

© В. В. Криштон, Д. А. Пожилов, 2019  
УДК 611.813:612.821:599.323.4

*В. В. Криштон*<sup>1</sup>, *Д. А. Пожилов*<sup>2</sup>

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

<sup>1</sup> Научно-исследовательский центр (руков. — В. В. Криштон), ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России; <sup>2</sup> кафедра анатомии человека (зав. — проф. Т. А. Румянцева), ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Цель** — изучить гистологические и иммуногистохимические особенности коры головного мозга у животных с разной стрессоустойчивостью и уровнем когнитивных способностей.

**Материал и методы.** Исследовано строение коры прецентральной извилины головного мозга 24 крыс с разным уровнем стрессоустойчивости, верифицированной в тесте открытое поле, и когнитивными способностями, верифицированными в водном лабиринте Морриса. Срезы окрашивали по Ниссляу и маркером GFAP.

**Результаты.** У животных с низкой стрессоустойчивостью отмечаются значимое повышение количества двуядрышковых нейронов, большие размеры ядер и площадь цитоплазмы нейронов, а также большее количество нейронов с необратимыми изменениями, среднее расстояние между перикарионами нейронов и сателлитоцитами в этой подгруппе также больше, а количество периваскулярно расположенных глиоцитов — меньше. У животных с низким уровнем когнитивных способностей особенности, выявляемые при окраске по Ниссляу, аналогичны таковым у животных с высокой стрессоустойчивостью, но слабее выражены. Для животных с высокой стрессоустойчивостью характерны значимо меньшая площадь распределения отростков и меньшее количество GFAP-позитивных клеток на 1 мм<sup>2</sup> среза. Для животных с высоким уровнем когнитивных способностей характерны значимо большее количество GFAP-позитивных тел клеток в 1 мм<sup>2</sup> среза и меньшая площадь, занимаемая отростками.

**Выводы.** Уровень стрессоустойчивости животного находится во взаимосвязи с характером нейроглиальных взаимоотношений, высокий уровень стрессоустойчивости и развития когнитивных способностей связан с меньшим количеством нейронов с двумя ядрышками, большим количеством погибших сателлитоцитов, низкими значениями средней площади распределения отростков астроцита, другие параметры, ассоциированные с высокой стрессоустойчивостью и высоким уровнем развития когнитивных способностей, носят взаимоисключающий или незначимый характер.

**Ключевые слова:** *головной мозг, стрессоустойчивость, когнитивные способности, церебральная гипоперфузия, крысы*

Введение. Типологические особенности высшей нервной деятельности находятся в тесной взаимосвязи друг с другом и соматическими реакциями. Так, снижение частоты сердечных сокращений у нетревожных субъектов при решении когнитивных задач указывает на творческий, аналитический характер их деятельности [11]. В настоящее время показана взаимосвязь между уровнем развития когнитивных способностей у человека и смертностью [10, 14]. Вместе с тем, в исследованиях, проведенных на людях, нет возможности отделить влияние соматических факторов, ассоциированных с высоким уровнем когнитивных способностей, от культурных или социальных, обусловленных уровнем развития интеллекта [12]. Стрессоустойчивость также не является исключительно функциональной характе-

ристической, так, низкая стрессоустойчивость ассоциирована с худшим прогнозом при хронической ишемии головного мозга [1]. Функциональная основа уровня стрессоустойчивости заключается в организации энергетического метаболизма мозга стрессоустойчивых и стрессонеустойчивых крыс. У первых животных определяется значимое, почти двукратное преобладание системы акцепторов водорода (НАД+НАДН) над системой макроэргов (АТФ и креатинфосфата), отмечено, что тестирование животных в «открытом поле» позволяет прогнозировать уровень «метаболической защиты мозга» [4]. Таким образом, представляет интерес выявление морфологических и морфометрических коррелятов стрессоустойчивости и когнитивных способностей лабо-

### Сведения об авторах:

*Криштон Владимир Владимирович* (e-mail: [chrishtop@mail.ru](mailto:chrishtop@mail.ru)), Научно-исследовательский центр, ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, 153012, г. Иваново, Шереметьевский пр., 8

*Пожилов Дмитрий Алексеевич* (e-mail: [dmitry.oldman@yandex.ru](mailto:dmitry.oldman@yandex.ru)), кафедра анатомии человека, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, 150000, г. Ярославль, Революционная ул., 5

раторных животных в коре больших полушарий головного мозга.

Материал и методы. Эксперимент одобрен этическим комитетом ФБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России (протокол № 8 от 24.03.2016 г.) и выполнен в соответствии с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2000 г. Эксперимент проводили на 24 крысах (12 самцов и 12 самок) массой 180–200 г, линии Wistar, возраст 3 мес. Крысы содержали в стандартных условиях вивария.

Ориентировочно-исследовательское поведение животных оценивали с помощью теста «открытое поле» [7]. По результатам тестирования 24 исследуемых животных были разделены на две одинаковых по численности подгруппы: животные с низким и высоким уровнем тревожности, которым соответствует высокий (ВУС) и низкий уровень стрессоустойчивости (НУС), по 12 животных в каждой подгруппе. Для оценки состояния когнитивных функций при гипоксии головного мозга (способности к пространственному обучению) использовали тест — водный лабиринт Морриса [6], по результатам которого 24 крысы были разделены на две подгруппы: с высоким (ВУК) и низким уровнем развития когнитивных функций (НУК), по 12 животных в каждой подгруппе. Животных выводили из эксперимента наркозом золетилом.

Полученный материал фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (БиоВитрум), дальнейшую проводку осуществляли промежуточными смесями Блик (БликМедиклПродакшн, Россия). Срезы толщиной 5 мкм изготавливали с помощью HM 450 SlidingMicrotome (Карл Цейс, Германия), окрашивали по Нисслю (набор толуидинового синий, модификация Ниссля, БиоВитрум).

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), маркер зрелых астроцитов, выявляли с помощью первичных поликлональных кроличьих антител (ab16997, UK, разведение 1:200) и вторичных антител (ab97051, UK, 1:1000) с пероксидазной меткой на парафиновых парасагиттальных срезах мозга. Детекцию пероксидазы производили DAB SubstrateKit (ab64238). Срезы докрасивали гематоксилином Майера, промывали в воде, обезвоживали, заключали в канадский бальзам. Для контроля и исключения артефактов при выполнении реакции часть препаратов обрабатывали только вторичными антителами, без нанесения первичных антител.

При окраске по Нисслю на микропрепаратах определяли количество: ядросодержащих нейронов с необратимыми изменениями (Nn), нейронов с обратимыми изменениями с двумя ядрышками на  $1 \text{ мм}^2$  (Nя), постклеточных структур, расположенных на расстоянии диаметра ядра глиоцита [2] (Npc), клеток глии на  $1 \text{ мм}^2$  среза (Ng), среднее расстояние между кариолемами ядер нейрона и его сателлита (Sn-s), глиоцитов рядом с гемокapилляром на расстоянии, не превышающем 25 мкм (Nh-g) (по Ю. Г. Васильеву [3]), среднюю площадь перикариона интактных нейронов с ядрами (Sp) и ядер таких нейронов (Sc).

Исследовали при помощи светового микроскопа Optica DM-20 (Italy 2015) со встроенной камерой. Маркер GFAP выявляется в цитоплазме и отростках астроцитов. Астроциты после проведения иммуногистохимической реакции визуализируются как клетки округлой или полигональной формы со светлым ядром и с 3–5 извитыми ветвящимися отростками. На каждом срезе в 50 полях зрения оценивали численную

плотность распределения астроцитов (ед./мм<sup>2</sup>), площадь распределения отростков астроцитов (мкм<sup>2</sup>).

Морфометрию осуществляли с использованием программного обеспечения (ImageJ Version). Статистическая обработка данных включала вычисление среднеарифметического значения, его ошибки, оценки амплитуды вариационного ряда. О значимости различий судили по величине t-критерия Стьюдента и считали их значимыми при  $p < 0,05$ .

Результаты исследования. При морфометрии микропрепаратов, окрашенных по Нисслю, выявлено значимое превышение количества двуядрышковых нейронов в подгруппе животных с НУС, также для животных этой подгруппы характерны значимо большие размеры ядер и площадь цитоплазмы нейронов и, вместе с тем, значимо большее количество нейронов с необратимыми изменениями. Среднее расстояние между перикарионом нейронов и глиоцитами в этой подгруппе также больше. При этом количество погибших клеток сателлитов у животных с низким уровнем стрессоустойчивости меньше, также меньше и периваскулярно расположенных глиоцитов.

Анализ срезов, окрашенных по Нисслю, при делении животных по уровню развития когнитивных способностей выявил меньшее количество значимых различий между изучаемыми параметрами исследуемых подгрупп. При этом характер отличий в парах изучаемых параметров ВУК—НУК во многом аналогичен отличиям в парах параметров ВУС—НУС. Для подгруппы с НУК также характерно большее количество нейронов с двумя ядрышками, большая площадь перикарионов и ядер у нейронов с обратимыми изменениями. Для подгруппы с ВУК, так же как и для животных с ВУС, характерно значимо большее количество постклеточных структур в непосредственной близости от перикарионов, что может трактоваться как гибель сателлитов. Эта аналогия нарушается для количества нейронов с необратимыми изменениями: их количество значимо больше у животных с ВУК и НУС (табл. 1).

При морфометрии GFAP+-астроцитов установлено, что выявленные при окрашивании по Нисслю параллели характерны только для средней площади распределения отростков одной GFAP-позитивной клеткой (мкм<sup>2</sup>): в паре животные с ВУС — животные с НУС и в паре животные с ВУК — животные с НУК значимо более высокие значения характерны для животных с НУС и НУК.

Для других параметров морфометрии иммуногистохимических препаратов параллели нарушаются со стороны численной плотности распределения астроцитов. Так, и для животных с ВУС,

Таблица 1

Показатели морфометрии при окраске по Нислю ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ , мкм<sup>2</sup>)

Показатели	Уровень стрессоустойчивости		Уровень когнитивных способностей	
	высокий	низкий	высокий	низкий
Nn	18±2	32±4*	29±5*	20±4
Ня	29±3	41±4*	23±2	47±6*
Npc	32±3*	14±2	28±3*	19±2
Ng	420±51	429±42	457±45*	391±38
Sn-s	51,7±1,9	55,9±2,1*	55,9±3,9	54,2±4,8
Nh-g	1,19±0,15*	0,92±0,11	1,16±0,12	0,95±0,14
Sp	97±8	120±11*	93±11	124±10*
Sc	41±4	52±5*	42±4	52±5*

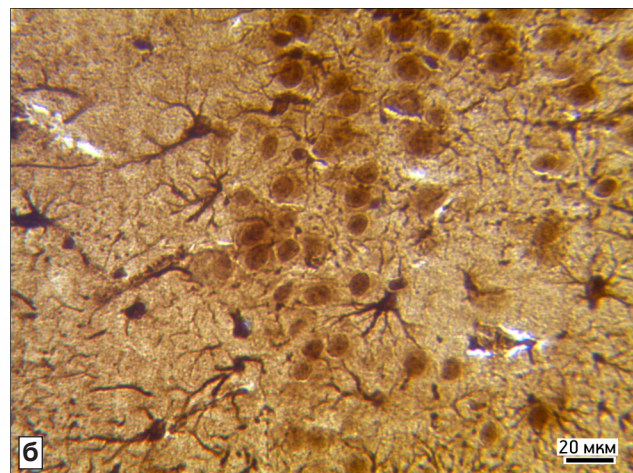
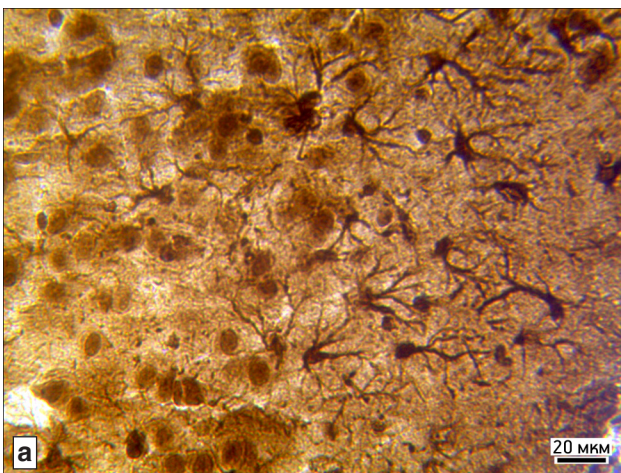
\* Различия по сравнению с альтернативной подгруппой значимы при  $p < 0,05$ .

Примечание. Обозначения показателей приведены в тексте статьи.

и для животных с ВУК характерна низкая площадь распределения отростков астроцитов (*рисунок, а*). При этом для животных с ВУК характерно значительно большее количество тел GFAP-позитивных тел клеток на 1 мм<sup>2</sup>, а для животных с ВУС — значительно меньшее (*табл. 2*). Таким образом, для животных с ВУК характерно большее количество астроцитов в срезе, более короткие, но более многочисленные отростки первого порядка и меньшая площадь распределения отростков (см. рисунок, а). Для животных с НУК свойственны самые низкие значения численной плотности астроцитов и при этом чуть бóльшая площадь, занимаемая их отростками (см. рисунок, б).

Обсуждение полученных данных. Известно, что концентрация астроцитов вблизи кровеносных капилляров, а также рост числа сателлитных форм глиоцитов являются

адаптационным механизмом и условием выживания клеток при различных ишемических воздействиях на головной мозг [5]. Учитывая, что астроциты активно участвуют в нейрональном метаболизме, в частности в синтезе и транспорте одного из важнейших нейрональных энергетических субстратов — лактата [13], близость к перикарионам, безусловно, облегчает трофическую функцию астроцитов клеток по отношению к нейронам и минимизирует собственный нейрональный метаболизм. Поэтому увеличение их плотности в периваскулярной зоне и близости к гемокapиллярам у животных с высоким уровнем стрессоустойчивости может рассматриваться как один из механизмов нейроглиальных адаптаций. Также у стрессоустойчивых животных на расстоянии 20 мкм от перикарионов наблюдается бóльшее количество постклеточных структур. Учитывая трофическую роль, которую спо-



Распределение GFAP+ -клеток в гранулярном слое моторной коры крыс.

а — животное с высоким уровнем когнитивных способностей, высокая численная плотность астроцитов, малая площадь распределения отростков; б — животное с низким уровнем когнитивных способностей, низкая плотность распределения астроцитов, большая площадь распределения отростков. Микрофото. Антитела к GFAP. Ув. 400

Таблица 2

Показатели морфометрии GFAP-позитивных астроцитов ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ , мкм<sup>2</sup>)

Показатели	Уровень стрессоустойчивости		Уровень когнитивных способностей	
	высокий	низкий	высокий	низкий
Численная плотность распределения астроцитов, ед./мм <sup>2</sup>	7,0±0,3	7,8±0,4*	8,2±0,4	6,7±0,3*
Количество отростков первого порядка	3,8±0,1	4,1±0,2*	3,9±0,1	4±0,2
Площадь, покрываемая отростками до первого ветвления, мкм <sup>2</sup>	2537±118	3005±126*	2784±135	2866±102
Площадь распределения отростков астроцитов, мкм <sup>2</sup>	7901±162	10137±182*	8787±183	9252±178*

\* Различия по сравнению с альтернативной подгруппой значимы при  $p < 0,05$ .

способны выполнять апоптотические тельца погибших клеток по отношению к микроокружению [8], можно предположить, что низкие показатели метаболической нейрональной активности у животных с высоким уровнем стрессоустойчивости (меньшее количество двуядерных нейронов, меньшая площадь ядра и перикариона) обусловлены более выраженной трофической функцией глиальных клеток. В пользу этого предположения свидетельствует и большее количество нейронов с необратимыми изменениями, выявляемое у животных с НУС.

Учитывая большую близость глиальных элементов к перикарионам нейронов животных с ВУС, логично выглядит меньшая площадь покрытия отростками GFAP+-клеток. Вместе с тем, обеспечение нейроглиальных взаимодействий у стрессоустойчивых животных происходит в условиях большей удаленности глиальных элементов от перикарионов нейронов, это сочетается с большей плотностью распределения тел GFAP-позитивных клеток и большей площадью покрытия отростками одной GFAP-положительной клетки.

С позиций представления об астроцитарной сети, как об экстранейрональной сигнальной системе в ЦНС [9], особый интерес представляет факт, что у животных с ВУК большая численная плотность астроцитов сочетается с меньшей средней площадью покрытия отростками. У животных с НУК, наоборот, меньшему количеству клеток соответствует большая площадь покрытия отростками, которая сочетается с меньшим количеством глиальных клеток при окраске по Нисслию и меньшим количеством погибших клеток-сателлитов.

Большой радиус отростков астроцитов, на наш взгляд, приводит к большему радиусу паракринных эффектов и расширению микроокружения одного астроцита, что обеспечивает лучшую синхронность и, как следствие, луч-

шую метаболическую защиту нейронов у животных с НУК. Об этом свидетельствует большая доля нейронов с необратимыми изменениями у животных с ВУК. Кроме того, в наших исследованиях выявлена значимо большая смертность среди животных с ВУК после операции по моделированию перманентной гипоксии головного мозга путем необратимой перевязки обеих сонных артерий [7]. Можно предполагать, что выявленная в исследовании морфологическая специфика типологических особенностей высшей нервной деятельности приобретет большую значимость в условиях нагрузочных тестов и адаптаций.

**Заключение.** Таким образом, установлено, что уровень стрессоустойчивости животного находится во взаимосвязи с характером нейроглиальных взаимоотношений, ВУС и ВУК связаны с меньшим количеством нейронов с двумя ядрышками, большим количеством погибших сателлитов, низкими значениями средней площади распределения отростков астроцита, другие параметры, ассоциированные с ВУС и ВУК, носят взаимоисключающий или незначимый характер.

**Вклад авторов:**

*Концепция и дизайн исследования:* В. В. К.

*Сбор и обработка материала:* В. В. К., Д. А. П.

*Статистическая обработка данных:* В. В. К.

*Анализ и интерпретация данных:* В. В. К.

*Написание текста:* В. В. К., Д. А. П.

**Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.**

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антипенко Е. А., Густов А. В. Индивидуальная стрессоустойчивость и прогноз заболевания при хронической ишемии головного мозга // Медицинский альманах. 2014. № 3 (33). С. 36–38 [Antipenko E. A., Gustov A. V. Individual stress resistance and prognosis of disease in the case of chronic ischemia of brain // Medicinskii al'manakh. 2014. № 3. P. 36–38. In Russ.].

2. Боголепова И. Н., Малофеева Л. И., Агапов П. А., Малофеева И. Г. Морфометрические исследования цитоархитектоники префронтальной коры мозга женщин // *Фундаментальные исследования*. 2015. № 2–25. С. 5583–5587 [Bogolepova I. N., Malofeeva L. I., Agapov P. A., Malofeeva I. G. Morphometrical investigations of cytoarchitectonic of prefrontal cortex of woman brain // *Fundamental'nye issledovaniya*. 2015. № 2–25. P. 5583–5587. In Russ.].
3. Васильев Ю. Г. Морфология нейроглио-сосудистых отношений млекопитающих (сравнительное и онтогенетическое исследование): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Саранск, 2001. 28 с. [Vasiliev Yu. G. Morphology of the neuro-glio-vascular relationships of mammals (comparative and ontogenetic research): Abstract of Dokt. Med. Sci. Dissertation. Saransk, 2001. 28 p. In Russ.].
4. Дизрегуляторная патология: Руководство для врачей и биологов / Под ред. Г. Н. Крыжановского. М.: Медицина, 2002. С. 260–270 [Disregulation pathology: a guide for physicians and biologists / Ed. G. N. Kryzhanovsky. M.: Meditsina, 2002. P. 260–270. In Russ.].
5. Дробленков А. В., Наумов Н. В., Монид М. В., Валькович Э. И., Шабанов П. Д. Реактивные изменения клеточных элементов головного мозга крыс при различных условиях циркуляторной гипоксии // *Морфология*. 2013. Т. 143, вып. 3. С. 14–21 [Droblenkov A. V., Naumov N. V., Monid M. V., Valkovich E. I., Shabanov P. D. Reactive changes of the rat brain cellular elements under different conditions of circulatory hypoxia // *Morfologiya*. 2013. Vol. 143, № 3. P. 14–21. In Russ.].
6. Ивлиева А. Л., Петрицкая Е. Н., Рогаткин Д. А., Демин В. А. Методические особенности применения водного лабиринта Морриса для оценки когнитивных функций у животных // *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. 2016. Т. 102, № 1. С. 3–17 [Ivlieva A. L., Petritskaya E. N., Rogatkin D. A., Demin V. A. Methodical features of the application of Morris water maze for estimation of cognitive functions in animals // *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I. M. Sechenova*. 2016. Vol. 102, № 1. P. 3–17. In Russ.].
7. Криштоп В. В., Пахрова О. А., Румянцева Т. А. Развитие перманентной гипоксии головного мозга у крыс в зависимости от индивидуальных особенностей высшей нервной деятельности и пола // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2018. Т. 13, № 4. С. 654–659 [Chrishtop V. V., Pakhrova O. A., Rumyantseva T. A. Dynamics of permanent cerebral hypoxia of rats depending on individual features of higher nervous activity and sex // *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza*. 2018. Vol. 13, № 4. P. 654–659. In Russ.].
8. Arandjelovic S., Ravichandran K. S. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis // *Nat Immunol*. 2015. Vol. 16, № 9. P. 907–197. doi: 10.1038/ni.3253
9. Bazargani N., Attwell D. Astrocyte calcium signaling: the third wave // *Nat. Neurosci*. 2016. Vol. 19, № 2. P. 182–189. doi: 10.1038/nn.4201
10. Beaver K. M., Schwartz J. A., Connolly E. J., Al-Ghamdi M. S., Kobeisy A. N., Barnes J. C., Boutwell B. B. Intelligence and early life mortality: Findings from a longitudinal sample of youth // *Death. Stud*. 2016. Vol. 40, № 5. P. 298–304. doi: 10.1080/07481187.2015.1137994
11. Chönpflug W., Mündelein H. Operation-correlated heart-rate responses // *Psychological Res*. 1983. Vol. 45, № 2. P. 177–186.
12. Der G., Deary I. J. Reaction times match IQ for major causes of mortality: Evidence from a population based prospective cohort study // *Intelligence*. 2018. Vol. 69. P. 134–145. doi: 10.1016/j.intell.2018.05.005
13. McKenna M. C. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain // *J. Neurosci. Res*. 2007. Vol. 85, № 15. P. 3347–3358. doi: 10.1002/jnr.21444
14. SörbergWallin A., Allebeck P., Gustafsson J., Hemmingsson T. Childhood IQ and mortality during 53 years' follow-up of Swedish men and women // *J. Epidemiol. Community Health*. 2018. Vol. 72, № 10. P. 926–932. doi: 10.1136/jech-2018-210675

Поступила в редакцию 11.04.2019

### MORPHOLOGICAL PATTERN AND MORPHOMETRIC STUDY OF THE CEREBRAL CORTEX OF RATS WITH DIFFERENT TYPOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HIGHER NERVOUS ACTIVITY

V. V. Krishtop<sup>1</sup>, D. A. Pozhilov<sup>2</sup>

**Objective** — to study the histological and immunohistochemical characteristics of the cerebral cortex in animals with different stress tolerance and level of cognitive abilities.

**Material and methods.** The morphology of the cortex of the brain precentral gyrus was studied in 24 rats with different levels of stress tolerance, verified in open field test, and cognitive abilities, verified in the Morris water maze. The sections were stained according to Nissl method and with antibodies against GFAP.

**Results.** In animals with low stress tolerance, a significant increase in the number of neurons with two nucleoli was found; large nuclei and the area of cytoplasm, as well as a larger number of neurons demonstrating irreversible changes were also detected. The average distance between the perikaryon of neurons and the satellite cells in this subgroup was also larger, and the number of perivascular gliocytes was smaller. In animals with a low level of cognitive abilities, the features revealed by Nissl staining were similar to those of animals with high stress tolerance but less pronounced. Animals with high stress tolerance were characterized by a significantly smaller distribution area of the processes and a smaller number of GFAP-positive cells per 1 mm<sup>2</sup> of the section. Animals with high cognitive abilities typically had a significantly greater number of GFAP-positive cell bodies per 1 mm<sup>2</sup> of section and a significantly smaller area occupied by processes.

**Conclusions.** The level of the animal stress tolerance correlates with the nature of neuro-glial relationship; high level of stress tolerance and high cognitive abilities are associated with a smaller number of neurons with two nucleoli, a great number of dead satellite cells, low values of the average distribution of astrocyte processes. Other parameters associated with high stress tolerance and high cognitive abilities are of mutually exclusive or insignificant character.

**Key words:** brain, stress tolerance, cognitive abilities, cerebral hypoperfusion, rats

<sup>1</sup> Scientific Research Center, Ivanovo State Medical Academy, 8 Sheremetevsky Pr., Ivanovo 153012; <sup>2</sup> Department of Human Anatomy, Yaroslavl' State Medical University, 5 Revolutionsnaya St., Yaroslavl' 150000