Фундаментальная медицина

Оригинальное исследование
УДК 612.827:599.323.4-001.8
http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2025-2-10

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МОЗЖЕЧКА КРЫС В МОЛОЧНОМ ПЕРИОДЕ ОНТОГЕНЕЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АКСЕЛЕРАЦИИ

Борис Яковлевич Рыжавский[1]✉, Анна Васильевна Ланшакова[2], Юлия Борисовна Малофей[3]

[1-3]Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск, Россия
[1]✉19151943@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-4320-8341

Аннотация. Изучался мозжечок 14-, 20- и 30-суточных крыс Вистар 2 групп. Экспериментальные животные содержались в пометах, уменьшенных через сутки после родов до 6 крысят. Число крысят в контрольных пометах не изменялось после родов и равнялось 9-12 в каждом помете. Установлено, что крысята из пометов уменьшенной численности имели признаки акселерации: большую массу тела и гонад. Масса мозга у них также была больше, чем у контрольных. Масса мозжечка и прилежащей к нему части ствола мозга у крысят опытной группы 14- и 20-суточного возраста была достоверно больше, чем в контроле. Толщина нейрогенного слоя коры у 14-суточных крыс экспериментальной группы была меньше, чем в контроле. Число Ki67-клеток у 14-суточных крыс экспериментальной группы в нейрогенном слое и зернистом слое превышало таковое в контроле. Это наблюдалось и в 30-суточном возрасте. Число GFAP-позитивных клеток у 14- и 20-суточных крыс экспериментальной группы также было больше, чем у крыс контрольной группы. В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что мозжечок крыс с акселерацией, обусловленной уменьшением численности пометов, имеет признаки опережающего развития, то есть те особенности, которые были описаны при изучении развития неокортекса и гиппокампа у крыс-акселератов.

Ключевые слова: мозжечок, развитие, акселерация, иммуногистохимия, морфометрия

Для цитирования: Рыжавский Б.Я. Морфометрические и гистохимические особенности мозжечка крыс в молочном периоде онтогенеза при экспериментальной акселерации / Б.Я. Рыжавский, А.В. Ланшакова, Ю.Б. Малофей // Дальневосточный медицинский журнал. – 2025. – № 2. – С. 59-64. http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2025-2-10.

MORPHOMETRIC AND HISTOCHEMICAL FEATURES OF THE RAT CEREBELLUM IN THE MILK PERIOD OF ONTOGENESIS DURING EXPERIMENTAL ACCELERATION

Boris Ya. Ryzhavskii[1]✉, Anna V. Lanshakova[2], Yulia B. Malofey[3]

[1-3]Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russia
[1]✉19151943@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-4320-8341

Abstract. The cerebellum of 14-, 20- and 30-day-old Wistar rats of 2 groups was studied. The experimental animals were kept in litters reduced to 6 baby rats a day after delivery. The number of baby rats in the control litters did not change after childbirth and was 9-12 in each litter. It was found that the rats from the litters of reduced numbers had signs of acceleration: a large body weight and gonads. They also had more brain mass than the controls. The mass of the

cerebellum and the adjacent part of the brain stem in the experimental group of 14- and 20-day-old rats was significantly bigger than in the control. The thickness of the neurogenic layer of the cortex in the 14-day-old rats of the experimental group was less than in the control. The number of Ki67 cells in the 14-day-old rats of the experimental group in the neurogenic layer and granular layer exceeded that in the control. This was also observed at the age of 30 days. The number of GFAP-positive cells in the 14- and 20-day-old rats of the experimental group was also higher than in the rats of the control group. Taken together, the results obtained indicate that the cerebellum of rats with acceleration due to a decrease in the number of litters has signs of advanced development, that is, those features that were described when studying the development of the neocortex and hippocampus in accelerated rats

Keywords: cerebellum, development, acceleration, immunohistochemistry, morphometry

For citation: Ryzhavskii B.Ya. Morphometric and histochemical features of the rat cerebellum in the milk period of ontogenesis during experimental acceleration / B.Ya. Ryzhavskii, A.V. Lanshakova, Yu.B. Malofey, et al. // Far Eastern medical journal. – 2025. – № 2. – P. 59-64. http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2025-2-10.

Акселерация – явление, характеризующееся ускоренными темпами соматического развития, более ранним, чем у предыдущих поколений, половым созреванием, в течение многих десятилетий наблюдалась у населения различных стран, в том числе СССР и РФ [1]. Она была описана также у крыс Вистар [2]. Изучение крыс с экспериментальной акселерацией показало, что они имели признаки опережающего развития головного мозга (ГМ). Они проявлялись большими массой ГМ и его полушарий, толщины неокортекса, морфометрических характеристик разных компонентов нейронов, уменьшением численной плотности нейронов и увеличением численной плотности глиоцитов. Эти отличия были выявлены в разных зонах неокортекса а также в гиппокампе [3, 4]. В то же время, влияние акселерации на развитие мозжечка не исследовалось. Изучение этого вопроса заслуживает внимания в связи с тем, что мозжечок выполняет такие важные функции как координация движений и равновесия, регуляция пищевого поведения, иммунных реакций, когнитивных процессов, памяти, эмоций [5-8]. С другой стороны, развитие мозжечка имеет ряд особенностей, отличающих его от развития других отделов ГМ и представляющих значительный интерес. В частности, поверхностный слой его коры является нейрогенным и обозначается как наружный зернистый слой (НЗС). У человека он закладывается с 9-11-й недели пренатального периода и выявляется в течение 1-го года постнатального периода. У крыс этот слой имеется со времени начала постнатального периода онтогенеза до возраста 20-22 суток. Исчезновение этого слоя является следствием миграции его клеток в глубжележащие слои коры и дифференцировки в их нейроны или глиоциты [5-10].

В связи с отсутствием данных о развитии мозжечка при акселерации целью настоящей работы явилось изучение особенностей его развития у крыс при экспериментальной акселерации, обусловленной уменьшением численности пометов.

Материалы и методы

Исследован мозжечок 14-, 20- и 30-суточных крыс Вистар, рожденных в пометах средней численности (n=9-12), полученных при спаривании интактных 2,5-3-месячных самок и 4-5-месячных самцов. Каждая возрастная группа состояла из животных: 1) содержавшихся в пометах, численность которых через сутки после рождения была уменьшена до 6 (опытная группа, акселераты); 2) развивавшихся в пометах исходной численности (9-12 особей). Изучался мозжечок у крыс из 6 пометов 14-суточных животных опытной группы и 4 – контрольной группы. В каждой возрастной группе 20- и 30-суточных крыс изучался мозжечок крыс 2 пометов опытной группы и 2 пометов – контрольной группы. Содержание и последующая эвтаназия животных проводились согласно ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Контрольные и опытные животные всех возрастных групп содержались одновременно в условиях одного вивария, корм и воду получали в свободном доступе ad libitum. Их эвтаназию проводили декапитацией. У всех животных для определения признаков акселерации определялись масса тела, а у 20- и 30-суточных – и масса гонад. Также измерялась масса ГМ. Масса мозжечка определялась вместе с лежащей непосредственно вентральнее его частью ствола ГМ, включавшего продолговатый мозг и мост (Bregma -7,6–12,0) [11, 12]. Гистологическому исследованию подвергался мозжечок всех крыс из пометов опытной группы (6 животных, оставленных в каждом помете) и по 6 крыс, отобранных методом случайной выборки из всех пометов контрольной группы. Мозжечок вместе со стволом фиксировали в забуференном растворе 10 % формалина с цинком. Материал проводился через этанол-изопропаноловую батарею, заливался в парафин. На микротоме Leica (Германия) готовили парафиновые срезы толщиной 5 мкм в области 5Cb [12], которые наносились на предметные стекла, обработанные поли-L-лизином. Препараты, окрашенные метиленовым синим, подвергались обзорному изучению. На их цифровых микрофотографиях в программе ImageView измеряли толщину коры, молекулярного слоя (МС) и зернистого слоя (ЗС), подсчитывалось количество

клеток Пуркинье на 500 мкм извилины. Иммуногистохимическое исследование выполнялось с помощью системы Novolink™ Polymer Detection System с использованием моноклональных мышиных антител к Ki67 (клон MM1, Leica) и антител к кислому фибриллярному белку (GFAP) (C9, Cloud-clone Corp.). На срезах с выявлением активности Ki67, на основании измерений в 10 участках в борозде мозжечка, отдельно определялась толщина НЗС. При увеличении микроскопа 15×100 определялось общее число нейронов в 10 000 мкм^2 данной зоны и количество среди них Ki67-позитивных на основании их определения в 10 полях зрения, каждое площадью не менее 1 000 мкм^2. На препаратах, окрашенных на GFAP, определяли количество тел глиоцитов на площади 100 000 мкм^2 зернистого слоя коры мозжечка по их количеству в 10 полях зрения с площадью не менее 10 000 мкм^2.

Все морфометрические исследования проводили в средней части борозд коры мозжечка. Статистическая обработка материала проводилась в программе Statistica 10.0. Определяли среднюю арифметическую и ее ошибку (M±m), медиану, нижний и верхний квартиль (Me, Q1, Q3). Достоверность различий между группами оценивалась с применением критерия Манна-Уитни. Они считались статистически значимыми при P<0,05.

Результаты и обсуждение

Крысы из пометов уменьшенной численности в возрасте 14, 20 и 30 суток отличались от контрольных большей массой тела. Ее превышение в данных возрастных группах над контролем составило 35 %, 60 % и 11,6 % соответственно. Определение массы гонад, проведенное у 20- и 30-суточных животных, показало, что она превышала таковую у контрольных. Так, у 20-дневных самок опытной группы масса яичников была больше, чем у контрольных на 33,3 %, масса семенников в 30-суточных самцов – на 20,6 % (табл. 1). Таким образом, крысы из пометов уменьшенной численности имели признаки, рассматриваемые как свидетельство акселерации [1, 2]. Вместе с этими различиями показателей соматического развития крыс сравниваемых групп, они отличались также по массе ГМ. У крыс из экспериментально уменьшенных пометов она достоверно превышала ее у крыс контрольной группы в 14-, 20- и 30-суточном возрасте (табл. 1). Эти данные согласуются с полученными ранее [3, 4]. Масса мозжечка и ствола при этом у крыс экспериментальной группы была достоверно большей, чем у контрольных животных в возрасте 14 и 20 суток. В 30-суточном возрасте эти различия не были статистически достоверными (табл. 2).

Таблица 1 – Морфометрические показатели развития крыс экспериментальной и контрольной групп разного возраста

Группа / Показатели	14-суточные				20-суточные				30-суточные			
	опыт		контроль		опыт		контроль		опыт		контроль	
	M±m	Me (Q1, Q3)	M±m	Me (Q1, Q3)	M±m	Me (Q1, Q3)	M±m	Me (Q1, Q3)	M±m	Me (Q1, Q3)	M±m	Me (Q1, Q3)
Масса тела, г	**25 ± 0,6**	**25 (23, 27)**	18,5 ± 0,5	18,7 (16, 20)	**44,8 ± 1,5**	**46 (41, 49)**	28 ± 1,2	25 (24, 33)	**70 ± 2**	**69 (66, 73)**	60 ± 2	62 (55, 64)
Масса ГМ, мг	**1 114 ± 9,3**	**1 125 (1 071, 1 153)**	1 004 ± 13,2	1 009 (975, 1043)	**1 366,3 ± 23,1**	**1 358 (1 308, 1424)**	1 275 ± 19,5	1 287 (1 206, 1 342)	**1525 ± 16**	1 533 1 482, 1 568)	1444 ± 22	1 411 (1 394, 1 494)
Масса семенников, мг	-				85,7 ± 5,5	89 (82, 91)	76 ± 5,3	75 (68, 89)	**287 ± 12**	**286 (277, 300)**	238 ± 16	237 (216, 281)
Масса яичников, мг					**26,8 ± 3,1**	**30 (22, 32)**	20,1 ± 2	19,5 (16, 22)	33 ± 4	28 (27, 33)	30 ± 5	27 (24, 33)

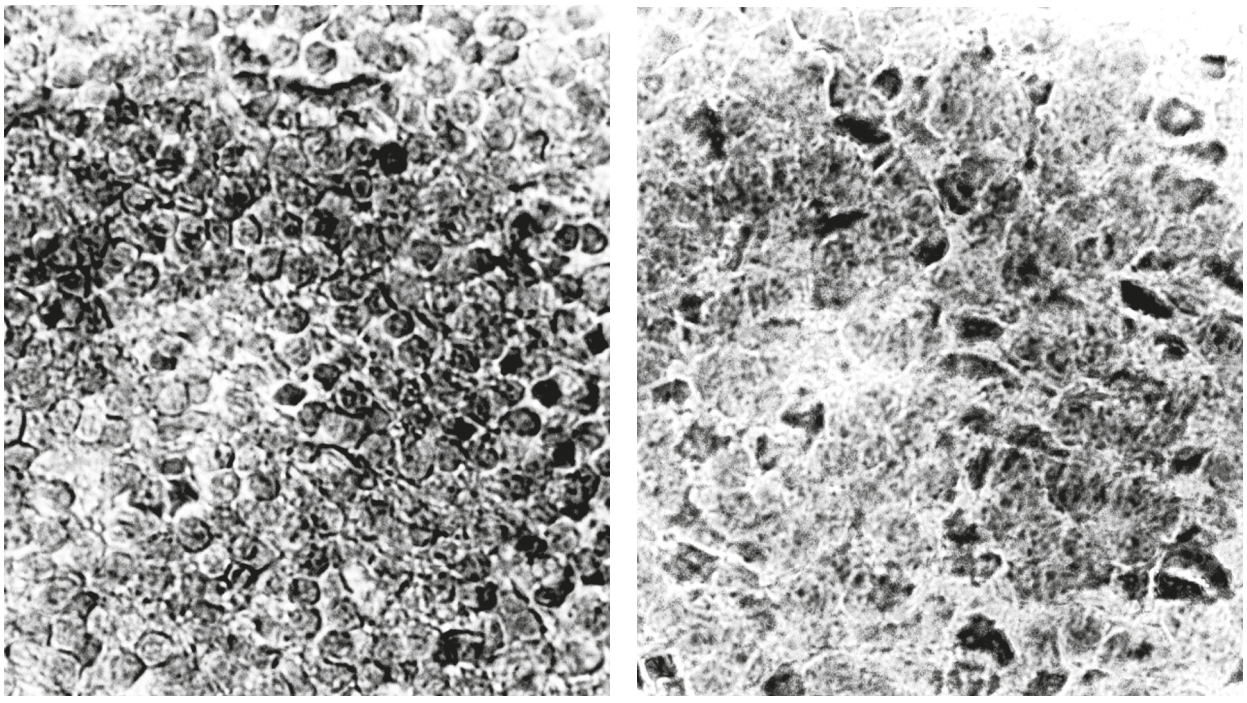
Примечание. Жирным шрифтом выделены показатели, статистически достоверно отличающиеся от контрольных.

Морфометрическое изучение мозжечка 14-суточных крыс показало, что толщина его коры а также ЗС, содержащего наибольшее число клеток [6-8], у крыс экспериментальной группы превышают их у контрольных животных. При этом численная плотность нейронов в слое клеток Пуркинье не имеет достоверных межгрупповых различий (табл. 2). Толщина НЗС, являющегося нейрогенным [5-8], у крыс опытной группы была достоверно меньшей, чем у контрольных. Поскольку в этом возрасте у крыс происходит миграция клеток вглубь коры, приводящая к исчезновению НЗС в 20-22-суточном возрасте [6-8], можно предполагать, что меньшая ее толщина в мозжечке животных подопытной группы свидетельствует о больших темпах этого процесса у крыс подопытной группы. Как признак ускорения темпов развития НЗС может рассматриваться также значительно большее число Ki67-позитивных клеток в этой зоне коры мозжечка крыс из экспериментальной группы (табл. 2). Об этом свидетельствует также большее число таких клеток в ЗС коры мозжечка 14-суточных крыс-акселератов, которое наблюдалось также и у 20- и 30-суточных крыс (рис. 1, табл. 2). По-видимому, это также может быть следствием более интенсивной миграции дифференцирующихся клеток из НЗС в ЗС коры мозжечка.

Таблица 2 – Морфометрические показатели развития мозжечка крыс экспериментальной и контрольной групп разного возраста

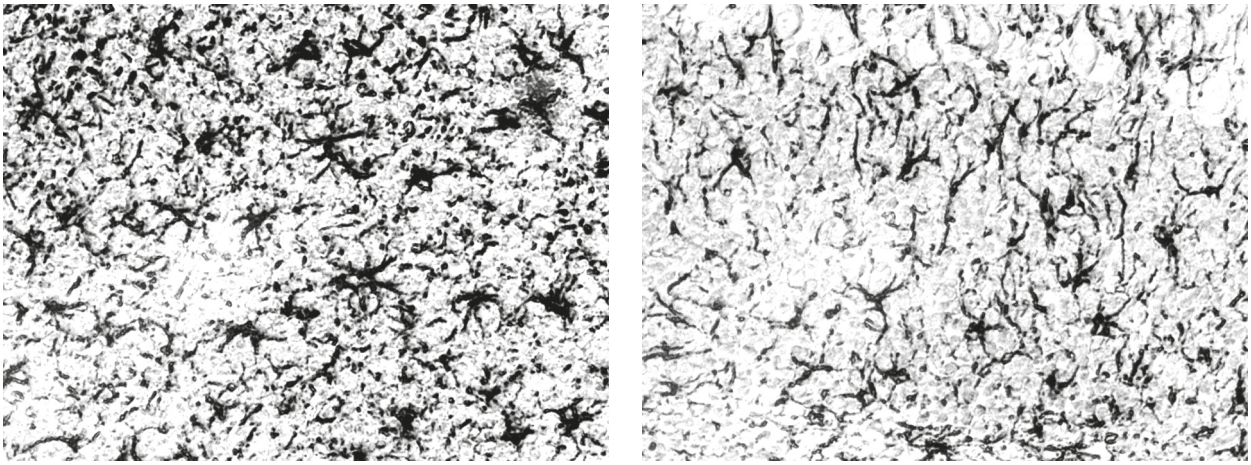
Группа / Показатели	14-суточные				20-суточные				30-суточные			
	опыт		контроль		опыт		контроль		опыт		контроль	
	M±м	**Me (Q1, Q3)**	**M±м**	**Me (Q1, Q3)**	**M±м**	**Me (Q1, Q3)**	**M±м**	**Me (Q1, Q3)**	**M±м**	**Me (Q1, Q3)**	**M±м**	**Me (Q1, Q3)**
Масса мозжечка и ствола, мг	**267 ± 6,1**	**262 (257, 269)**	232 ± 7,1	235 (226, 242)	**282,5 ± 12,7**	**268 (262, 319)**	225 ± 9,5	229 (208, 247)	311 ± 9	324 (286, 335)	303 ± 10	301 (286, 322)
Толщина коры, мкм	**271 ± 6,3**	**269 (255, 294)**	250 ± 7,1	247 (230, 267)	279,0 ± 13,6	275,1 (266, 298)	269,4 ± 6,8	269 (257, 283)	337 ± 16	342 (303, 366)	330 ± 12	339 (303, 355)
Толщина НЗС, мкм	**30,7 ± 1,2**	**30,0 (26, 34)**	33,7 ± 2,9	33 (27, 36)	-							
Толщина МС, мкм	78 ± 2,1	77 (69, 88)	76 ± 3,7	73 (67, 81)	120,3 ± 5,9	119,3 (110, 131)	113,8 ± 3,2	109,5 (105, 122)	160 ± 10	150 (132, 176)	151 ± 8	154 (125, 175)
Толщина ЗС, мкм	135 ± 3	136 (125, 144)	124 ± 4,2	120 (111, 129)	135,8 ± 6,0	138,2 (131, 147)	134,9 ± 4,2	135,3 (129, 140)	156 ± 8	149 (141, 174)	155 ± 7	158 (141, 167)
Число клеток Пуркинье в 500 мкм	9,6 ± 0,3	9,7 (9, 11)	8,7 ± 0,6	8,0 (6, 11)	8,7 ± 0,6	8,3 (7, 10)	9,1 ± 0,2	9,2 (8,7; 9,4)	8 ± 0,2	8 (7, 8)	8 ± 0,3	7 (7, 8)
Число клеток в 10 000 мкм² НЗС	260 ± 7	265 (247, 271)	246 ± 11,3	240 (224, 265)	-							
Ki-67-позитивные клеток в НЗС (%)	**79,5 ± 1,5**	**81,4 (78, 84)**	68,6 ± 1,3	68,5 (67, 72)								
Ki-67-позитивные клетки в 100 000 мкм², ЗС	14,5 ± 1,7	**13,5 (8, 21)**	7,7±1,5	6 (3,5; 9)	123,5 ± 12,3	131 (106, 137)	102,9 ± 11	101,5 (68, 123)	**183 ± 11**	**191 (157, 206)**	137 ± 8	141 (124, 156)
GFAP-позитивные клетки, в 100 000 мкм², ЗС	**124 ± 2,8**	**123 (117, 133)**	93±3	96 (83, 104)	**103,7 ± 3,6**	**105 (98, 109)**	90,5 ± 1,9	92,0 (90; 94)	75 ± 2	76 (71, 77)	69 ± 2	67 (64, 75)

Примечание. Жирным шрифтом выделены показатели, статистически достоверно отличающиеся от контрольных.



А Б

Рис. 1. Зернистый слой коры мозжечка 30-суточных крыс. Реакция на Ki67. А – экспериментальная группа, Б – контрольная группа. Увеличение 15×40



А Б

Рис. 2. Зернистый слой коры мозжечка 20-суточных крыс. Реакция на GFAP. А – экспериментальная группа, Б – контрольная группа. Увеличение 15×40

Определение количества GFAP-позитивных клеток в ЗС, отражающее темпы развития астроцитарной глии, показало, что у животных подопытной группы оно достоверно превышает данный показатель у контрольных животных (рис. 2, табл. 2). Эти различия представляют значительный интерес, поскольку астроциты являются самой многочисленной группой макроглиоцитов в ЦНС, играющей важную роль в развитии ГМ, в частности мозжечка [8, 13, 14].

У 20- и 30-суточных крыс толщина коры мозжечка, МС и ЗС увеличивалась, значительно превышая ее у 14-суточных. При этом НЗС в данных возрастных группах не обнаруживался. Эти результаты согласуются с данными о присутствии этого слоя у крыс до 20-22-дневного возраста [6-8]. Изучение Ki67-позитивных клеток показало их наличие в ЗС коры мозжечка как в группе контрольных, так и экспериментальных животных. Их число было большим у крыс экспериментальной группы, при этом межгрупповые различия были статистически достоверными только у крыс 30-суточного возраста (табл. 2). Количество GFAP-позитивных клеток в ЗС коры также было большим у крыс из уменьшенных пометов, эти различия были статистически значимыми у 20-суточных животных (рис. 2, табл. 2).

Таким образом, экспериментальное уменьшение численности пометов через сутки после родов, обусловливающее ускоренные темпы соматического развития, развития ГМ [3, 4], оказало влияние и на развитие мозжечка животных в течение молочного периода онтогенеза. Оценивая все выявленные морфометрические межгрупповые различия коры мозжечка у крыс разного возраста, следует принимать во внимание, что масса мозжечка с прилежащим к нему стволом мозга у подопытных крыс также превышает ее у контрольных крыс.

В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что мозжечок крыс с акселерацией, обусловленной уменьшением численности пометов, имеет признаки опережающего развития, то есть те особенности, которые были ранее выявлены при изучении развития неокортекса и гиппокампа у крыс-акселератов [3, 4].

Список источников

1. Величковский Б.Т., Баранов А.А., Кучма В.Р. Рост и развитие детей и подростков в России // Вестник Российской Академии наук. – 2004. – № 1. – С. 43-45.
Velichkovsky B.T., Baranov A.A., Kuchma V.R. Growth and development of children and adolescents in Russia // Bulletin of the Russian Academy of Sciences. – 2004. – № 1. – P. 43-45.
2. Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Зубенкова Э.С., Вайнсон А.А., Андрианова И.Е., Лукьянова С.Н., Лягинская А.М., Мальцев В.Н., Ильин Л.А., Самойлов А.С., Уйба В.В. Акселерация лабораторных крыс: синтетическое исследование данных за столетие в аспекте возможной связи с радиочувствительностью // Мед. радиол. и радиац. безопасность. Радиационная биология. – 2018. – Т. 63, № 6. – С. 5-20.
Koterov A.N., Ushenkova L.N., Zubenkova E.S., Vainson A.A., Andrianova I.E., Lukyanova S.N., Lyaginskaya A.M., Maltsev V.N., Ilyin L.A., Samoilov A.S., Uiba V.V. Acceleration of laboratory rats: a synthetic study of data for a hundred years in the aspect of a possible connection with radio sensitivity // Med. radiol. and radiats. safety. Radiation Biology. – 2018. – Vol. 63, № 6. – P. 5-20.
3. Рыжавский Б.Я., Ткач О.В. Морфологические особенности головного мозга крыс при акселерации в неонатальном и молочном периоде онтогенеза // Тихоокеанск. мед. журн. – 2016. – № 2. – С. 94-97.

Ryzhavskii B.Ya, Tkach O.V. The morphological features of the rats brain at acceleration of the neonatal dairy and periods ontogenesis // Pacific medical journal. – 2016. – № 2. – P. 94-97.

4. Рыжавский Б.Я., Жильников Д.И. Влияние экспериментального сокращения численности пометов у крыс в неонатальном и молочном периодах онтогенеза на некоторые показатели развития их головного мозга в 30-дневном возрасте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172, № 10. – С. 509-514.
   Ryzhavskii B. Ya., Zhilnikov D.I. The effect of experimental reduction in the number of litters in rats in the neonatal and lactic periods of ontogenesis on some indicators of their brain development at the age of 30 days // Bulletin. exp. biol. – 2021. – Vol. 172, № 10. – P. 509-514.
5. Schmahmann J.D. The cerebellum and cognition // Neurosci Lett. – 2019. – № 688. – P. 62-75.
6. Зиматкин С.М., Карнюшко О.А. Мозжечок крысы: строение, функции, онтогенез. – Гродно: ГрГМУ, 2019. 132 с.
   Zimatkin S.M., Karnyushko O.A. Rat cerebellum: structure, function, ontogenesis. – Grodno, 2019. – 132 p.
7. Калиниченко С.Г., Мотавкин П.А. Кора мозжечка. – М.: Наука, 2005. – 319 с.
   Kalinichenko S.G., Motavkin P.A. Cerebellar Cortex. – M., 2005. – 319 p.
8. Руководство по гистологии. – СПб.: СпецЛит, 2011. – Т. 1. – 832 с.
   Guide to histology. – SPb.: SpecLit, 2011. – Vol. 1. – 832 p.
9. Komuro H., Yacubava E., Yacubava E., Rakis P. Mode and tempo of tangencial cell migration in the cerebellar external granular layer // Ibid. – 2001. – Vol. 21. – P. 527-540.
10. Lin J.C., Cai L., Cepko C.L. The external granule layer of the developing chick cerebellum generates granule cells and cells of the isthmus and rostral hindbrain // J Neurosci. – 2001. – Vol. 21, № 1. – P. 159-168.
11. Khazipov R., Zaynutdinova D., Ogivetsky E., Mitruchina O., Manent J.-B., Represa A. Atlas the developing rat brain in stereotaxic coordinates // INMED, INSERM U-901 & Aix-Marseille University, Marseille, France Laboratory of Neurobiology. – Kazan: Kazan Federal University, 2013.
12. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Compact 6th Edition, Academic Press, New York. 2005. – 400 p.
13. Araujo A.P.B., CarpiSantos R., Gomes F.C.A. The role of astrocytes in the development of the cerebellum // Cerebellum. – 2019. – Vol. 18, № 6. – P. 1017-1035.
14. Martinez R., Gomes F.C. Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hor mone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factorprotein kinase a pathway // J. Neurosci. Res. – 2005. – Vol. 80, № 3. – P. 341-349.

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.
The authors declare no conflicts of interests.

Статья принята к публикации 12.04.2025.
The article was accepted for publication 12.04.2025.