

## НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТЬ НЕЙРОННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ ЦНС БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИ АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Яценко А.Д., Орлянская Т.Я., Актюшина Г.А.

*Омский Государственный медицинский университет, Омск, e-mail: kafbioogma@mail.ru*

Изучались разные варианты влияния различных антропогенных факторов на преобразование белкового фонда ассоциативных нейронов коры головного мозга, мозжечка и спинномозговых ганглиев спинного мозга белых крыс. В качестве моделей антропогенных факторов использовали алкоголь, асфиксию и условия клеточного содержания. Влияние алкоголя изучали на примере нейронных популяций клеток слоя II–III коры переднего мозга, в которых объектом исследования были нуклеопротеиновые комплексы. Влияние асфиксии изучали на примере нейронных популяций молекулярного слоя, ганглиозного слоя и зубчатого ядра коры мозжечка. В нейронах мозжечка исследовали общие белки с помощью интерферометрии. Воздействие условий клеточного содержания у белых лабораторных крыс рассматривали на примере нейронов спинномозговых ганглиев шейного и поясничного отделов спинного мозга. В нейронах ганглиев анализировали нейроспецифические структурные белки, которые выявляли реакцией с амидочерным 10Б. В качестве контрольной группы в третьем случае были набраны полуподземные синантропные серые крысы. У экспериментальных животных, испытывающих влияние алкоголя, в сравнении с контрольными белыми крысами в нейронах коры переднего мозга отмечены изменения степени хромофилии нуклеопротеидных комплексов. У белых крыс под влиянием асфиксии в нейронах мозжечка выявлены изменения количества общих белков. У лабораторных крыс, испытывающих условия клеточного содержания, в сравнении с серыми синантропными крысами в нейронах спинномозговых узлов изменились содержание и концентрация нейроспецифических структурных белков.

Ключевые слова: нервная система, нейрон, морфометрия, интерферометрия, цитофотометрия, грызуны.

## NEUROPLASTICITY OF DIFFERENT PARTS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF WHITE RATS IN THE CONDITIONS OF ANTHROPOGENIC IMPACT MODEL

Yacenko A.D., Orlyanskaya T.J., Aktoshina G.A.

*Omsk State Medical University, Omsk, e-mail: kafbioogma @ mail.ru*

We studied different variants of the influence of various anthropogenic factors on the transformation of the protein Fund of associative neurons of the cerebral cortex, cerebellum, and spinal ganglia of the spinal cord of white rats. Alcohol, asphyxia and cellular conditions were used as models of anthropogenic factors. The influence of alcohol was studied on the example of neural populations of cells of layer II-III of the forebrain cortex, in which the object of study were nucleoprotein complexes. The influence of asphyxia was studied on the example of neural populations of the molecular layer, ganglion layer and dentate nucleus of the cerebellar cortex. In cerebellar neurons, common proteins were examined by interferometry. The effect of the conditions of cell content in white laboratory rats was considered on the example of neurons of the spinal ganglia of the cervical and lumbar spinal cord. Neurons of ganglia were analyzed for neurospecific structural proteins, which were detected by reaction with amidochernym 10B. as a control group in the third case were recruited semi-subterranean synanthropic gray rats. In experimental animals affected by alcohol, in comparison with control white rats, changes in the degree of chromophilia of nucleoprotein complexes were observed in neurons of the forebrain cortex. In white rats, under the influence of asphyxia in cerebellar neurons revealed changes in the number of total proteins. Changes in the content and concentration of neurospecific structural proteins were found in neurons of spinal nodes in laboratory rats experiencing conditions of cell content, in comparison with gray synanthropic rats.

Keywords: nervous system, neuron, morphometrie, interferometrie, citophotometrie, rodentia.

Афферентные элементы в структуре интегративной системы первыми воспринимают изменения окружающей среды или испытывают воздействие антропогенного фактора [1]. Нейроны выполняют специфические функции с участием нейропептидов. Количественные различия белкового фонда в нейронах контрольной и опытной групп могут служить

доказательством внешнего воздействия на организм, а также способны быть показателем адаптивных перестроек в определенных нейронных популяциях нервной системы, что подтверждают многочисленные исследования [2, 3].

Нуклеопротеидные комплексы – показатели уровня метаболических процессов. В течение последних десятилетий многие исследователи при изучении компенсаторных возможностей нервной системы в качестве показателя уровня синтетических реакций в нервных клетках оценивали хромотофильную субстанцию [4, 5]. Общие белки в нейронах, обеспечивающие основные функции нервных клеток, многократно изучались в норме и в эксперименте [6, 7]. Нейроспецифические структурные белки, определяющие форму, размеры, пространственное положение нейронов и осуществляющие внутриклеточный транспорт веществ, очень важны при изучении модульной организации спинного мозга и при исследовании спинномозговых ганглиев [8, 9].

Представитель отряда Грызуны – Крыса белая – представляет особый интерес как основной объект в научных исследованиях при изучении экстремальных воздействий на нервную систему – алкоголя или асфиксии. Крыса серая – полуподземное синантропное животное, приближенное к жилищу человека [10]. В процессе видообразования у нее сформировался металокомоторный тип двигательных реакций: при движении основной толчок обеспечивается поясом задних конечностей, передние являются амортизационными [11]. Крыса белая – лабораторный альбинос Крысы серой с аналогичным типом локомоции, испытывает влияние клеточного содержания: искусственное освещение, увеличение светового дня, отсутствие потребности постоянного поиска пищи. У животного происходят значительные изменения нейромышечных реакций двигательного анализатора. Крысу серую и Крысу белую можно сравнивать как серую и белую расы одного вида, различающиеся средой обитания и моторикой.

Цель исследования – сравнительный анализ количественных и качественных показателей белкового фонда нейронов слоя II–III коры больших полушарий головного мозга, клеток коры мозжечка и нейронов спинномозговых ганглиев шейного и поясничного отделов спинного мозга крыс в условиях модели антропогенного воздействия: алкоголь, асфиксия, клеточное содержание.

### **Материалы и методы исследования**

На моделях антропогенного воздействия исследовалось влияние асфиксии на нейроны коры мозжечка, влияние алкоголя – на примере клеток слоя II–III коры головного мозга, воздействие клеточного содержания – на примере клеток спинномозговых узлов белых лабораторных крыс. Вышеперечисленные нейронные популяции как центробежные элементы в структуре двигательного анализатора первыми испытывают любое внешнее

воздействие. В нейронах слоя II–III коры головного мозга изучали нуклеопротеидные комплексы, в нейронах мозжечка – общие белки, в нейронах спинномозговых ганглиев исследовали нейроспецифические структурные белки. Экспериментальные группы животных состояли в среднем из 9–10 особей. У представителей контрольных групп (из 9–10 животных) забирали передний мозг, мозжечок или спинной мозг и спинномозговые ганглии от шейного и поясничного отделов. Забор животных проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приложение к приказу Министерства здравоохранения РФ от 12.08.1997 г. № 755) и рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных.

Влияние алкоголя изучали по методике В.Е. Высокогорского: перорально вводили этанол в дозах 8 г/кг и 4 г/кг массы животных (что соответствовало 2 мл и 1 мл 48%-ного раствора этанола на 100 г массы). Головной мозг у экспериментальных животных забирали через 1 час и через 1 сутки после введения алкоголя. Депарафинизированные срезы коры окрашивали тионином по Нисслю. В нейронах слоя II–III коры больших полушарий белых крыс с помощью морфометрического анализа исследовали нуклеопротеидные комплексы по степени хромофилии.

Экспериментальную модель асфиксии создавали путем пережатия интубационной трубки в течение 7 минут с последующим оживлением. Общие белки в клетках коры мозжечка изучали с помощью интерферометрии. Анализировали показатели белкового фонда (содержание и концентрацию) после асфиксии в остром периоде, через 1 час и через 1 сутки.

Влияние условий клеточного содержания на нервную систему животных изучалось на примере нейронов спинномозговых ганглиев шейного и поясничного отделов спинного мозга у представителей одного вида, различающихся средой обитания и двигательными реакциями. В качестве контрольной группы рассматривали синантропное животное – Крысу серую, адаптированную в процессе видообразования к полуподземному образу жизни. В качестве опытной группы изучали Крысу белую лабораторную – альбиноса Крысы серой, которая содержалась в клеточных условиях. Крысы серые были набраны в жилой зоне города Омска. Структурные белки в нейронах выявляли гистохимической реакцией с амидочерным 10Б. Содержание структурных белков и их концентрацию (т.е. среднее количество белка в одном пикселе) в клетках определяли цитофотометрией с применением системы анализа «Видео Тест Морфо-4» (Санкт-Петербург, 1999). Содержание (или массу) структурных белков в нейронах (цитофотометрические показатели интегральной оптической плотности белков, представляющие сумму локальных плотностей в клетках) условно обозначали в пикограммах. Среднюю оптическую плотность – средний показатель

оптической плотности белков в 1 пикселе – расценивали как показатель концентрации структурных белков в нейронах.

Для оценки функционального уровня нейронов вычисляли функциональный ядерно-цитоплазматический коэффициент как соотношение содержания белков в ядре к содержанию белков в цитоплазме. Регуляторный уровень (регуляторный ядерно-цитоплазматический коэффициент) в нейронах ганглиев рассчитывали как соотношение концентрации белков в ядре к концентрации белков в цитоплазме. Показатели в тексте представлены как среднее значение  $\pm$ среднеквадратичное отклонение.

Различия количественных показателей белков в нейронах мозжечка и результаты нуклеопротеидных комплексов в нейронах коры больших полушарий мозга обрабатывали параметрически, с применением критерия Стьюдента. Анализ на нормальность распределения показателей концентрации и содержания структурных белков в нейронах спинномозговых ганглиев проводили по критерию Колмогорова–Смирнова. Различия по каждому признаку в нейронах ганглиев серых и белых крыс выявляли с помощью дисперсионного анализа ANOVA (Краскела–Уоллиса). Взаимосвязи между цитохимическими показателями белкового фонда структурных белков у каждого животного определяли внутривидовым корреляционным анализом по Спирмену. Статистическую обработку количественных данных проводили по программам Excel и «Статистика-6».

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В процессе изучения компенсаторных явлений нервной системы при воздействии этанола 1-й группе лабораторных белых крыс вводили алкоголь из расчета 8 г/кг массы. При этом в нейронной популяции слоя II–III коры переднего мозга в сравнении с контролем отмечалось достоверное увеличение нейронов с явлениями хроматолиза цитоплазмы различной степени до появления клеток-теней. Количество клеток-теней возросло с 2,7% (в контроле) до 7,3% (в опыте) ( $P \leq 0,01$ ). Наблюдаемую крайнюю степень хроматолиза цитоплазмы (клетки-тени) мы относили к необратимым явлениям максимального снижения синтетических процессов и к истощению нейроцитов.

В нейронах коры больших полушарий экспериментальных животных 2-й группы под влиянием небольшой дозы алкоголя (4 г/кг массы) сохранялись явления хроматолиза, но выражены они в меньшей степени. Нарастало количество гиперхромных клеток. Компенсаторные проявления нейронов были связаны с увеличением в них размеров ядра и ядрышка. Количество гиперхромных клеток от общего числа составило 10,3% (в контрольной группе – 6,0%). Это происходило за счет уменьшения нейронов с гипохромной цитоплазмой. Подобные изменения, вероятно, обусловлены резким повышением уровня метаболических реакций. Они отражают обратимость нарушений в нейронах в ответ на

воздействие этанола и выявляют определенный уровень компенсаторных возможностей клеток нейронной популяции слоя II–III коры полушарий головного мозга.

Асфиксию белых крыс с последующим оживлением проводили путем пережатия интубационной трубки. На заданных сроках в остром периоде после декапитации у животных забирали мозжечок. В латеральных участках полушарий мозжечка исследовались нейроны коры молекулярного слоя: малые звездчатые клетки, корзинчатые клетки; в ганглиозном слое – клетки Пуркинье; в зубчатом ядре – нейроны больших и средних размеров. Интерферометрическое исследование звездчатых нейронов молекулярного слоя на ранних этапах после оживления показало достоверное увеличение показателей концентрации белков: через 1 час – до  $1,29 \text{ пг/мкм}^3$ , что на 26,7% выше нормы; через 1 сутки – до  $1,42 \text{ пг/мкм}^3$ , что на 39,2% больше, чем в контроле. В клетках Пуркинье ганглиозного слоя через 1 час после оживления содержание и концентрация общих белков в цитоплазме повышались и максимального значения достигли через сутки: концентрация составила  $1,56 \text{ пг/мкм}^3$  ( $P \leq 0,001$ ), что на 26,9% выше, чем в контроле, а содержание белков увеличилось на 35,5%. В нейронах зубчатого ядра на ранних сроках постреанимационного периода изменения концентрации и содержания белков были сходны с изменениями нейронов ганглиозного слоя, через сутки после оживления концентрация общих белков в которых составила  $1,84 \text{ пг/мкм}^3$  ( $P \leq 0,001$ ), что на 19% больше значений контрольной группы. Содержание белков увеличилось на 24% и составило  $535,8 \text{ пг}$  ( $P \leq 0,001$ ). Выявленная своеобразная резистентность нейронов молекулярного слоя мозжечка может быть связана с их функциональными особенностями регуляторного типа, изменяющими активность клеток ганглиозного слоя: они тормозят возбудимость клеток Пуркинье.

Сравнительная цитофотометрия нейронных популяций спинномозговых ганглиев полуподземных серых крыс и лабораторных белых крыс выявила различия количественных показателей структурных белков в нейронах. У крысы белой в сравнении с крысой серой в клетках шейного отдела количество белков оказалось меньше на 22,1% ( $P \leq 0,001$ ), а в клетках поясничного отдела, наоборот, больше на 36,6% ( $P \leq 0,001$ ). Причем в шейном отделе (ШО) более значимые изменения массы белков были выявлены в цитоплазме клеток (в цитоплазме – на 22,8%; в ядре – на 18,4%); в поясничном отделе (ПО), наоборот: в ядрах клеток в цитоплазме – на 35,4%, в ядре – на 40,6% (табл. 1).

Таблица 1

Показатели содержания структурных белков в нейронах  
спинномозговых ганглиев шейного и поясничного отделов крыс

Отдел	Шейный				Поясничный			
	Мт	Мц	Мя	фЯЦК	Мт	Мц	Мя	фЯЦК
Показатели содержания белков	M±s	M±s	M±s	M±s	M±s	M±s	M±s	M±s
Крыса серая	141,4± 39,7	109,2± 32,7	32,1± 11,6	0,304± 0,06	117,6± 31,4	91,6± 29,0	25,9± 8,3	0,294± 0,11
Крыса белая	110,2± 26,4	84,3± 21,4	26,2± 7,4	0,320± 0,08	185,4± 61,4	141,8± 47,9	43,6± 16,1	0,315± 0,08

\* Мт – содержание белков в теле нейронов; Мц – содержание белков в цитоплазме; Мя – содержание белков в ядре; фЯЦК – функциональный ядерно-цитоплазматический коэффициент.

У крысы белой в сравнении с контролем показатели концентрации структурных белков коррелировали с их количеством: в нейронах шейного отдела значения концентрации также были меньше (на 24,0%) ( $P \leq 0,001$ ), в поясничном отделе, наоборот, больше (на 25,4%) ( $P \leq 0,001$ ). Причем в нейронах обоих отделов наиболее значительные изменения в распределении белков в 1 пикселе обнаружались в клеточных ядрах. В клетках шейного отдела концентрация белков в цитоплазме нейронов снизилась на 23,8% ( $P \leq 0,001$ ), а в ядре – на 26,3% ( $P \leq 0,001$ ). В поясничном отделе показатели концентрации, наоборот, возросли – в цитоплазме на 24,6% ( $P \leq 0,001$ ), в ядре – на 28,7% ( $P \leq 0,001$ ) (табл. 2).

Таблица 2

Показатели концентрации структурных белков в нейронах спинномозговых ганглиев шейного и поясничного отделов крыс

Отдел	Шейный				Поясничный			
	Ст	Сц	Ся	рЯЦК	Ст	Сц	Ся	рЯЦК
Показатели концентрации белков	M±s							
Крыса серая	0,343± 0,06	0,353± 0,06	0,315± 0,06	0,890± 0,09	0,311± 0,06	0,319± 0,04	0,286± 0,05	0,897± 0,1
Крыса белая	0,261± 0,04	0,269± 0,04	0,232± 0,05	0,861± 0,07	0,417± 0,08	0,423± 0,08	0,401± 0,08	0,943± 0,04

\* Ст – концентрация белков в теле нейронов; Сц – концентрация белков в цитоплазме; Ся – концентрация белков в ядре; рЯЦК – регуляторный ядерно-цитоплазматический коэффициент.

В результате изменения количественных и качественных характеристик белков в нейронах лабораторной крысы ее показатели функционального и регуляторного коэффициентов в сравнении с крысой серой численно возросли (фЯЦК: в ШО – на 5,0%, в ПО – на 6,6%; рЯЦК: в ШО – на 26,3%, в ПО – на 4,9%).

Корреляционный анализ показал, что у крысы серой в нейронах ганглиев между концентрацией и количеством белка сформировались прямые умеренные связи. В клетках шейного отдела коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ) составил 0,44, в поясничном – 0,27. У крысы белой характер корреляций не изменился: между содержанием и концентрацией белков также выявились умеренные положительные взаимосвязи (ШО:  $r=0,68$ ; ПО:  $r=0,31$ ), но коэффициенты корреляции численно превышали в шейном отделе – на 35,5%, в поясничном – на 12,9%.

### **Выводы**

Таким образом, проведенные комплексные исследования по изучению влияния радикальных воздействий (алкоголя, асфиксии) на нейронные популяции определенных структур интегративной системы крыс, а также изменение нейромышечных реакций двигательного анализатора (вследствие изменения условий существования) выявили, что компенсаторные реакции, аналогично адаптивным механизмам нейронов, обусловлены изменением количественных показателей общих и структурных белков (содержанием и концентрацией) и качественными изменениями внутриклеточных метаболических процессов (степенью хромофилии).

1. Степень воздействия алкоголя на нейроны слоя II–III коры переднего мозга находилась в прямой зависимости от его количества: большое количество алкоголя вызывало хроматолиз цитоплазмы до появления клеток-теней, что доказывало необратимость процессов обмена веществ. При введении умеренного количества алкоголя в нейронной популяции возросло количество гиперхромных клеток и снизилось число гипохромных нейронов. Размеры гиперхромных нейронов увеличивались. Подобные изменения мы рассматривали как предельные варианты компенсаторных реакций нейронов коры переднего мозга.

2. Достоверное повышение концентрации и массы общих белков в нейронах коры молекулярного слоя, зубчатого ядра и ганглиозного слоя мозжечка на ранних этапах после оживления мы расценивали как активное включение компенсаторных возможностей нейронов при воздействии асфиксии, направленное на восстановление метаболизма белков и функций нейронов.

3. Уменьшение количественных показателей структурных белков в клетках спинномозговых ганглиев шейного отдела, обеспечивающих механизмы афференции

амортизационных конечностей, и увеличение количества и концентрации структурных белков в нейронах ганглиев поясничного отдела, отвечающих за афференцию пропульсивных конечностей у белых крыс клеточного содержания в сравнении с серыми синантропными животными, вероятно, обусловлены адаптивными механизмами нейронов при изменении нейромышечных реакций функционально различающихся передних и задних конечностей. Увеличение значений функционального и регуляторного коэффициентов у крысы белой расценивали как возможный вариант механизма адаптации нейронов спинномозговых узлов к условиям клеточного содержания на клеточно-популяционном уровне. Одинаковые корреляционные связи между показателями количества и концентрации структурных белков в нейронах ганглиев у серой и белой рас крыс можно объяснить их видовой особенностью.

### Список литературы

1. Обухов Д.К., Обухова Е.В. Эволюция конечного мозга птиц и млекопитающих: два пути развития – один результат: материалы X конгресса Международной Ассоциации морфологов // Морфология. 2010. Т. 137, № 4. С.145.
2. Гуляев С.М., Шантанова Л.Н., Батоцыренова Э.Т. Морфометрическая оценка нейропротекторного действия экстракта Астрагала перепончатого на головной мозг крыс при иммобилизационном стрессе // Морфология. 2016. Т. 149, № 3. С.12-15.
3. Кониева А.А., Бибаева Л.А., Дзагоева Г.А., Еналдиева Д.А. Исследования эффективности клеточной терапии травматической болезни спинного мозга в эксперименте // Кубанский научный медицинский вестник. 2014. №5 (147). С. 55-60.
4. Порсева В.В., Шилкин В.В. Стрелков А.А., Краснов И.Б., Маслюков П.М. Изменения мотонейронов спинного мозга у мышей после космического полета // Морфология. 2016. Т. 150, № 4. С.50-54.
5. Емельянчик С.В., Зиматкин С.М. Структурные и гистохимические изменения в нейронах фронтальной коры крысы при холестазах // Морфология. 2018. Т. 153, № 1. С.7-12.
6. Орлянская Т.Я., Актушина Г.А., Яценко А.Д. Репаративные изменения в клеточных популяциях переднего мозга, мозжечка и спинного мозга крыс в ответ на острое воздействие бытовых веществ // Морфология. 2016. Т. 149, № 3. С.155.
7. Яценко А.Д., Лютикова Т.М. Володичева Т.Б. Пластичность морфометрических показателей нейронных популяций центральной системы млекопитающих и птиц // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Том 14 № 5. С. 508-511.

8. Яценко А.Д., Лютикова Т.М. Анализ морфометрических показателей мотонейронов латеральных ядер спинного мозга мышей и крыс // Морфологические ведомости. 2012. № 4. С.64-68.
9. Мелкова В.Г., Квашнин С.А. Синантропия грызунов М.: Издательство РАН, 1994. 194 с.
10. Гамбарян П.П. Бег млекопитающих. Л.: Наука, 1972. 380 с.
11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с.