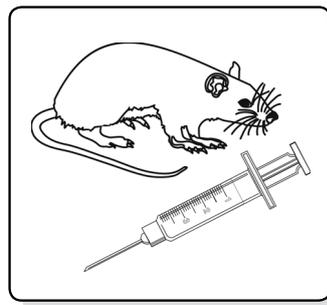


# Теоретическая и экспериментальная медицина



<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2020-1-66-69>

УДК 618.831-018.:823]-071:599.323.4-053.31

Б.Я. Рыжавский<sup>1</sup>, Ю.Б. Малофей<sup>2,1</sup>, Д.А. Цекатунов<sup>2</sup>, Д.И. Жильников<sup>1</sup>

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС В НЕОНАТАЛЬНОМ И МОЛОЧНОМ ПЕРИОДЕ

<sup>1</sup>Дальневосточный государственный медицинский университет,  
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-30-53-11, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;

<sup>2</sup>Краевой клинический центр онкологии,  
680042, ул. Воронежское шоссе, 164, тел. 8-(4212)-41-60-72, e-mail: kkco@mail.ru, г. Хабаровск

### Резюме

Изучался процент Ki-67-позитивных клеток в субвентрикулярной зоне боковых желудочков, зубчатой извилине и поле I гиппокампа в мозге 5- и 14-суточных крыс. Установлено, что как у 5-суточных, так и у 14-суточных животных максимальная доля пролиферирующих клеток была в субвентрикулярной зоне, минимальная – в поле I гиппокампа. В зубчатой извилине доля Ki-67-позитивных клеток у 5-суточных составляла 70,8 % от таковой в субвентрикулярной зоне, у 14-суточных крыс она была значительно меньше (11,9 %). Высказывается предположение о том, что у крыс в этом возрастном интервале происходят изменения значимости разных нейрогенных ниш в увеличении численности образующихся нейронов и глиоцитов.

*Ключевые слова:* головной мозг, пролиферация, Ki 67-позитивные клетки, неонатальный и молочный период.

B.Ya. Ryzhavskii<sup>1</sup>, U.B. Malofey<sup>2,1</sup>, D.A. Tsekatonov<sup>2</sup>, D.I. Zhilnikov<sup>1</sup>

## IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF PROLIFERATIVE POTENTIAL IN THE RAT BRAIN IN THE NEONATAL AND LACTIC PERIOD

<sup>1</sup>Far Eastern State Medical University;

<sup>2</sup>Regional oncology center, Khabarovsk

### Summary

The authors studied the percentage of Ki-67-positive cells in subventricular zone of the lateral ventricles, the dentate gyrus and hippocampal field 1 in the brain of 5- and 14-day-old rats. It was found out that in 5-day and 14-day-old animals the maximum percentage of proliferating cells was revealed in subventricular area, the minimum in the hippocampal field 1. In the dentate gyrus, the proportion of Ki-67-positive cells in 5-day-old was 70,8 % of that in subventricular area, in 14-day-old rats it was significantly lower (11,9 %). It was suggested that rats in this age interval demonstrated changes of the significance of the different neurogenic niches showing the increase in the number of generated neurons and gliocytes.

*Key words:* brain, proliferation, Ki 67-positive cells, neonatal and lactic period.

В настоящее время доказано, что клетки головного мозга, в том числе нейроны, являются обновляющейся популяцией. Имеется множество доказательств дифференцировки нейронных стволовых клеток как в глиоциты, так и в нейроны. Данный процесс является многоступенчатым, он начинается с трансформации нейрональных и глиальных предшественников, проходит ряд промежуточных стадий и завершается

включением дифференцированных нейронов в нейрональную сеть [1-3]. Основными зонами расположения региональных нейронных стволовых клеток во взрослом мозге являются субвентрикулярная зона боковых желудочков и зубчатая извилина гиппокампа, обозначаемых как специальные ниши стволовых клеток, микроокружение которых позволяет им сохранять свою идентичность, влияет на пролиферацию и диф-

ференцировку их потомков. При этом данные положения считаются справедливыми как для развивающегося, так и для взрослого мозга [1, 2, 6, 9, 13].

Нейрогенез в течение ранних этапов органогенеза мозга имеют важнейшее значение для определения его свойств в последующем. Это относится, в частности, к перинатальному и молочному периодам онтогенеза,

#### Материалы и методы

Исследовался головной мозг 5- и 14-суточных крыс линии Вистар, потомства 4-5 месячных интактных самцов и самок. Все животные родились в пометах средней величины (число крысят – 8-10). В работе исследовались животные 2 групп. В первой – изучались крысы в возрасте 5 суток (неонатальный период), во второй – в возрасте 14 суток (молочный период). Крысы обеих групп содержались в одинаковых условиях вивария, корм и воду получали *ad libitum*. Содержание животных и эвтаназия проводились согласно «Правилам проведения работ с экспериментальными животными» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.09. 1977 г.).

Эвтаназия животных 1-й группы была проведена в возрасте 5 суток, 2-й – в возрасте 14 суток. Определялись масса тела и головного мозга животных. Головной мозг фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [4] в течение 24 часов. Затем его переносили в 90 % этанол и заливали в парафин. Иммуногистохимическое исследование проводили с определением экспрессии маркера пролиферативной активности Ki67 по стандартному протоколу на срезах толщиной 4 мкм, прошедших в области собственно теменной доли, с использованием моноклональных мышинных антител к Ki67 (клон MM1, Leica). Препараты подверга-

#### Результаты и обсуждение

Обзорное изучение препаратов показало, что Ki67-позитивные клетки выявляются в разных отделах полушарий головного мозга крыс (рис. 1-4). При определении таких клеток у 5-суточных животных (1-я группа) было установлено, что как в 1-й, так и во 2-й подгруппе их максимальная доля характерна для субвентрикулярной зоны в области боковых желудочков, средняя – для зубчатой извилины, минимальная – для поля I гиппокампа. При расчете показателей на всю 1-ю группу было установлено, что плотность расположения Ki67-позитивных клеток в зубчатой извилине гиппокампа составляла 70,8 % от таковой в субвентрикулярной зоне. В поле I гиппокампа число Ki67-позитивных клеток было существенно меньшим, что обнаруживалось как при обзорном изучении препаратов, так и при их подсчете (рис. 1-3, табл.). Оно равнялось 12,7 % от имевшегося в субвентрикулярной зоне.

Значительный процент пролиферирующих клеток в исследованных зонах мозга соответствуют данным об их ведущей роли как ниш, где локализована основная часть стволовых нейральных клеток мозга млекопитающих, в частности, грызунов [1, 5, 9-13]. Изучение неокортекса показало, что здесь также имеются Ki67-позитивные клетки, плотность расположения которых здесь была значительно меньшей, чем в субвентрикулярной зоне и гиппокампе, а их расположение было неравномерным в разных участках неокортекса, даже в

в течение которых у таких животных как крысы происходит увеличение массы органа более чем в 5 раз [5, 7, 8], обеспечиваемое в значительной мере нейрогенезом. В связи с этим представляет интерес вопрос об интенсивности в данном отрезке онтогенеза пролиферации в различных нейрогенных нишах. Изучению данного вопроса посвящена настоящая работа.

лись обзорному изучению, исследовалась доля Ki-67-позитивных клеток в субвентрикулярной зоне боковых желудочков, зубчатой извилине и поле I гиппокампа. Цифровые микрофотографии нейрогенных ниш и неокортекса, полученные при увеличении микроскопа 15×40, импортировались в программу Видеотест – Морфология 5, в которой определяли долю Ki67-иммунопозитивных структур, рассчитывавшуюся как процент иммунопозитивных клеток к их общему числу в исследуемых зонах полушария на основании подсчета на 700-1000 клеток зубчатой извилины и поля I гиппокампа, 150-250 клеток субвентрикулярной зоны. Меньшее число клеток, на котором проводилось определение доли Ki-67-позитивных клеток в субвентрикулярной зоне, было обусловлено меньшими размерами этой зоны и меньшим числом клеток в ней.

Статистическая обработка материала проведена в программе Statistica 6. Проводился подсчет относительных показателей, средних арифметических величин и их стандартных ошибок. Достоверность отличий между группами оценивалась с применением t-критерия Стьюдента с поправкой для малых групп и критерия Фишера. Межгрупповые различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

пределах одного слоя коры и одной корковой колонки (рис. 1-4).



Рис. 1. Ki67-позитивные клетки в субвентрикулярной зоне бокового желудочка мозга 5-суточной крысы. Увеличение 15×40



Рис. 2. Ki67-позитивные клетки в зубчатой извилине гиппокампа 5-суточной крысы. Увеличение 15×40

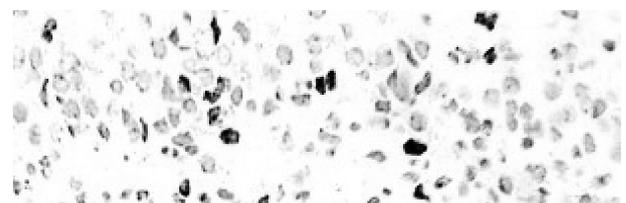


Рис. 3. Ki67-позитивные клетки в поле I гиппокампа 5-суточной крысы. Увеличение 15×40



Рис. 4. Ki67-позитивные клетки в неокортексе 5-суточной крысы. Увеличение 15×40

У 14-суточных крыс соотношение плотности расположения Ki67-позитивных клеток в разных нейрогенных нишах имело общие черты с наблюдавшимся у 5-суточных животных. Максимальная доля пролиферирующих клеток была в субвентрикулярной зоне боковых желудочков, минимальная – в поле I гиппокампа. Вместе с тем, сопоставление соотношения интенсивности пролиферации в изучавшихся зонах мозга обнаружило и отличия от имевшегося у 5-суточных крыс. В мозге 14-суточных животных пролиферативная активность в зубчатой извилине составляла лишь 16,5 % от имевшейся в субвентрикулярной зоне, то есть была в 4,2 раза меньше, чем у 5-суточных. В то же время, плотность расположения этих клеток в поле I гиппокампа равнялась 11,9 % от имевшейся в субвентрикулярной зоне, то есть соотношение числа Ki67-позитивных клеток в этих двух зонах было близким к наблюдавшемуся у 5-суточных крыс.

Таким образом, как у 5-суточных, так и у 14-суточных крыс доля Ki67-позитивных клеток была наиболее высокой в субвентрикулярной зоне. В зубчатой извилине мозга крыс этот показатель существенно различался у 5- и 14-суточных животных, значительно уменьшаясь в мозге последних. В поле I гиппокампа интенсивность пролиферации как у 5-, так и у 14-суточных крыс была ниже, чем в субвентрикулярной зоне и зубчатой извилине (таблица).

Сопоставление доли Ki67-позитивных клеток в разных нейрогенных нишах у 5- и 14-суточных крыс позволяет предполагать, что в этом возрастном интер-

вале, характеризующемся интенсивным ростом массы мозга, происходят изменения значимости разных нейрогенных ниш в увеличении численности образующихся нейронов и глиоцитов, вносящем важный вклад в более чем двукратное увеличение массы мозга (табл.) и полушария, а также толщины его коры [7].

Таблица

Количество Ki67-позитивных клеток в разных пролиферативных нишах мозга крыс в неонатальном и молочном периодах онтогенеза

Показатели	5-суточные крысы (n=10)	14-суточные крысы (n=6)
Масса тела, г	9,6±0,3	19,1±1,2*
Масса мозга, мг	429±10	1152±64*
<b>% Ki67-позитивных клеток:</b>		
- субвентрикулярная зона;	20,9±3,4	28,5±4,8
- зубчатая извилина;	14,8±0,91	4,7±0,7*
- поле I гиппокампа	3,1±0,25	3,4±0,9

Примечание. \* – различия между группами статистически значимы.

Оценивая полученные результаты, следует принимать во внимание, что они отражают **долю** Ki67-позитивных клеток, а не их **суммарное количество** в каждом из исследованных отделов мозга, поскольку оно зависит и от размеров каждой из нейрогенных ниш. Это следует особо отметить в связи с тем, что в настоящей работе изучались показатели пролиферативной активности у животных, мозг которых имел достоверные различия по массе (таблица). В связи с этим для интегральной оценки пролиферативного потенциала каждой из нейрогенных ниш необходимы данные не только о доле клеток, метящихся маркерами пролиферации, но и данные об объеме каждой из этих ниш, численности клеток в них. Получение такой информации требует проведения специальных исследований.

В то же время, мы полагаем, что полученные в работе результаты могут представлять интерес при изучении пролиферативной активности предшественников нейронов и глиоцитов в разных нейрогенных нишах головного мозга в ранние периоды постнатального онтогенеза в норме, а также при различных экспериментальных воздействиях.

В работе установлены соотношения показателей пролиферативной активности в разных нейрогенных нишах головного мозга крыс, показаны их различия в неонатальном и молочном периодах онтогенеза. Полученные результаты могут представлять интерес при исследованиях онтогенетического развития мозга в норме, патологии и при экспериментальных воздействиях.

### Литература

1. Гомазков О.А. Нейрогенез как организующая функция взрослого мозга. Достаточно ли доказательств? // Успехи современной биологии. – 2016. – Т. 136, № 3. – С. 227-246.
2. Гомазков О.А. Сигнальные молекулы как регуляторы нейрогенеза взрослого мозга // Нейрохимия. – 2013. – Т. 30, № 4. – С. 273-288.
3. Комлева Ю.К., Осипова Е.Д., Моргунов А.В., Тепляшина Е.А., Салмин В.В., Малиновская Н.А., Пожиленкова Е.А., Салмина А.Б. Современные технологии культивирования стволовых клеток головного мозга // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 8. – С. 587-597.
4. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Отеллин В.А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содер-

жащих соли цинка, в нейростологических исследованиях // Морфология. – 2006. – Т. 129, № 1. – С. 85-86.

5. Матвеева Е.П., Рыжавский Б.Я. Морфометрические особенности субвентрикулярной зоны мозга новорожденных крыс, различающихся величиной массы мозга и степенью развития неокортекса // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 93-95.

6. Ревещин Ф.В., Пустогаров Н.А., Нерадовский А.В., Павлова Г.В. Нейрогенные ниши взрослого мозга млекопитающих // Цитология. – 2016. – Т. 58, № 6. – С. 478-481.

7. Рыжавский Б.Я. Развитие головного мозга: отдаленные последствия влияния некомфортных условий. – Хабаровск: Изд-во ДВГМУ, 1990. – 278 с.

8. Рыжавский Б.Я., Рудман Ю.Ю., Учакина Р.В. Особенности гистофизиологии яичников и надпочечников самок крысы, дающих потомство с опережающим развитием головного мозга // Морфология. – 2005. – № 4. – С. 101-104.

#### Literature

1. Gomazkov O.A. Neurogenesis as an organizing function of the adult brain. Is there enough evidence? // Advances in Modern Biology. – 2016. – Vol. 136, № 3. – P. 227-246.

2. Gomazkov O.A. Signaling molecules as regulators of neurogenesis in the adult brain // Neurochemistry. – 2013. – Vol. 30, № 4. – P. 273-288.

3. Komleva Yu.K., Osipova E.D., Teplyashina E.A., Salmin V.V., Malinovskaya N.A., Pozhilenkova E.A., Salmina A.B. Modern technologies of cultivating of brain stem cells // Cytology. – 2018. – Vol. 60, № 8. – P. 587-597.

4. Korzhovsky D.E., Grigoryev I.P., Otellin V.A. Use of zinc-containing dehydrating fixatives for neurohistological studies // Morphology. – 2006. – Vol. 129, № 1. – P. 85-86.

5. Matveeva E.P., Ryzhavsky B.Ya. Morphometric features of subventricular zones of the brain of the newborn rats differing in size of weight of the brain and degree of neocortex development // Far Eastern Medical Journal. – 2011. – № 4. – P. 93-95.

6. Revishchin F.V., Pustogarov N.A., Neraдовский A.V., Pavlova G.V. Neurogenic niche of the adult mammalian brain // Cytology. – 2016. – Vol. 58, № 6. – P. 478-481.

7. Ryzhavsky B.Ya. Brain development: remote consequences of the influence of unfavorable conditions. –

9. Biran V., Joly L.M., Héron A., Vernet A., Véga C., Mariani J., Renolleau S., Charriaut-Marlangue C. Glial activation in white matter following ischemia in the neonatal P7 rat brain // Exp Neurol. – 2006. – Vol. 199, № 1. – P. 103-112.

10. Buono K.D., Goodus M.T., Guardia Clausi M. Jiang Y., Loporchio D., Levison S.W. Mechanisms of mouse neural precursor expansion after neonatal hypoxia-ischemia // J Neurosci. – 2015. – Vol. 35, № 23. – P. 8855-8865.

11. Guzzetta A., Baldini S., Bancale A., Baroncelli L., Ciucci F. Massage accelerates brain development and the maturation of visual function // Neuroscience. – 2009. – Vol. 29, № 18. – P. 6042-6051.

12. Kriegstein A.R., Gotz M. Radial glia diversity: a matter of cell fate // Glia. – 2003. – Vol. 43. – P. 37-43.

13. Spiegler M., Villapol S., Biran V., Goyenvalle C., Mariani J., Renolleau S., Charriaut-Marlangue C. Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2007. – Vol. 66, № 6. – P. 481-90.

Khabarovsk: Publishing House of the Far Eastern State Medical University, 1990. – 278 p.

8. Ryzhavsky B.Ya., Rudman Yu.Yu., Uchakina R.V. Peculiarities of ovarian and adrenal histophysiology in female rats producing the offspring with an accelerated brain development // Morphology. – 2005. – № 4. – P. 101-104.

9. Biran V., Joly L.M., Héron A., Vernet A., Véga C., Mariani J., Renolleau S., Charriaut-Marlangue C. Glial activation in white matter following ischemia in the neonatal P7 rat brain // Exp Neurol. – 2006. – Vol. 199, № 1. – P. 103-112.

10. Buono K.D., Goodus M.T., Guardia Clausi M. Jiang Y., Loporchio D., Levison S.W. Mechanisms of mouse neural precursor expansion after neonatal hypoxia-ischemia // J Neurosci. – 2015. – Vol. 35, № 23. – P. 8855-8865.

11. Guzzetta A., Baldini S., Bancale A., Baroncelli L., Ciucci F. Massage accelerates brain development and the maturation of visual function // Neuroscience. – 2009. – Vol. 29, № 18. – P. 6042-6051.

12. Kriegstein A.R., Gotz M. Radial glia diversity: a matter of cell fate // Glia. – 2003. – Vol. 43. – P. 37-43.

13. Spiegler M., Villapol S., Biran V., Goyenvalle C., Mariani J., Renolleau S., Charriaut-Marlangue C. Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2007. – Vol. 66, № 6. – P. 481-90.

**Координаты для связи с авторами:** Рыжавский Борис Яковлевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ДВГМУ; Малофей Юлия Борисовна – канд. биол. наук, биолог ПАО КГБУЗ ККЦО; Цекатунов Дмитрий Анатольевич – зав. ПАО КГБУЗ ККЦО; Жильников Дмитрий Игоревич – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ДВГМУ.

