

УДК 612.014.482+616.891
© О. П. Гундарова, Н. В. Маслов, 2013

ВОЗРАСТНАЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ПЕРЕСТРОЙКА КОРЫ МОЗЖЕЧКА ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС

О. П. Гундарова, Н. В. Маслов

ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко»
Минздрава России, г. Воронеж, Россия

Проведенные исследования показали высокую лабильность функционального состояния нейронов мозжечка крыс во второй половине постнатального онтогенеза. Наряду с нормохромными, встречаются реактивные нейроны по гипо- и гиперхромному типам и а их крайние проявления – пограничные нейроны. Наблюдаются также нервные клетки с альтеративными типами изменений в виде пикноморфных нейронов и клеточных теней, отражающие как старение, сопровождающееся их гибелью, так и дефекты, возникающие при гистологической обработке материала. Эти данные необходимо учитывать при анализе экспериментальных данных.

Ключевые слова: крысы, радиация, мозжечок, возрастные изменения.

© O. P. Gundarova, N. V. Maslov, 2013

Age-related Structural and Functional Reorganization of Rats Cerebellar Cortex

Studies have shown a high lability of the functional state of neurons in the cerebellum of rats in the second half of postnatal ontogenesis. Along with normochromic, are reactive by hypo- and hyperchromic type, and their extreme manifestations - border neurons. There are also neural cells alterative changes in form and neuronal cell picnomorphous and shadows reflecting the aging of neurons and defects arising from the histological processing of the material. These data must be taken into account in the analysis of experimental data.

Keywords: rat, radiation, cerebellum, age-related changes

Введение

Для оценки радиационных эффектов в отдаленные сроки после облучения необходимо дифференцировать их от возрастных изменений, происходящих в изучаемых органах. Учитывая, что изучение радиационных воздействий на человеке не допустимо [1], в экспериментах чаще всего используются белые беспородные крысы массой 210 ± 10 г, (возраст 4 мес.), что соответствует возрасту человека 27–30 лет. В литературе имеются сведения о возрастной перестройке теменной и лобной коры крыс во второй половине антенатального онтогенеза [3, 4]. Описание аналогичных изменений в мозжечке и коре у крыс в литературе отсутствуют. Между тем возрастные изменения могут нивелировать или наоборот усиливать действие ионизирующего излучения, что затрудняет оценку конечного результата эффектов малых радиационных воздействий.

Материал и методы исследования

Данный эксперимент спланирован и проведен в Государственном научно-исследовательском испытательном институте Военной медицины МО РФ. В его

основу положены данные о лучевой нагрузке у военнослужащих-ликвидаторов аварии на ЧАЭС и состоянии их здоровья в ранние и отдаленные сроки пострадиационного периода. Исследование выполнено на 30 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 210 ± 10 г в возрасте 4 месяца (к началу эксперимента), что соответствует 27–30 годам жизни ликвидаторов, облученных γ -квантами ^{60}Co спектр 1.2 МэВ однократно в дозе 10, 20, 50 и 100 сЗв с мощностью дозы 50 сГр/ч. Для человека это соответствует дозам облучения от 5 до 50 сЗв. Такой интервал между указанными дозами облучения обусловлен возможностью выбора для облучения большой или меньшей дозы по сравнению с ее допустимой величиной. В первые дни после аварии допустимая доза облучения составила 10 сГр, а со снижением мощности излучения ее повышали до 50 сГр. Для ликвидаторов-вертолетчиков, с учетом профессиональных вредностей, допустимая доза составила 25 сГр. Коэффициент экстраполяции дозы облучения крыс на человека – 2; следовательно, 25 сГр для человека сопоставима с 50 сГр для крыс. Материал извлекали через 1 сутки, что соответствует времени возможной первичной реакции на облучение, 6 – что сопоставимо с воз-

растом профессионального долголетия ликвидаторов – 38–40 лет, 12 – что представляет собой предельный возраст для военнослужащих 45–50 лет, 18 и 24 месяцев пострадиационного периода, что свидетельствует о том, что исследование проведено в течение полной продолжительности жизни ликвидаторов [2, 3].

Материал фиксировали в 10 % растворе формалина, в смеси Карнуа, а также в 80 % пропаноле. Объекты заливали в парафин и готовили срезы толщиной 6 мкм. Обзорные препараты окрашивали гематоксилином-эозином, структурно-функциональную организацию нейроцитов изучали на препаратах, окрашенных по Нисслю. Белок выявляли по Бонхегу (Лилли Л., 1969), а нуклеиновые кислоты (ДНК в ядрах, РНК в цитоплазме и ядрышках нейроцитов) по методам Brachet J. L. (1942) и S.K. Shea (1970) с соответствующим контролем РНК – и ДНКазой.

Исследованию подвергались нейроны мозжечка, который составляя 10 % массы головного мозга, включает в себя более половины всех нервных клеток. В радиобиологии нейроны мозжечка, особенно клетки Пуркинью, считаются своеобразным индикатором чувствительности к ионизирующему излучению. При анализе основное внимание уделялось таким радиационным мишеням как белок и нуклеиновые кислоты. Оценивалась также и структурно-функциональная перестройка нейронов по тинкториальным и морфометрическим показателям [6, 7]. Для объективной оценки экспериментального материала потребовалось широкое использование биометрических методов. Среди нейроцитов подсчитывали процент клеток с реактивными и деструктивными изменениями. Морфометрически определяли размеры нейронов, их цитоплазмы, ядер и ядрышек с последующим расчетом соответствующих индексов. Содержание белка и нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) определяли по величине оптической плотности конечных продуктов гистохимических реакций в видимой части спектра с помощью компьютерной программы Image J. 36 b Wayne Rasband National Institutes of Health, USA. Статистическая обработка результатов исследований проводилась на ПЭВМ с процессором DucalCore AMD Athlon 64 X2, 2200 MHz с помощью пакетов программ Statistika 6.1, MS Excel 2007.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что соотношение различных типов нейронов у животных биологического контроля изменяется на всем протяжении жизни (рис. 1). Через сутки после начала эксперимента нормохромные клетки составляют 58.8 ± 0.9 %, гипо – 18.4 ± 0.1 %, гиперхромные – 15.0 ± 0.1 %, пикноморфные клетки – 3.3 ± 0.18 %, а клеточные тени – 5.02 ± 0.18 %. Количество нейронов с деструктивными изменениями суммарно достигает 8.4 ± 5.6 %. Пикноморфные клетки и клеточные тени представляют собой необратимые потери, поэтому анализировать их целесообразно совместно. Через 6 месяцев количество деструктивных клеток увеличивается до 17.7 ± 0.5 %, а среди нормальных клеток происходит перестройка за счет увеличения количества гипохромных (25.2 ± 0.1 %) и уменьшения нормохромных нейронов (42.4 ± 1.0 %). Количество гиперхромных нейронов практически не изменяется. К 12 месяцам численность деструктивных нейронов снижается в сочетании с возрастанием до 61.0 ± 0.8 % содержания нормохромных клеток. Количество нормохромных нейронов практически соответствует исходному уровню, а число гиперхромных клеток достоверно снижено и отдельно каждая из названных типов клеток составляют 20.8 ± 0.1 % и 5.2 ± 0.1 % соответственно.

Через 18 мес. наблюдения соотношение клеток практически не меняется по сравнению с предшествующим сроком. К концу наблюдения заметно возрастает количество клеток в состоянии гибели, и суммарно они составляют 19.8 ± 0.7 %. Это происходит в основном за счет уменьшения количества нормохромных клеток (51.9 ± 1.3 %). Среди нейронов преобладали клетки в состоянии повышенной функциональной активности (гипохромные). Они составляли 19.1 ± 0.03 %, а клеток в состоянии покоя (гиперхромные) всего 9.1 ± 0.1 %. Подробно процентное соотношение нервных клеток возрастного контроля представлено на рис 1. При всех сроках наблюдения преобладают нейроны с пограничными изменениями, отражающие различные варианты физиологической нормы нейроцитов. Они представляют собой совокупность конформационных, метаболических и пролифера-

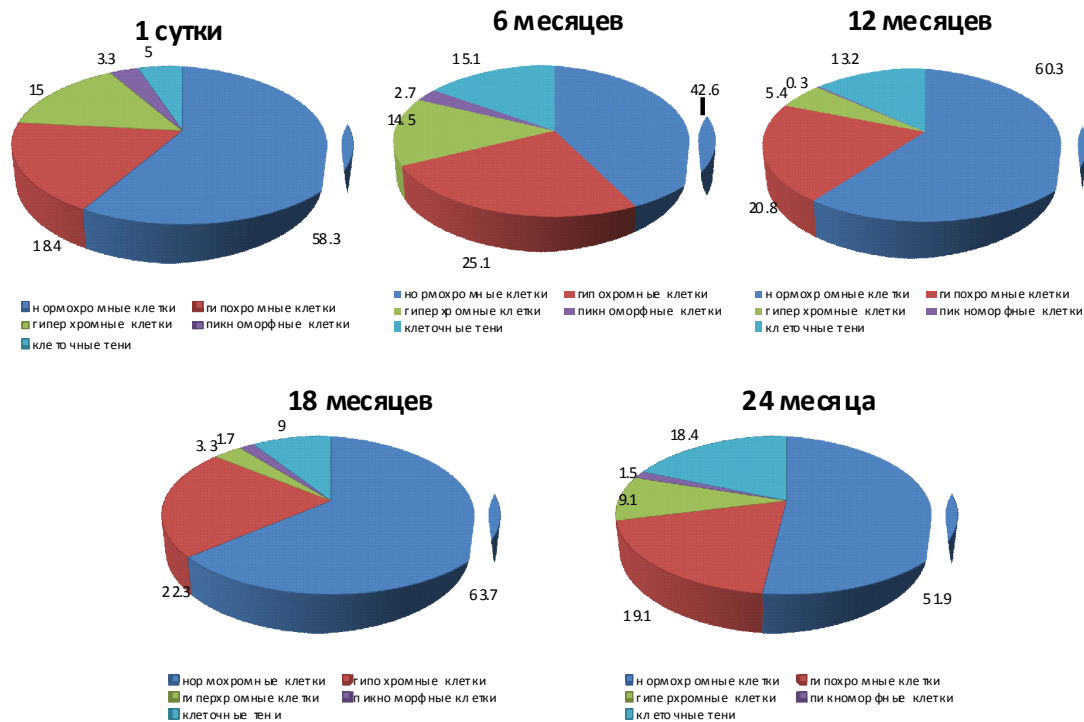


Рис. 1. Биологический контроль. Соотношение различных типов нейронов коры мозжечка (в % от общего количества). Обозначения: по периферии круговой диаграммы против секторов указано содержание типов нервных клеток в %.

тивных изменений внутриклеточных биополимеров, которые, с одной стороны, превышают объем физиологической изменчивости, а с другой – не достигают уровня типовых патологических изменений. Пограничные изменения являются проявлением “срочной” ответной реакции клеток на внешние воздействия, развивающиеся по гипо- и гиперхромному типам и отражают промежуточное между вариантами биологической нормы и патологии состояния нейронов. Пограничные изменения обратимы. Вероятно, в определенных условиях на их основе могут возникать различные формы альтеративных и адаптационных изменений.

Нервные клетки с пограничными изменениями отличаются большим разнообразием как у контрольных, так и экспериментальных животных. К ним относятся клетки с измененными величиной, формой и тинкториальными свойствами. При этом нейроны сохраняют свои основные признаки: целостность ядра, ядрышка, ядерной оболочки. Наиболее часто встречаются гипохромные клетки, отличающиеся светлой окраской цитоплазмы из-за уменьшения количества базофильного вещества, РНК и белка. Гиперхромные клетки, наоборот отличаются повышенным содержанием базофильного

вещества, РНК, белка, что обуславливает их интенсивную окраску. Основная масса нервных клеток имела структурно-функциональную организацию, соответствующую классическому представлению о строении нервной клетки. Такие нейроны еще называют нормохромными. Гипо-, гипер- и нормохромные клетки представляют собой варианты биологической нормы нервных клеток, отражающие их различную функциональную активность. Для удобства описания таких нейронов часто используется термин “нормальные нейроны”. Аналогично пикноморфные клетки и клеточные тени объединяются в группу деструктивных (альтеративных) клеток.

Морфологические изменения нейронов, составляющих вторую группу, являются необратимыми. Наиболее частым проявлением дегенеративных процессов являются пикноморфные клетки. Они образуются в результате кариоцитопикноза, имеют веретенообразную форму и небольшие размеры. Цитоплазма и ядро таких клеток гомогенизированы, интенсивно окрашены, границы ядер обычно не просматриваются. Клетка-тень характеризуется как бледная тень в виде неправильного образования в результате кариоцитолитизиса тела и ядра. К клеточным

**Структурно-функциональная характеристика клеток Пуркинье
контрольных животных**

Показатели	Время после начала эксперимента				
	1 сут.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
Площадь сечения клетки (мкм ²)	1838.7 ±61.3	1695.785 ±73.612	1272.95 ±78.14	1095.23 ±89.74	925.15 ±63.92
Площадь сечения цитоплазмы (мкм ²)	1477.0 ±49.4	1239.47 ±39.37	988.14 ±69.95	786.49 ±85.18	678.11 ±58.3
Площадь сечения ядра (мкм ²)	361.7 ±51.4	456.32 ±58.88	284.81 ±49.32	308.74 ±39.63	247.04 ±39.74
Площадь сечения ядрышка (мкм ²)	48.0 ±8.1	57.15 ±1.21	39.48 ±1.83	36.99 ±5.61	33.206 ±3.208
Ядерно-клеточный индекс	0.197 ±0.03	0.269 ±0.023	0.224 ±0.056	0.282 ±0.0541	0.267 ±0.032
Ядерно-цитоплазматический индекс	0.245 ±0.088	0.368 ±0.091	0.288 ±0.047	0.393 ±0.091	0.364 ±0.087
Ядрышко-ядерный индекс	0.133 ±0.044	0.125 ±0.011	0.139 ±0.038	0.120 ±0.008	0.134 ±0.013
Содержание белка в клетке (в экстинкциях)	1.919 ±0.034	1.799 ±0.061	1.972 ±0.057	2.623 ±0.042	1.671 ±0.045
Содержание ДНК в ядре (в экстинкциях)	2.104 ±0.085	1.879 ±0.015	1.901 ±0.021	2.395 ±0.064	1.521 ±0.010
Содержание РНК в цитоплазме (в экстинкциях)	2.978 ±0.022	2.017 ±0.014	2.091 ±0.042	2.641 ±0.069	2.174 ±0.022
Содержание РНК в ядрышке (в экстинкциях)	3.080 ±0.039	2.039 ±0.01	2.152 ±0.049	2.694 ±0.099	2.011 ±0.056

тениям относят и фрагменты нейронов, которые невозможно отличить от распавшихся клеток. Все виды изменений встречаются во все сроки наблюдения, отличаясь лишь процентным соотношением (рис. 1).

В таблице 1 представлена морфометрическая характеристика, содержание белка и нуклеиновых кислот клеток Пуркинье контрольных животных во втором периоде постнатального периода.

Приведенные в таблице данные свидетельствуют о том, что в течение жизни происходит снижение морфометрических показателей нейронов. Это происходит из-за уменьшения размеров всех компонентов клетки, особенно ее тела и цитоплазмы и в меньшей степени за счет ядра и ядрышка. При этом соотношения ядра и клетки, ядра и цитоплазмы, ядрышка и ядра не имеют выраженных изменений, что подтверждают соответствующие индексы. Можно отметить только увеличение ядерно-цитоплазматического индекса за счет несколько пониженного изменения кариометрических показателей. Содержание белка в клетках, ядерной ДНК, а также РНК ядрышек заметно снижается к концу периода наблюдения. При

этом РНК цитоплазмы снижается незначительно.

Заключение

Проведенные исследования показали, что нейроны мозжечка крыс обладают высокой лабильностью своего функционального состояния во второй половине постнатального онтогенеза. Наряду с нормохромными, встречаются реактивные по гипо- и гиперхромному типу, а также их крайние проявления – пограничные нейроны. Встречаются также нервные клетки с альтеративными изменениями в виде пикноморфных нейронов и клеточных теней, отражающие как старение нейронов и их гибель, так и дефекты, возникающие при гистологической обработке материала. В течение жизни происходит снижение морфометрических показателей нейронов, особенно тела и цитоплазмы и в меньшей степени – ядра и ядрышка. При этом соотношения ядра и клетки, ядра и цитоплазмы, ядрышка и ядра не имеют выраженных изменений. Содержание белка в клетках, ядерной ДНК, а также РНК ядрышек понижается к концу периода наблюдения. Количество

РНК цитоплазмы уменьшается незначительно. Эти данные необходимо учитывать при анализе экспериментальных данных, в связи с чем каждой экспериментальной группе должен соответствовать адекватный возрастной контроль.

Список литературы

1. Бехтерева Н. П. Здоровый и больной мозг человека / Н. П. Бехтерева. Л.: Наука, 1988. 262 с.
2. Гуськова А. К. Основные итоги и источники ошибок в установлении радиационного этиопатогенеза неврологических синдромов и симптомов / А. К. Гуськова // Журнал неврологии и психиатрии. 2007. № 12. С. 66–70.
3. Сгибнева Н. В. Морфологические изменения сенсомоторной коры крыс при различных режимах γ -облучения : автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Н. В. Сгибнева. М., 2013. 25 с.
4. Маслов Н. В. Морфофункциональное состояние теменной коры при действии малых доз ионизирующего излучения: монография / Н. В. Маслов, В. П. Федоров, Р. В. Афанасьев. Воронеж: ИПЦ “Научная книга”, 2012. 228 с.
5. Оценка психоневрологического статуса ликвидаторов радиационных аварий: мо-

нография / О. П. Гундарова, В. П. Федоров, Р. В. Афанасьев, В. Г. Зуев. Воронеж.: ИПЦ “Научная книга”, 2012. 232 с.

6. Ушаков И. Б. Нейроморфологические эффекты электромагнитных излучений / И. Б. Ушаков, В. П. Федоров, В. Г. Зуев. Воронеж: Центрально-Черноземное книжное изд-во, 2007. 287 с.
7. Федоров В. П. Экологическая нейроморфология. Классификация типовых форм морфологической изменчивости ЦНС при действии антропогенных факторов / В. П. Федоров, А. В. Петров, Н. А. Степанян // Журнал теоретической и практической медицины. 2003. Т. 1, № 1.– С. 6.

Информация об авторах

Гундарова Ольга Петровна – ассистент кафедры нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО “Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко” Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10. E-mail: episheva65@mail.ru

Маслов Николай Владимирович – к.м.н., ассистент кафедры нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО “Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко” Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10.

Поступила в редакцию 12.08.2013 г.