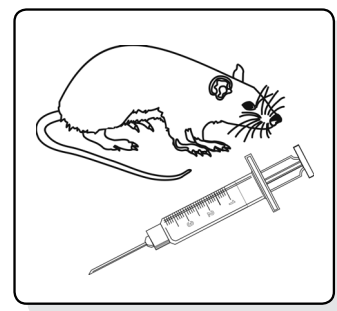


Теоретическая и экспериментальная медицина



<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2019-3-57-60>

УДК 611.83/612.821-027.12:599.323.4-0-53.31-09.9

Б.Я. Рыжавский, Д.И. Жильников

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО И ПОСТНАТАЛЬНОГО УМЕНЬШЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ ПОМЕТОВ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАЗВИТИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В МОЛОЧНОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА

Дальневосточный государственный медицинский университет, 680000, ул. Муравьева-Амурского, 35,
тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск

Резюме

Исследовался головной мозг (ГМ) 14-суточных крысят, родившихся в уменьшенных по численности пометах ($n=7,7\pm0,7$), полученных от спаривания самок, подвергнутых удалению правого рога матки (за 1,5 мес. до спаривания) и через сутки после родов – уменьшению численности пометов до 5-6. Контролем служили крысята из пометов со средней численностью $10,8\pm1,1$, являвшиеся потомством интактных самцов и самок. В 14-суточном возрасте подопытные животные имели большие, чем контрольные, массу тела и надпочечников ($P<0,05$), семенников ($P>0,05$). Их ГМ и полушарие мозга имели увеличенную массу. Толщина коры и слоя I в собственно теменной доле (СТД) не имели достоверных межгрупповых различий. Численная плотность нейронов в слое II и V была у подопытных крыс снижена, размеры цитоплазмы нейронов гиппокампа и ядрышек в нейронах слоя II СТД – достоверно увеличены по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют, что уменьшенная численность животных в пренатальном и раннем постнатальном периоде онтогенеза отражается на показателях развития ГМ. При этом отличия с контролем однотипны и не более выражены, чем при уменьшении численности пометов только после рождения.

Ключевые слова: мозг, развитие, акселерация, морфометрия.

B.Ya. Ryzhavsii, D.I. Zhilnikov

THE EFFECT OF PRENATAL AND POSTNATAL DIMINISHING OF LITTER NUMBER ON SOME PARAMETERS OF RAT BRAIN DEVELOPMENT IN MILK PERIOD OF ONTOGENESIS

Far Eastern State Medical University, Khabarovsk

Summary

The authors studied the brain of 14 day old rats born in diminished by number litters ($n=7,7\pm0,7$), received from mating females having been exposed to the removal of right uterine horn (1,5 month before mating) and a day after delivery – with litter diminishing up to 5-6. The control group included rats from the litters with an average amount $10,8\pm1,1$, which were offspring from intact males and females. At the age of 14-days experimental animals had a higher body mass, and adrenals mass ($P<0,05$), and testes ($P>0,05$) than the control group. Their brain and cerebral hemispheres had increased mass. The thickness of cortex and parietal lobe proper layer I did not show any reliable differences between the groups. Number density of neurons in layer II and V in the experimental rats was decreased, the size of cytoplasm of hippocampus neurons and nucleoli in the neuron layer II PLP were reliably increased compared to the control group. The obtained data confirm that diminished number of animals in a litter in the prenatal and early postnatal periods ontogenesis is reflected on the parameters of brain development. At the same time, the differences with the control are of the same type and are more pronounced than when the number of animals in a litter is decreased straight after birth.

Key words: brain, development, acceleration, morphometry.

Пренатальный и ранний постнатальный этапы онтогенеза играют важнейшую роль в формировании головного мозга. Именно в это время наиболее интенсивно протекают размножение нейробластов и глиобластов, их миграция, дифференцировка, апоптоз, синаптогенез, миелинизация и др. [2, 3, 10-12]. В этот период ГМ наиболее уязвим при действии повреждающих агентов [2, 3, 5, 6, 10, 12-15]. В то же время, установлено, что наряду с воздействиями, приводящими к нарушениям и замедлению развития ГМ, имеются факторы, способные ускорять темпы этого процесса. В работах, ранее выполненных в нашей лаборатории, было установлено, что уменьшение численности эмбрионов/плодов, обусловленное удалением у крысы одного рога матки, приводит к увеличению массы ГМ и его полушарий, а также к ряду признаков ускоренного развития коры у крысят через сутки после рождения

Материалы и методы

В работе исследованы 2 группы животных – взрослых крыс и их 14-суточное потомство. Животные обеих групп содержались в условиях одного вивария, получали в свободном доступе воду и разнообразный корм *ad libitum*. Экспериментальное исследование было проведено в соответствии с принципами «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях».

Опытную группу (3 помета, 23 крысенка) составляли 14-суточные крысята из экспериментальных пометов. Они являлись потомством 3-3,5-месячных самок, подвергнутых в возрасте 2 месяцев удалению правого рога матки и последующему (через 1,5 месяца) спариванию с интактными самцами такого же возраста. После рождения потомства определяли численность пометов и, через сутки, количество крысят в них уменьшали до 5-6 (в близком к равному соотношении самцов и самок). Контрольная группа (5 пометов, число родившихся крысят – 54) представляла потомство интактных самок и самцов, полученное от их спаривания в 3-3,5-месячном возрасте. Гравиметрической, морфометрической и гистохимической обработке подвергался ГМ всех животных из экспериментальных пометов (всего – 16) и 21 крысенка из пометов контрольной группы, отобранных методом случайной выборки.

Эвтаназию осуществляли декапитацией, определяли массу тела крыс, ГМ и правого полушария, а также семенника и надпочечника. Левое полушарие фиксировали в жидкости Карнуа, из СТД готовили парафи-

[2, 5]. Было также показано, что у крысят, родившихся в пометах средней численности, искусственно уменьшенных через сутки после рождения (оставлено – 4-6 животных в помете), в возрасте 5, 14, 30, 40 и 60 суток имелись увеличение абсолютной массы ГМ, полушария, а также регистрировался ряд морфометрических и гистохимических показателей, свидетельствовавших об ускоренных темпах развития неокортекса и гиппокампа [2, 4, 5, 7, 9]. В связи с этим, возникает вопрос о том, будут ли «суммироваться» выявленные изменения в развитии ГМ у крысят, матери которых были подвергнуты удалению одного рога матки, что обусловливает снижение численности эмбрионов/плодов в эмбриогенезе, а затем, через 1 сутки после рождения, уменьшению их численности до 4-6 в помете. Изучение этого вопроса явилось целью настоящей работы.

новые срезы толщиной 7 мкм, окрашивали их 1 % метиленовым синим и галлоцианином по Эйнарсону для выявления нуклеиновых кислот.

Проводилось обзорное изучение препаратов, их морфометрическое исследование. Последнее включало в себя: определение толщины коры и ее слоя I при помощи окуляр-микрометра МОВ-15. Определение плотности расположения нейронов производили в программе «Видеотест Морфология 5». Препараты фотографировали цифровой камерой при увеличении окуляра $\times 10$, объектива $\times 40$ в слоях II и V СТД. На площади не менее 50000 мкм² в каждом слое определяли число нейронов, рассчитывали их количество на площадь 10 000 мкм². На аппарате «Мекос» в слоях II и V коры СТД, а также в поле CAI гиппокампа измеряли площадь сечения нейронов, их цитоплазмы, ядер и ядрышек. На препаратах, окрашенных галлоцианином, определяли концентрацию РНК в цитоплазме этих клеток.

На криостатных срезах правого полушария, толщиной 20 мкм, в нейронах коры слоя II и V СТД а также поля I гиппокампа изучали активность NADH-d и NADPH-d по [1]. Интенсивность гистохимических реакций оценивали на аппарате «Мекос» по оптической плотности продуктов реакции в цитоплазме нейронов каждой из указанных областей коры. Обработка количественных данных проведена с применением программы Statistica с использованием дескриптивной статистики и корреляционного анализа. Межгрупповые различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Средняя численность крысят, родившихся у самок опытной группы составила $7,7 \pm 0,7$; у контрольных она равнялась $10,8 \pm 1,1$. Таким образом, удаление одного рога матки у матери существенно уменьшило величину пометов в эмбриональном и плодном периодах онтогенеза ($P < 0,05$). В опытной группе, где количество крысят в каждом помете через сутки после рождения было уменьшено до 5-6, масса их тела в 14-суточном возрасте достоверно и значительно превышала таковую в контроле ($27,8 \pm 0,76$ г против $18,9 \pm 0,39$ г).

Имелась также тенденция к увеличению массы семенника ($33,6 \pm 2,1$ против $30,0 \pm 1,3$ мг, $P > 0,05$) и увеличение массы надпочечника ($3,9 \pm 0,16$ против $3,2 \pm 0,1$ мг, $P < 0,05$).

Абсолютная масса ГМ и полушария также были у подопытных крысят большими, чем у контрольных (1142 ± 17 мг и $449 \pm 8,4$ мг против $1061 \pm 16,1$ мг и $402 \pm 5,1$ мг, соответственно). Сопоставление этих данных с полученными ранее при изучении животных, у которых уменьшение пометов проводили только

после рождения, без удаления рога матки у матери, масса мозга в опыте составляла $1174 \pm 16,2$ мг против $1048 \pm 16,3$ мг в контроле, масса полушария – $431 \pm 14,5$ против $397 \pm 6,4$ мг в контроле. Это свидетельствовало о том, что увеличение массы ГМ и полушария у крысят опытной группы, изученных в настоящей работе, не превышало его, имевшегося у подопытных животных, развивавшихся в пренатальном периоде в пометах, одинаковых по численности с таковыми в контроле [7]. Таким образом, влияние на массу мозга, обусловленное отдельным воздействием уменьшения численности эмбрионов/плодов в пренатальном периоде и уменьшением численности пометов только после рождения, не суммировалось при сочетании такого уменьшения в пренатальном периоде и после рождения – в неонатальном и молочном периодах онтогенеза. При этом относительная масса ГМ у подопытных животных была (в связи с увеличением массы тела) существенно уменьшена (таблица).

Таблица

Влияние уменьшения численности пометов на показатели развития головного мозга потомства

	Группы	
	контроль	опыт
Масса тела, г	$18,9 \pm 0,39$	$27,8 \pm 0,76^*$
Масса мозга абс., мг	$1061 \pm 16,1$	$1142 \pm 17^*$
Масса мозга отн., мг/г	$56,8 \pm 0,78$	$41,3 \pm 0,78^*$
Масса полушария, мг	$402 \pm 5,1$	$449 \pm 8,4^*$
Толщина коры, слоя I, мкм	$1206 \pm 33,$ $121 \pm 6,7$	$1238 \pm 34,$ $126 \pm 5,0$
Размеры нейронов, мкм ² , слой II слой V гиппокамп	$134 \pm 3,9,$ $169 \pm 5,5,$ $144 \pm 5,1$	$137 \pm 3,5,$ $177 \pm 3,8,$ $156 \pm 4,0$
Число нейронов в поле зрения, слой II слой V	$29,7 \pm 1,1,$ $14,8 \pm 1,2$	$24,4 \pm 2,1^*,$ $11,6 \pm 0,7^*$
НАДН-д, слой II, усл. ед.	$0,584 \pm 0,036$	$0,499 \pm 0,038$
НАДН-д, V, усл. ед.	$0,518 \pm 0,034$	$0,557 \pm 0,044$
НАДН-д, гиппокамп, усл. ед.	$0,752 \pm 0,056$	$0,680 \pm 0,066$
НАДРН-д, слой II, усл. ед.	$0,585 \pm 0,041$	$0,462 \pm 0,042$
НАДРН-д, слой V, усл. ед.	$0,533 \pm 0,036$	$0,474 \pm 0,041$
НАДРН-д, гиппокамп, усл. ед.	$0,752 \pm 0,079$	$0,515 \pm 0,100$

Морфометрическое изучение толщины коры ГМ и ее слоя I в СТД не выявило достоверных межгрупповых различий (таблица). Поскольку масса полушария у подопытных крыс превышала ее в контроле, можно предполагать, что суммарный объем коры (прежде всего в СТД), у них был больше, чем у контрольных крысят. При этом плотность расположения нейронов в коре, закономерно снижающаяся по мере развития ГМ [2, 3, 5, 10], в слое II и V СТД у подопытных крысят

была достоверно меньше, чем у крысят контрольной группы (таблица). Корреляционный анализ показал отрицательные связи сильной и средней силы между массой тела и абсолютной массой ГМ, с одной стороны, и числом нейронов в поле зрения слоя V неокортекса СТД ($r = -0,76$ и $r = -0,51$, соответственно).

Размеры нейронов в слое II и V коры СТД, а также в гиппокампе не имели достоверных межгрупповых различий. При этом в нейронах всех исследованных локализаций имела тенденция к увеличению в группе подопытных животных. В нейронах гиппокампа наблюдалось увеличение как площади сечения ядер ($97 \pm 2,8$ мкм² против $90 \pm 3,9$ мкм²), так и цитоплазмы, которое было статистически значимым ($56 \pm 1,4$ мкм² против $51 \pm 0,7$ мкм², $P < 0,05$). Ранее увеличение размеров нейронов гиппокампа наблюдалось также у крысят из пометов, уменьшенных через сутки после рождения [7]. Кроме того, нейроны слоя II в СТД имели большие, чем контрольные, размеры ядрышек ($3,7 \pm 0,14$ мкм² против $3,3 \pm 0,12$ мкм²). Концентрация РНК в цитоплазме исследованных нейронов не имела достоверных межгрупповых отличий.

Активность НАДН-д в нейронах слоя V и гиппокампа, а также активность НАДФН-д в нейронах слоя II, V и гиппокампа, отражающая соответственно интенсивность внутримитохондриального и внемитохондриального окисления [8], в ГМ у подопытных крысят превышала ее у контрольных, однако отличия не были статистически достоверными (таблица).

Изложенные результаты позволяют считать, что ГМ животных экспериментальной группы имел ряд признаков опережающего развития [3]: большую абсолютную массу, увеличение массы полушария, уменьшение численной плотности нейронов в неокортексе СТД, достоверное увеличение размеров цитоплазмы нейронов гиппокампа, ядрышек в нейронах слоя II. Эти отличия от контроля однотипны с описанными ранее при изучении ГМ 1-дневных крысят с экспериментальной акселерацией, обусловленной удалением у матери одного рога матки [3, 5] и 14-дневных крысят из пометов, численность которых через сутки после родов была уменьшена до 4 [3-5]. При этом сочетание обоих воздействий, произведенное в настоящей работе, не привело к «суммированию» и усилению эффектов, наблюдавшихся в ранее выполненных работах.

В работе подтверждено, что уменьшение численности пометов приводит к появлению признаков акселерации, включающей в себя отличия от контроля показателей развития ГМ. При этом эффекты, выявляемые при сочетанном воздействии пренатального уменьшения численности развивающегося потомства и уменьшения числа крысят после рождения, не увеличивают степень различий развития ГМ подопытных и контрольных животных.

Литература

1. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. – М.: Мир, 1982. – Т. 2. – 270 с.
2. Максимова Е.В. Онтогенез коры больших полушарий. – М.: Наука, 1990. – 183 с.
3. Рыжавский Б.Я. Развитие головного мозга: отдаленные последствия влияния некомфортных условий. – Хабаровск: Издательство ДВГМУ, 2009. – 278 с.

4. Рыжавский Б.Я., Лазинская О.В. Особенности головного мозга крыс при экспериментальной акселерации // *Морфология*. – 2017. – № 3. – С. 99-100.

5. Рыжавский Б.Я., Лазинская О.В., Литвинцева Е.М., Матвеева Е.П. Особенности развития головного мозга при экспериментальной акселерации и ретардации // *Асимметрия*. – 2018. – Т. 12, № 3. – С. 446-451.

6. Рыжавский Б.Я., Лебедько О.А., Лазинская О.В. Влияние сдерживающей рост диеты на некоторые показатели развития головного мозга крыс (ближайшие и отдаленные последствия) // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2019. – Т. 167, № 1. – С. 113-119.

7. Рыжавский Б.Я., Ткач О.В. Морфологические особенности головного мозга крыс при акселерации в неонатальном и молочном периодах онтогенеза // *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2016. – № 2. – С. 93-96.

8. Стайер Л. Биохимия. – М., 1984. – Т. 2. – 310 с.

9. Ткач О.В., Демидова О.В., Рыжавский Б.Я. Особенности поведения одномесячных и двухмесячных

крыс при акселерации // *Дальневосточный медицинский журнал*. – 2015. – № 3. – С. 86-93.

10. Цехмистренко Т.А., Козлов В.И. Гистофизиологический подход в изучении структурной организации коры мозга человека в онтогенезе // *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2016. – № 2. – С. 103-108.

11. Ikonomidou C. Triggers of apoptosis in the immature brain // *Brain Dev.* – 2009. – 31(№ 7). – P. 488-492.

12. Laron Z., Galatzer A. Growth hormone, somatostatin and prolactin – relationship to brain function // *Brain Dev.* – 1985. – Vol. 7, № 6. – P. 559-567.

13. Saintonge J., Côté R. Brain development in relation to fetal weight and maternal glucose tolerance during normal gestation // *Brain Dev.* – 1987. – Vol. 9, № 1. – P. 26-32.

14. Tando S., Itoh K., Yaoi T., Ikeda J. et al. // Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development // *Brain Dev.* – 2007. – Vol. 29, № 6. – P. 352-356.

15. Yang B., Ren B.X., Tang F.R. Prenatal irradiation-induced brain neuropathology and cognitive impairment // *Brain Dev.* – 2017. – Vol. 39, № 1. – P. 10-22.

Literature

1. Lloida Z., Gossrau R., Shibler T. Histochemistry of enzymes. – М.: Мир, 1982. – Vol. 2. – 270 p.

2. Maksimova E.V. Ontogenesis of cerebral cortex. – М.: Nauka, 1990. – 183 p.

3. Ryzhavsky B.Ya. Brain development: remote consequences of exposure to uncomfortable conditions. – Khabarovsk: Publishing House of the Far Eastern State Medical University, 2009. – 278 p.

4. Ryzhavsky B.Ya., Lazinskaya O.V. Peculiarities of rats' brain in experimental acceleration // *Morphology*. – 2017. – № 3. – P. 99-100.

5. Ryzhavsky B.Ya., Lazinskaya O.V., Litvintseva E.M., Matveeva E.P. Peculiarities of rats' brain in experimental acceleration and retardation // *Asymmetry*. – 2018. – Vol. 12, № 3. – P. 446-451.

6. Ryzhavsky B.Ya., Lebedko O.A., Lazinskaya O.V. The effect of growth restraining diet on some indicators of brain development in rats (immediate and long-term consequences) // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2019. – Vol. 167, № 1. – P. 113-119.

7. Ryzhavsky B.Ya., Tkach O.V. Morphological peculiarities of the rats' brain in acceleration during neonatal ontogenesis // *Pacific Medical Journal*. – 2016. – № 2. – P. 93-96.

8. Staier L. Biochemistry. – М.: Mir, 1984. – Vol. 2. – 310 p.

9. Tkach O.V., Demidova O.V., Ryzhavsky B.Ya. Behavioral peculiarities of one and two-month-old rats during acceleration // *Far Eastern Medical Journal*. – 2015. – № 3. – P. 86-89.

10. Tsekhmistrenko T.A., Kozlov V.I. Histophysiological approach in the study of the structural organization of the human cerebral cortex in ontogenesis // *Pacific Medical Journal*. – 2016. – № 2. – P. 103-108.

11. Ikonomidou C. Triggers of apoptosis in the immature brain // *Brain Dev.* – 2009. – Vol. 31, № 7. – P. 488-492.

12. Laron Z., Galatzer A. Growth hormone, somatostatin and prolactin – relationship to brain function // *Brain Dev.* – 1985. – Vol. 7, № 6. – P. 559-567.

13. Saintonge J., Côté R. Brain development in relation to fetal weight and maternal glucose tolerance during normal gestation // *Brain Dev.* – 1987. – Vol. 9, № 1. – P. 26-32.

14. Tando S., Itoh K., Yaoi T., Ikeda J. et al. // Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development // *Brain Dev.* – 2007. – Vol. 29, № 6. – P. 352-356.

15. Yang B., Ren B.X., Tang F.R. Prenatal irradiation-induced brain neuropathology and cognitive impairment // *Brain Dev.* – 2017. – Vol. 39, № 1. – P. 10-22.

Координаты для связи с авторами: Рыжавский Борис Яковлевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ДВГМУ, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru; Жильников Дмитрий Игоревич – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ДВГМУ, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru.

