАДФН-д Слой II Слой У Гиппокамп Активность (усл. ед.) НАДН-д Слой II Слой У Гиппокамп	0,42±0,01 0,4±0,01 0,44±0,02 0,45±0,01 0,39±0,01 0,42±0,02	0,295±0,01* 0,294±0,01* 0,329±0,03* 0,365±0,02* 0,405±0,03 0,407±0,02

Примечание. * – межгрупповые различия статистически достоверны (p<0,05).

Полученные данные представляют, по нашему мнению, интерес в связи с тем, что в популяциях многоплодных животных в естественных условиях: 1) имеются пометы различной численности; 2) суммарная численность популяций, как и средняя численность помётов, могут существенно меняться в зависимости от многих условий [5, 9]. Эти особенности процессов репродукции животных отражаются на показателях соматического, полового развития, свойствах мозга данных животных, их поведении [5, 9]. В совокупности

приведенные данные позволяют предположить, что факторы, обуславливающие изменения соматического развития той или иной популяции, могут влиять как на морфологические, так и на функциональные свойства мозга особей и популяции в целом. Мы полагаем, что изложенные результаты могут представлять интерес не только для нейробиологов и врачей, но и для психологов и педагогов, участвующих в воспитании и обучении детей, значительно различающихся темпами физического развития [1, 7, 13].

Литература

1. Алексеева В.А., Петрова П.Г., Синдеева Л.В. Развитие вторичных половых признаков у девочек якутской препубертатного возраста (11-15 лет) в зависимости от соматотипа // Якутский медицинский журнал. – 2009. – № 2. – С. 161–162.

2. Витвицкая, Л.В., Бикбулатова Л.С., Витвицкий В.Н. Изменения содержания нуклеиновых кислот и белков в различных отделах мозга крыс, выращенных в условиях обогащенной и обедненной среды // Журнал высш. нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 1982. – Т. 32. – № 3. – С. 455–463.

3. Дмитриева Н.И., Кассиль В.Г. Влияние некоторых факторов среды на развивающийся мозг // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1982. – Т. 93, № 9. – С. 84–90.

4. Еременко И.Р., Васильева Е.В., Рыжавский Б.Я., Литвинцева Е.М. Содержание липидов в полушариях мозга и мозжечка у крыс в молочном и препубертатном периоде онтогенеза в норме и при экспериментальном увеличении массы мозга / Дальнев. мед. журн, 2010. – № 4. – С. 109–111.

5. Ермакова О.В. Структурные перестройки периферических эндокринных желез мышевидных грызунов в условиях хронического облучения в малых дозах: автореф. дисс. ... доктора биол. наук. – М., 2008. – 45 с.

6. Лойда З., Госспрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. – М.: Мир. – 272 с.

7. Нетребенко О.К. Влияние питания на развитие мозга // Педиатрия. – 2007. – Т. 87. – № 3. – С. 96–103.

8. Проценко Е.В., Перетятко Л.П., Кулида Л.В. Морфология коры головного мозга плодов и новорожденных с экстремально низкой массой тела при неосложненной беременности и невынашивании гормонального генеза. Архив патологии – 2000. – Т. 62. – № 4. – С. 37–41.

9. Рыжавский Б.Я. Развитие головного мозга: отдаленные последствия влияния некомфортных условий. – Хабаровск: Изд-во ДВГМУ, 2009. – 278 с.

10. Рыжавский Б.Я., Литвинцева Е.М. Морфометрические и гистохимические особенности неокор-

текса и гиппокампа крыс с экспериментально увеличенной и уменьшенной массой мозга // Дальнев. мед. журн. – 2012. – № 3. – С. 94–97.

11. Рыжавский Б.Я., Литвинцева Е.М., Учакина Р.В. Сопоставления величины массы головного мозга с морфометрическими и гистохимическими характеристиками нейронов коры, показателями высшей нервной деятельности у крыс в препубертатном периоде онтогенеза // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2009. – Т. 148. – № 8. – С. 236–240.

12. Рыжавский Б.Я., Литвинцева Е.М., Матвеева Е.П. Морфометрические особенности неокортекса и гиппокампа при экспериментальном увеличении мозга у крыс (онтогенетический анализ) // Дальнев. мед. журн. – 2010. – № 1. – С. 90–94.

13. Сауткин М.Ф., Стунеева Г.И. Материалы многолетних исследований физического развития школьников // Здравоохранение Российской Федерации. – 2005, № 1. – С. 55–57.

14. Baranyi J., Bakos N., Haller J. Social instability in female rats: the relationship between stress-related and anxiety-like consequences // Physiol. Behav. – 2005. – Vol. 84. – № 4. – P. 511–518.

15. Casper R.C. Nutrients, neurodevelopment and mood // Curr. Psychiatry Rep. – 2004. – Vol. 6. – № 6. – P. 425–429.

16. Cooke R.W., Abernethy L.J. Cranial magnetic resonance imaging and school performance in very low birth weight infants in adolescence // Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. – 1999. – Vol. 81. – № 2. – P. 116–121.

17. Martinez-Cruz C.F., Poblano A., Fernandez-Carrocera L.A. Association between intelligence quotient scores and extremely low birth weight in schoolage children // Arch. Med. Res., 2006. – Vol. 37. – № 5. – P. 639–645.

18. Reiss, D., Wolter-Sutter A., Krezel W. Effects of social crowding on emotionality and expression of hippocampal nociceptin/orphanin FQ system transcripts in mice // Behav. Brain Res. – 2007. – Vol. 184. – № 2. – P. 167–173.

Координаты для связи с авторами: Рыжавский Борис Яковлевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии ДВГМУ, тел. +7-924-303-99-77; Литвинцева Екатерина Марковна – канд. биол. наук, доцент кафедры химии ДВГМУ.

