

УДК 591.481.1.081:575.16

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ АКСЕЛЕРАЦИИ В НЕОНАТАЛЬНОМ И МОЛОЧНОМ ПЕРИОДАХ ОНТОГЕНЕЗА

*Б.Я. Рыжавский, О.В. Ткач*

Дальневосточный государственный медицинский университет (680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35)

**Ключевые слова:** кора мозга, нейроны, дегидрогеназы, морфометрия.

### THE MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE RATS BRAIN AT AN ACCELERATION IN THE NEONATAL DAIRY AND PERIODS OF ONTOGENESIS

*B.Ya. Ryzhavskii, O.V. Tkach*

*Far Eastern State Medical University (35 Muravyova-Amurskogo St. Khabarovsk 680000 Russian Federation)*

**Background.** It was conducted the analysis of morphometric and histological features of rats brain development in the neonatal rats and dairy periods of ontogenesis when grown in litters, whose number has been greatly reduced.

**Methods.** We studied the brain 5-, 14- and 30-day-old rats from the artificially reduced after a day birth of litters. Control rats were from intact litters. On the basis of morphometry we analyzed the brain mass and degree of development of its cortex, the state of neurons and the intensity of enzymatic reactions.

**Results.** Animals of all age groups from small litters differed significantly by increased body weight, significantly greater than in the controls, and the mass of the brain hemispheres. Relative brain weight in rats of the experimental group was lower than in controls. Experimental animals had a range of morphological features to accelerate the maturation of the cerebral cortex.

**Conclusions.** Experimental animals had an important sign of acceleration - a significant advance rate of body weight increase. Differences from control brain morphometric and histochemical parameters can be regarded as evidence of intensification of intramitochondrial and extramitochondrial biological oxidation. As they grow older early developed animals, a part of the differences of early life stages, reflecting both the level of brain ontogeny and functional state of neurons is negated.

**Keywords:** cerebral cortex, neurons, dehydrogenase, morphometry

Pacific Medicak Journal, 2016, No. 2, p. 94–97.

Темпы онтогенетического развития детей в течение многих десятилетий в разных странах существенно менялись, что проявлялось такими процессами, как акселерация и ретардация. Наиболее яркими и характерными признаками акселерации считаются опережающие темпы роста массы тела и полового развития [3, 4, 7]. В связи с тем, что масса тела на ранних стадиях постнатального онтогенеза как у человека, так и у таких животных как крысы, имеет положительную связь с массой головного мозга [1, 8, 9], возник вопрос о том, каково влияние ускоренного соматического развития на его массу, морфологию различных отделов, в том числе коры. Ответ на него, представляющий как теоретический, так и практический интерес, может быть получен при исследовании мозга животных, имеющих признаки акселерации.

Учитывая данные о влиянии численности пометов у крыс на темпы их роста, в нашей лаборатории были проведены эксперименты, показавшие, что путем экспериментального уменьшения численности пометов

можно получить животных, имеющих важные признаки акселерации: существенное увеличение темпов роста массы тела и гонад, а также показателей развития последних [8]. При этом было также установлено, что в 40-дневном возрасте, то есть в препубертатном периоде онтогенеза, мозг экспериментальных животных отличался от мозга контрольных крыс увеличенной массой, а также рядом морфометрических и гистохимических характеристик нейронов неокортекса и гиппокампа [9]. В то же время известно, что наиболее интенсивно развитие мозга происходит на более ранних, чем препубертатный период, этапах [1, 6, 8]. Отражением этого служит, в частности, тот факт, что в течение первого года жизни у ребенка масса мозга возрастает почти в три раза, а у 14-дневных крыс этот показатель больше, чем у однодневных, примерно вчетверо [1, 8].

Целью настоящей работы стал анализ морфометрических и гистохимических особенностей развития мозга крыс в неонатальном (5-дневные) и молочном (14- и 30-дневные) периодах онтогенеза при выращивании в пометах, численность которых была значительно уменьшена.

**Материал и методы.** В работе изучался головной мозг 5-, 14-, 30-дневных белых крыс. Экспериментальная группа состояла из животных, выращенных в малочисленных пометах, уменьшение численности которых осуществлялось через сутки после родов путем оставления в помете по четыре особи. В каждой экспериментальной возрастной группе было исследовано по три помета. Контрольная группа включала в себя крысят из интактных пометов численностью от 10 до 13 особей. В каждой возрастной группе контроля было изучено по два помета. Животные «больших» и «уменьшенных» пометов содержались одновременно в условиях одного вивария, корм и воду получали *ad libitum*. Условия содержания животных соответствовали нормам международного и российского законодательства.

После выведения из опыта взвешиванием на электронных весах определяли массу тела, головного мозга и его полушарий. Для суждения о степени миелинизации волокон из собственно теменной доли (СТД) правого полушария готовили криостатные срезы толщиной 30 мкм, которые окрашивали суданом черным В (для выявления липидов). Концентрацию липидов в I слое и белом веществе головного мозга (под неокортексом) измеряли на аппарате МЕКОС при длине волны 600 нм. В строго стандартизированных условиях проводили

гистохимические реакции на никотинамидадениндинуклеотид- и никотинамидадениндинуклеотидфосфатдегидрогеназу (НАДН-д, НАДФН-д) [5]. Об интенсивности ферментативных реакций судили при помощи компьютерной цитоспектрофотометрии на аппарате МЕКОС по оптической плотности продуктов реакции в цитоплазме клеток, при длине волны 550 нм. При этом в каждом случае измерялась активность не менее чем в 25 нейронах каждой локализации.

Левое полушарие мозга фиксировали в жидкости Карнуа. Из переднетеменной доли (ПТД) и СТД после заливки в парафин готовили срезы толщиной 7 мкм, которые окрашивали на нуклеиновые кислоты галлоцианином по Эйнарсону. На этих срезах измеряли толщину коры и I слоя в ПТД и СТД, площади сечения ядрышек, ядер и цитоплазмы нейронов II и V слоев ПТД, СТД и гиппокампа. На этих же препаратах цитоспектрофотометрически при длине волны 550 нм определяли концентрацию РНК в цитоплазме клеток. Все перечисленные показатели находили на основании измерений, проведенных в каждом случае на 25 нейронах каждой локализации. О численной плотности нейронов в коре ПТД и СТД судили по подсчету их числа в пяти стандартных полях зрения II и V слоев. Статистический анализ количественных данных проводили методом вариационной статистики и выражали средней арифметической и ее средней ошибкой.

**Результаты исследования.** Масса тела крыс из уменьшенных пометов в 5-дневном возрасте превосходила таковую у контрольных на 19,1 %, в 14-дневном – на 82,3 %, в 30-дневном – на 29,9 %, абсолютная масса мозга – на 13,5, 12 и 10,8 % соответственно (табл.).

Максимальное количество достоверных морфометрических и гистохимических межгрупповых различий наблюдалось у крыс самой младшей группы. Животные из малочисленных пометов характеризовались увеличенной массой мозга и полушария, толщиной коры в ПТД и СТД, уменьшенной плотностью нейронов в СТД и ПТД, увеличенными размерами их ядрышек, ядер и цитоплазмы, концентрации в ней РНК. I слой и белое вещество полушария при этом имели большую степень суданофилии, чем в контроле. В 5-дневном возрасте нейроны гиппокампа отличались большей активностью НАДН-д и НАДФН-д. Активность НАДФН-д была увеличена также в нейронах II слоя (табл.).

Прирост масс тела и мозга у подопытных крыс был больше, чем у контрольных, до 14-дневного возраста. В интервале от 14- до 30-дневного возраста темпы роста массы тела и мозга у сравниваемых групп животных практически не различались, хотя масса мозга, как и масса тела у крыс из малочисленных пометов, достоверно превышала контрольные показатели (табл.).

Мозг 14-дневных подопытных крыс имел ряд признаков ускоренного развития неокортекса: большая толщина коры СТД и ПТД, I слоев СТД и ПТД, а также меньшую плотность нейронов во II и V слоях СТД и во II слое ПТД. Площадь цитоплазмы на срезах была

достоверно увеличена в нейронах II слоя СТД, II и V слоев ПТД и гиппокампа. Поскольку концентрация РНК в цитоплазме данных клеток была у животных сравниваемых групп близкой (табл.), можно полагать, что суммарное количество РНК в цитоплазме перикарионов у животных из экспериментально уменьшенных пометов было большим, чем у контрольных. Перечисленные межгрупповые отличия корковых нейронов сочетались с гистохимическими признаками ускоренной миелинизацией I слоя неокортекса, а также – белого вещества, расположенного под корой, что проявлялось большей суданофилией: в I слое концентрация суданофильных липидов в подопытной группе была на 20,8 % больше, а в белом веществе полушария – почти на 37 % больше, чем в контроле (табл.). Активность НАДН-д и НАДФН-д в нейронах не имела достоверных межгрупповых различий. В совокупности изложенные результаты свидетельствуют, что, как и у 5-дневных крыс из малочисленных пометов, у 14-дневных подопытных животных имелись признаки ускоренного созревания коры мозга.

В 30-дневном возрасте (окончание молочного периода) крысы с акселерацией характеризовались большей абсолютной массой мозга и гораздо меньшей его относительной массой, увеличенной толщиной коры, уменьшенной плотностью нейронов в неокортексе, а также повышенной концентрацией липидов в белом веществе коры. В то же время, практически все размерные характеристики нейронов, а также концентрация РНК, активность НАДН-д и НАДФН-д в их цитоплазме не имели достоверных межгрупповых различий (табл.).

**Обсуждение полученных данных.** Подопытные животные имели ярко выраженный важный признак акселерации – значительное опережение темпов роста массы тела, что согласуется с ранее полученными данными [9]. Усиленные темпы роста массы тела могут быть объяснены лучшей доступностью питания (материнское молоко), большим вниманием со стороны матери, меньшей конкуренцией за пищу и меньшей стрессогенностью среды в малочисленных пометах [7, 12]. При этом полученные данные свидетельствовали о том, что темпы роста головного мозга были значительно ниже, чем темпы увеличения массы тела, вследствие чего относительная масса мозга у животных-акселераторов была намного меньше, чем в контроле.

Статистически значимые отличия от контроля морфометрических и гистохимических параметров у животных самой младшей группы можно расценить как свидетельство интенсификации процессов внутримитохондриального и немитохондриального биологического окисления. При этом последнее тесно связано с такими важными для роста и созревания мозга процессами, как синтез нуклеиновых кислот и других биомолекул [10]. Хотя исследованные зоны коры мозга и ее слои функционально разнятся [6], характер межгрупповых отличий в них оказался однотипным. Максимальное количество отличий от контроля зарегистрировано у крысят 5-дневного возраста,

Таблица

Морфометрические и гистохимические особенности неокортекса и гиппокампа крыс в молочном периоде при акселерации

Показатель	Группа животных						
	5-дневные		14-дневные		30-дневные		
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	
Масса тела, г	8,9±0,6	10,6±0,7	18,1±0,3	33,0±1,1	61,4±2,2	79,9±3,0	
Масса головного мозга (абс.), мг	424,0±22,7	478,0±12,3	1048,0±16,3	1174,0±16,2	1371,0±23,6	1486,0±17,8	
Масса головного мозга (отн.), мг/г	48,1±0,9	46,2±2,0	58,3±0,8	35,9±0,9	22,6±0,6	18,8±0,5	
Масса полушария, мг	150,3±9,4	180,3±6,6	397,4±6,4	431,1±14,5	513,6±11,8	549,9±10,5	
Толщина коры СТД, мкм	865,0±21,7	1014,0±18,2	1185,0±25,8	1248,0±18,5	1318,0±27,8	1261,0±26,0	
Толщина I слоя СТД, мкм	73,0±2,0	94,0±2,7	142,0±4,7	160,0±2,3	134,0±4,5	155,0±4,4	
Число нейронов в п/з, слой II СТД	54,0±3,6	42,8±1,4	27,4±0,6	25,9±0,6	19,5±0,5	16,8±0,4	
Число нейронов в п/з, слой V СТД	23,0±1,0	16,7±0,3	11,5±0,4	10,3±0,3	11,4±0,4	10,1±0,3	
Площадь, мкм <sup>2</sup>	ядрышек нейронов слоя II СТД	2,5±0,1	3,0±0,1	4,5±0,1	4,9±0,2	3,8±0,1	3,7±0,1
	ядер нейронов слоя II СТД	23,4±1,2	28,8±0,9	53,5±1,8	58,0±2,8	58,7±2,1	58,9±2,1
	цитоплазмы нейронов слоя II СТД	22,1±0,5	25,4±0,9	42,7±0,9	46,6±1,0	41,0±1,3	43,2±1,3
	ядрышек нейронов слоя V СТД	3,9±0,2	4,8±0,1	6,6±0,2	6,9±0,2	5,7±0,2	5,6±0,1
	ядер нейронов слоя V СТД	45,4±3,7	59,7±2,8	99,9±4,7	104,0±6,3	94,8±3,8	95,3±3,8
	цитоплазмы нейронов слоя V СТД	35,2±2,1	41,1±1,5	81,1±3,1	85,9±2,8	85,8±4,2	74,8±3,0
	ядрышек нейронов гиппокампа	3,3±0,1	3,7±0,1	4,9±0,1	5,2±0,1	4,2±0,2	4,1±0,1
	ядер нейронов гиппокампа	39,9±1,6	45,4±1,4	77,9±3,9	82,2±3,5	66,2±3,3	69,1±1,9
цитоплазмы нейронов гиппокампа	29,9±1,0	31,7±0,1	49,9±1,7	57,9±1,9	45,7±1,3	46,7±0,9	
Толщина коры ПТД, мкм	985,0±14,0	1091,0±22,0	1550,0±13,0	1615,0±8,0	1581,0±30,0	1714,0±19,0	
Толщина I слоя ПТД, мкм	87,0±2,3	99,0±3,1	153,0±4,3	166,0±4,3	158,0±4,2	167,0±4,7	
Число нейронов в п/з, слой II ПТД	49,2±2,8	36,3±0,6	24,4±0,8	22,8±0,6	18,6±0,5	15,4±0,3	
Число нейронов в п/з, слой V ПТД	22,7±1,0	16,4±0,2	10,9±0,4	10,1±0,3	12,6±0,4	9,4±0,3	
Площадь, мкм <sup>2</sup>	ядрышек нейронов слоя II ПТД	2,8±0,1	3,1±0,1	4,8±0,1	5,0±0,2	3,9±0,1	3,9±0,1
	ядер нейронов слоя II ПТД	23,8±1,0	27,8±1,6	58,7±1,7	62,0±2,8	60,4±2,8	61,5±1,7
	цитоплазмы нейронов слоя II ПТД	23,9±0,9	26,6±1,0	45,6±1,7	51,0±1,5	42,0±1,2	46,8±1,4
	ядрышек нейронов слоя V ПТД	4,0±0,1	5,0±0,2	6,7±0,2	7,3±0,2	5,5±0,2	6,3±0,2
	ядер нейронов слоя V ПТД	47,5±3,3	61,3±2,8	98,2±4,4	107,0±5,1	97,5±4,3	101,0±3,4
	цитоплазмы нейронов слоя V ПТД	37,7±2,8	44,8±2,1	85,4±4,9	94,7±2,6	96,6±4,4	85,1±4,1
<i>Концентрация РНК в цитоплазме нейронов, усл. ед.</i>							
слой II СТД	0,276±0,012	0,328±0,016	0,402±0,014	0,413±0,022	0,288±0,011	0,314±0,014	
слой V СТД	0,255±0,014	0,310±0,020	0,416±0,023	0,435±0,025	0,339±0,011	0,367±0,010	
гиппокамп	0,315±0,011	0,349±0,018	0,386±0,013	0,422±0,026	0,347±0,014	0,381±0,020	
слой II ПТД	0,286±0,021	0,308±0,023	0,394±0,014	0,401±0,012	0,308±0,013	0,306±0,014	
слой V ПТД	0,275±0,017	0,287±0,022	0,411±0,025	0,413±0,016	0,341±0,018	0,366±0,019	
<i>Активность ферментов, усл. ед.</i>							
НАДН-д в слое II	0,446±0,016	0,460±0,031	0,368±0,018	0,380±0,024	0,392±0,020	0,348±0,017	
НАДН-д в слое V	0,367±0,021	0,402±0,019	0,328±0,021	0,371±0,031	0,313±0,013	0,315±0,011	
НАДН-д в гиппокампе	0,496±0,024	0,557±0,017	0,375±0,019	0,390±0,022	0,465±0,020	0,468±0,028	
НАДФН-д в слое II	0,412±0,017	0,507±0,020	0,416±0,013	0,417±0,020	0,462±0,022	0,445±0,015	
НАДФН-д в слое V	0,362±0,013	0,390±0,016	0,382±0,018	0,376±0,021	0,448±0,019	0,405±0,017	
НАДФН-д в гиппокампе	0,450±0,012	0,502±0,015	0,412±0,026	0,426±0,021	0,664±0,031	0,597±0,027	
<i>Концентрация липидов, усл. ед.</i>							
в слое I	0,360±0,017	0,461±0,030	0,327±0,014	0,395±0,028	0,553±0,039	0,635±0,031	
в белом веществе	0,264±0,012	0,303±0,018	0,276±0,015	0,378±0,014	0,382±0,023	0,579±0,041	

Примечание: серым выделены ячейки со статистически значимыми отличиями от соответствующего контроля.

что, по-видимому, обусловлено тем, что в первые дни жизни зависимость животных от количества молока и внимания матери особенно сильна. С другой стороны, в данном возрасте важнейшая «деятельность» крысят – получение пищи и контакты с матерью, условия

которых у животных малочисленных и контрольных помётов существенно различались.

Полученные данные свидетельствуют о том, что прирост массы тела и мозга в возрастном интервале от 14 до 30 суток у животных опытной и контрольной

групп не имел значимых отличий, хотя при этом возникшие ранее межгрупповые различия массы тела и массы мозга сохранялись. Уравнивание темпов увеличения массы тела и мозга сравниваемых групп может быть объяснено происходящим с возрастом уменьшением зависимости крысят от матери и началом питания не только материнским молоком. В результате этого различия условий развития в экспериментальных и контрольных пометах значительно уменьшались.

Стабильность межгрупповых различий была одинаковой у разных показателей развития коры. Мы полагаем, это связано с тем, что исследованные нами морфометрические характеристики можно разделить на две группы. К первой могут быть отнесены толщина неокортекса, его I слоя, численная плотность нейронов во II и V слоях, а также концентрация липидов в I слое и белом веществе. Эти показатели отражают процессы онтогенетического развития мозга [6, 8] и не могут, как и масса мозга и полушария, существенно меняться при кратковременных изменениях функционального состояния. Именно эти показатели имели у животных-акселераторов достоверные отличия от контроля, направленность которых однозначно свидетельствовала об ускоренных темпах развития неокортекса. Вторая группа показателей (размеры разных структур нейронов, их гистохимические характеристики) также претерпевала изменения в процессе онтогенеза мозга. В то же время, они могли меняться и в зависимости от функционального состояния указанных структур [2, 6, 8, 11]. Возможно, что именно этот момент обуславливал разную степень выраженности и стабильности межгрупповых различий.

Таким образом, по мере взросления животных-акселераторов часть имевшихся в ранние периоды жизни различий, отражающих как уровень онтогенеза мозга, так и функциональное состояние нейронов, в большей или меньшей степени нивелируется, что можно расценивать как отражение принципа эквивалентности. В то же время, целый ряд важных морфологических и гистохимических показателей развития мозга, его коры при акселерации отличались от контрольных до конца молочного периода, знаменующего у крыс «приближение» структуры коры мозга к таковой у взрослых животных [6, 8]. В целом, оценивая выявленные возрастные различия, можно полагать, что они могут определять не только функциональные особенности мозга в конкретном возрасте, но и, как следует из данных литературы [8, 9, 13–15], влиять на характер дальнейшего онтогенеза этого органа.

#### Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
2. Герштейн Л.М., Сергутина А.В. Некоторые морфохимические особенности гиппокампа крыс, различающихся по двигательной активности в «открытом поле» // *Нейрохимия*. 2003. Т. 20, № 2. С. 116–119.
3. Година Е.З. Секулярный тренд: история и перспективы // *Физиология человека*. 2009. Т.35, № 6. С. 128–135.
4. Красильников В.А., Будук-оол Л.К., Айзман Р.И. Морфофункциональное развитие школьников тувинской и русской национальностей // *Физиология человека*. 2008. Т. 34, № 1. С. 74–81.

5. Лойда З., Госспай Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов: лабораторные методы. М.: Мир, 1980. 270 с.
6. Максимова Е.В. Онтогенез коры больших полушарий. М.: Наука, 1990. 183 с.
7. Нетребенко О.К. Влияние питания на развитие // *Педиатрия*. 2007. Т. 87, № 3. С. 96–103.
8. Рыжавский Б.Я., Демидова О.В. Влияние половых гормонов на развитие головного мозга. Морфологический анализ // *Дальневосточный медицинский журнал*. 2013. № 2. С. 100–103.
9. Рыжавский Б.Я., Литвинцева Е.М., Р.В. Учакина. Сопоставления величины массы головного мозга с морфометрическими и гистохимическими характеристиками нейронов коры, показателями высшей нервной деятельности у крыс в препубертатном периоде онтогенеза // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2009. Т. 148, № 8. С. 236–240.
10. Стайер Л. Биохимия. Т. 2 / пер. с англ. М.: Мир, 1984. 312 с.
11. Хухо Ф. Нейрохимия. Основы и принципы / пер. с англ. М.: Мир. 1990. 384 с.
12. Guestry P. The role of nutrition in brain development // *Prev. Med.* 1998. Vol. 27, No. 2. P. 269–270.
13. Kesler S.R., Reiss A.L., Vohr B. [et al.]. Brain volume reductions within multiple cognitive systems in male preterm children at age twelve // *J. Pediatr.* 2008. Vol. 152, No. 4. P. 513–520.
14. Maia C.D., Ferreira V.M., Kahwage R.L. [et al.]. Adult brain nitergic activity after concomitant prenatal exposure to ethanol and methyl mercury // *Acta. Histochem.* 2009. Vol. 4, No. 9. P. 134–139.
15. Räikkönen K., Forsen T., Henriksson M. [et al.]. Growth trajectories and intellectual abilities in young adulthood: The Helsinki Birth Cohort // *Am. J. Epidemiol.* 2009. Vol. 170, No. 4. P. 447–455.

Поступила в редакцию 15.09.2015.

#### Морфологические особенности головного мозга крыс при акселерации в неонатальном и молочном периодах онтогенеза

Б.Я. Рыжавский, О.В. Ткач

*Дальневосточный государственный медицинский университет (680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35)*

**Введение.** Проведен анализ морфометрических и гистохимических особенностей развития мозга крыс в неонатальном и молочном периодах онтогенеза при выращивании в пометах, численность которых была значительно уменьшена.

**Материал и методы.** Изучался головной мозг 5-, 14- и 30-дневных крыс из искусственно уменьшенных через сутки после рождения пометов. Контролем служили крысята из интактных пометов. На основании морфометрии анализировали массу мозга и степень развития его коры, состояние нейронов и интенсивность ферментативных реакций.

**Результаты исследования.** Животные всех возрастных групп из малочисленных пометов отличались значительно увеличенной массой тела, достоверно большими, чем в контроле, массой мозга и полушария. Относительная масса мозга у крысят подопытных групп была меньше, чем в контроле. Экспериментальные животные имели ряд морфологических признаков созревания коры мозга.

**Обсуждение полученных данных.** Подопытные животные имели ярко выраженный важный признак акселерации – значительное опережение темпов роста массы тела. Отличия от контроля морфометрических и гистохимических параметров мозга можно расценить как свидетельство интенсификации процессов внутримитохондриального и внемитохондриального биологического окисления. По мере взросления животных-акселераторов часть имевшихся в ранние периоды жизни различий, отражающих как уровень онтогенеза мозга, так и функциональное состояние нейронов, нивелируется.

**Ключевые слова:** кора мозга, нейроны, дегидрогеназы, морфометрия.