

С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь

ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ОРГАНЕЛЛОГЕНЕЗ В ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНАХ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА КРЫСЫ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. С. М. Зиматкин), Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

Проведена количественная ультраструктурная и гистохимическая оценка постнатального развития органелл нейронов во внутреннем пирамидном слое фронтальной коры большого мозга у крыс на 5-, 20-, 45-е сутки после рождения (по 4 животных каждого возраста). Выявлено, что в постнатальном онтогенезе происходит рост перикарионов и закономерное развитие органелл нейронов. С возрастом прогрессивно нарастает количество митохондрий, которые становятся более вытянутыми. В них прогрессивно нарастают количество и длина крист. Это сопровождается повышением активности маркерных ферментов митохондрий СДГ и NADH-ДГ. На 5-е сутки после рождения в цитоплазме нейронов преобладают свободные рибосомы, а затем — гранулярная эндоплазматическая сеть. При этом протяженность ее цистерн прогрессивно возрастает. Комплекс Гольджи на 5-е сутки после рождения еще не сформирован, его образование происходит к 20-м суткам. Содержание лизосом и их размеры значительно увеличиваются к 20-м суткам; сходным образом изменяется и активность маркерного фермента лизосом — кислой фосфатазы.

Ключевые слова: органеллогенез, пирамидные нейроны, фронтальная кора

Возрастная перестройка коры полушарий большого мозга происходит в течение всей жизни человека и животных, причем в период роста организма преобладают процессы пролиферации и дифференцировки нервных элементов с усложнением их структуры, а в период старения — инволюционные изменения. То, что каждому возрасту соответствуют свои особенности строения нервной системы, в определенной мере обусловлено характером функциональных требований, предъявляемых к ней на данном этапе индивидуального развития организма [7]. В постнатальный период онтогенеза снижается плотность расположения тел нейронов, нарастает их вариабельность по форме и размерам. В цитоплазме нейронов формируются глыбки хроматофильного вещества, активируются синтетические процессы в ядре [4], уменьшается число ядрышек [6, 7], увеличиваются размеры перикарионов [9], число и длина отростков, усложняется их ветвление [5–7, 9], происходит увеличение количества и усложнение ультраструктуры органелл (эндоплазматической сети, комплекса Гольджи, митохондрий и лизосом) [7, 8, 11]. На светооптическом уровне показано, что у крыс с 5-х по 45-е сутки после рождения происходит прогрессивное увеличение толщины коры мозга, размеров пирамидных нейронов и уменьшение плотности их расположения

за счет ускоренного роста нейропиля [1]. Однако исследование динамики формирования органелл в перикарионах нейронов полушарий большого мозга у крыс в постнатальном онтогенезе с использованием ультраструктурной морфометрии и количественной гистохимии частично сделано только для митохондрий [11].

Цель настоящей работы — количественная ультраструктурная и гистохимическая оценка постнатального органеллогенеза в телах нейронов внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры большого мозга крысы.

Материал и методы. Исследование выполнено на потомстве самок беспородных белых крыс ($n=4$) с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» [3]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 11.03.2014 г.). Животные находились на стандартном рационе вивария. Крысят декапитировали на 5-, 20-е и 45-е сутки после рождения (по 4 каждого срока). Расположение фронтальной коры на гистологических препаратах большого мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [10]. После декапитации быстро извлекали головной мозг, кусочки переднего отдела коры полушарий большого мозга фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы окрашивали 0,1% толуидиновым синим по методу Ниссля и для выявления рибонуклеопротеинов (РНП) по Эйнарсону или замораживали в жидком азоте для

Сведения об авторах:

Зиматкин Сергей Михайлович (e-mail: zimatkin@grsmu.by), Бонь Елизавета Игоревна, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь, 230015, г. Гродно, ул. Горького, 80

определения активности ферментов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), NADH-дегидрогеназы (NADH-ДГ) и кислой фосфатазы (КФ). Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию и денситометрию осадка хромогена в гистологических препаратах проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США).

Для электронно-микроскопического исследования вырезали нужные участки коры и помещали в 1% осмиевый фиксатор на буфере Миллони (рН 7,4) на 2 ч при температуре 4 °С, промывали в смеси буфера Миллони (20 мл) и сахарозы (900 мг), обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации, смеси этанола и ацетона и ацетоне, проводили через смесь смол (аралдит М + аралдит Н + дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона и заключали в эту заливочную смесь смол. Срезы изготавливали на ультрамикротоме MT-7000 (RMC, США), собирали на опорные сеточки, контрастировали ацетатом урана и цитратом свинца. Полученные препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) и фотографировали цифровой камерой Olympus Mega View III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия). Морфометрию ультраструктур проводили с помощью программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США), обводя курсором на мониторе компьютера митохондрии, лизосомы, гранулярную эндоплазматическую сеть, комплекс Гольджи и рибосомы, оценивая их количество, размеры и форму.

Полученные средние цифровые данные по каждому животному анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me), границы процентилей (от 25 до 75) и интерквартильного диапазона (IQR). Количественные результаты представлены в виде: Me — медиана, LQ — верхняя граница нижнего квартиля, UQ — нижняя граница верхнего квартиля. Различия между показателями в разные сроки постнатального развития считали значимыми при $P < 0,05$ (Mann—Whitney U-test).

Результаты исследования. У крысы в постнатальном онтогенезе в перикарионах нейронов внутреннего пирамидного слоя коры мозга происходит прогрессивное нарастание относительного содержания митохондрий в 2,5 раза. Их площадь с 5-х по 20-е сутки после рождения увеличивается в 5 раз, а затем к 45-м суткам в 2 раза снижается. При этом они становятся менее сферичными и более вытянутыми (особенно на 20-е сутки). В митохондриях прогрессивно нарастает количество и длина крист (в 5–7 раз). При пересчете на площадь митохондрии количество крист на 20-е сутки несколько снижается, а на 45-е сутки резко возрастает (рисунки, табл. 1). В цитоплазме этих нейронов в постнатальном онтогенезе прогрессивно повышается активность маркерных ферментов митохондрий СДГ и NADH-ДГ (табл. 2).

На 5-е сутки после рождения в цитоплазме нейронов преобладают свободные рибосомы (87,5% от их количества). Затем их количество

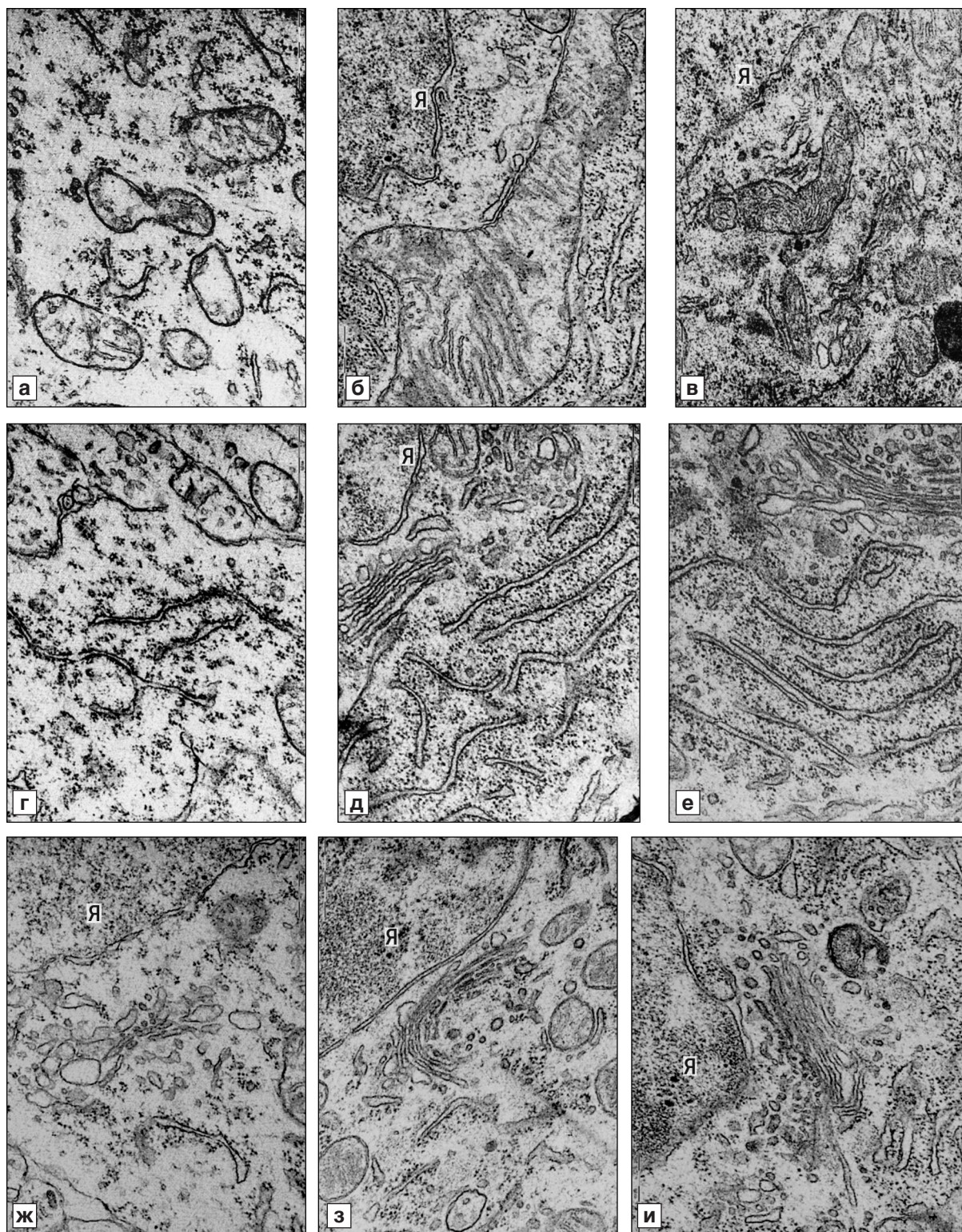
постепенно снижается, и происходит прогрессивное возрастание числа рибосом, связанных с гранулярной эндоплазматической сетью. При этом на 45-е сутки постнатального развития связанные рибосомы уже преобладают (56% от их общего количества) (см. рисунок, табл. 1). При этом протяженность цистерн гранулярной эндоплазматической сети на единицу площади цитоплазмы прогрессивно возрастает (с 5-х по 45-е сутки в 5 раз) (см. рисунок, табл. 1). Общее количество рибосом в цитоплазме тел нейронов в постнатальном онтогенезе практически не меняется, что соответствует и неизменному содержанию в ней РНП.

На 5-е сутки после рождения цистерны комплекса Гольджи представлены только округлыми вакуолями, затем к 20-м суткам они преобразуются в плоские цистерны, ширина которых постепенно уменьшается (см. рисунок, табл. 1).

Относительное содержание лизосом и их размеры значительно увеличиваются к 20-м суткам постнатального развития (в 3–4 раза), а затем несколько снижаются; при этом лизосомы становятся более вытянутыми (см. табл. 1). Сходным образом изменяется и активность в цитоплазме маркерного фермента лизосом — КФ. На 5-е сутки после рождения ее активность крайне мала (ниже уровня чувствительности метода), а на 20-е сутки достигает максимума (табл. 2).

Обсуждение полученных данных. В постнатальном онтогенезе мозга крысы происходят закономерные качественные и количественные изменения органелл нейронов внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры. Происходит прогрессивное нарастание количества митохондрий, их площадь к 20-м суткам резко увеличивается, а затем несколько снижается. При этом митохондрии становятся менее сферической формы и более вытянутыми, в них прогрессивно нарастает количество и длина крист. Это сопровождается повышением в цитоплазме нейронов активности маркерных ферментов митохондрий СДГ (фермента аэробного окисления углеводов в цикле Кребса) и NADH-ДГ (митохондриального фермента, участвующего в переносе электронов и являющегося важным связующим звеном между конечными продуктами распада углеродного скелета и дыхательной цепью). Это свидетельствует о прогрессивном повышении в постнатальном онтогенезе функциональной активности митохондрий и энергетического обеспечения нейронов.

На 5-е сутки после рождения в цитоплазме нейронов преобладают свободные рибосомы, а затем они постепенно связываются с мембра-



Органеллы нейронов внутренней пирамидной пластинки фронтальной коры мозга крыс на 5-е (а, г, ж), 20-е (б, д, з) и 45-е (в, е, и) сутки после рождения.

а—в — митохондрии; г—е — гранулярная эндоплазматическая сеть; ж—и — комплекс Гольджи. Я — ядро. Ув. 50 000

нами гранулярной эндоплазматической сети. При этом протяженность ее цистерн на единице площади цитоплазмы прогрессивно возрастает. Преобладание свободных рибосом на раннем этапе постнатального развития свидетельствует

об усилении биосинтеза белка для собственных нужд бурно растущих нейронов. Происходящее в более поздние сроки повышение протяженности цистерн гранулярной эндоплазматической сети и числа связанных рибосом свидетельствует

Таблица 1

**Показатели ультрамикроскопической морфометрии органелл нейронов
V пластинки фронтальной коры мозга крыс (Me; LQ; UQ)**

Органеллы	Показатели	Сроки после рождения, сутки		
		5-е	20-е	45-е
Митохондрии	Количество на 1 мкм ²	0,8 (0,6; 0,8)	1,4 (1,4; 1,6)*	1,9 (1,6; 2,2)*
	Площадь, мкм ²	0,075 (0,073; 0,08)	0,345 (0,34; 0,35)*	0,16 (0,15; 0,2)**
	Фактор формы, ед.	0,88 (0,87; 0,89)	0,64 (0,6; 0,66)*	0,62 (0,6; 0,64)*
	Фактор элонгации, ед.	1,37 (1,26; 1,5)	4 (3; 4,5)*	2,8 (2,76; 2,82)**
	Количество крист в митохондрии	4 (3; 4)	13,5 (12; 14)*	24,5 (24; 25)**
	Общая длина крист в одной митохондрии, мкм	0,6 (0,45; 0,64)	3,3 (2,9; 3,6)*	4,4 (3,8; 5)**
	Количество крист в одной митохондрии (на 1 мкм ²)	53 (41; 53)	39 (35; 40)	153 (125; 160)**
	Общая длина крист в митохондрии (на 1 мкм ²)	8 (6; 8)	9,6 (8,8; 10)*	25 (25; 25)**
Рибосомы	Связанные (на 1 мкм ²)	1,6 (1,4; 1,8)*	6,8 (6; 7)*	9 (8; 9,2)**
	Свободные (на 1 мкм ²)	13,8 (13,2; 14)	8,5 (8; 10)*	7 (6; 7,4)**
	Общее количество (на 1 мкм ²)	15,6 (14,6; 15,8)	15,3 (14; 17)	16 (14; 16,6)
Гранулярная эндоплазматическая сеть	Протяженность цистерн, мкм	0,39 (0,38; 0,4)	1,1 (1; 1,1)*	2,2 (2; 2,2)**
	Ширина цистерн, мкм	0,035 (0,03; 0,04)	0,1 (0,08; 0,1)*	0,071 (0,07; 0,074)**
Комплекс Гольджи	Ширина цистерн	0,15 (0,13; 0,16)	0,1 (0,08; 0,11)*	0,07 (0,06; 0,08)*
Лизосомы	Количество (на 1 мкм ²)	0,2 (0,2; 0,2)	0,8 (0,6; 0,8)*	0,5 (0,4; 0,6)*
	Площадь, мкм ²	0,039 (0,037; 0,04)	0,1 (0,08; 0,12)*	0,1 (0,1; 0,11)*
	Фактор формы, ед.	0,88 (0,86; 0,9)	0,9 (0,87; 0,92)	0,87 (0,85; 0,9)
	Фактор элонгации, ед.	1,41 (1,4; 1,43)	1,8 (1,7; 1,9)*	1,75 (1,7; 1,8)*

Здесь и в табл. 2: * различия по сравнению с показателями на 5-е сутки; + по сравнению с показателями на 20-е сутки после рождения значимы при $P < 0,05$.

Таблица 2

Активность ферментов в цитоплазме нейронов V пластинки фронтальной коры мозга крыс (Me; LQ; UQ), ед. оптич. плотности

Ферменты	Сроки после рождения, сутки		
	5-е	20-е	45-е
Сукцинатдегидрогеназа	—	0,14 (0,12; 0,16)	0,17 (0,16; 0,174)
NADH-дегидрогеназа	0,156 (0,15; 0,17)	0,2 (0,2; 0,23)*	0,24 (0,23; 0,26)*
Кислая фосфатаза	—	0,24 (0,22; 0,28)	0,23 (0,22; 0,236)

Примечание. Активность фермента не определялась — была ниже уровня чувствительности метода.

о нарастании биосинтеза белка на экспорт для его транспорта к формирующимся нервным окончаниям.

На 5-е сутки после рождения комплекс Гольджи еще не сформирован и представлен только округлыми вакуолями. Затем они преобразуются в плоские цистерны, ширина которых постепенно уменьшается. Относительное содержание лизосом и их размеры значительно увеличиваются к 20-м суткам после рождения, а затем несколько снижаются в постнатальном онтоге-

незе. Гистохимические исследование показали, что сходным образом изменяется и активность маркерного фермента лизосом КФ [2]. Все это отражает нарастание процессов аутофагии в этих нейронах.

Полученные нами результаты вполне согласуются с данными литературы о возрастных особенностях ультраструктуры и дифференцировке органелл тел пирамидных нейронов коры мозга крысы (рост перикарионов, усложнение структуры органелл) [7, 9, 11].

Полученные электронно-микроскопические и гистохимические данные впервые количественно характеризуют формирование и дифференцировку органелл, развитие энергетической, белоксинтезирующей систем и аппарата внутриклеточного переваривания и защиты нейронов внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры мозга крысы в постнатальном онтогенезе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бонь Е. И., Зиматкин С. М. Динамика гистологических изменений в париетальной коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя // Новости мед.-биол. наук. 2015. № 2. С. 146–151.
2. Бонь Е. И., Зиматкин С. М. Динамика цитохимических изменений в цингулатной коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя // Новости мед.-биол. наук. 2016. Т. 13, № 1. С. 17–22.
3. Каркищенко Н. Н., Грачева С. В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль-2С, 2010.
4. Корочкин Л. И. Дифференцировка и старение нейрона. М.: Наука, 1959.
5. Микеладзе А. Л. Электронно-микроскопическая дифференциация нервных клеток коры головного мозга // Сообщ. АН Грузинской ССР. 1971. Т. 61. С. 709–712.
6. Попова З. А. О возрастных изменениях строения коры больших полушарий белой мыши в постэмбриональной жизни // Вопросы нейроморфологии. Ярославль: изд. Минздрава РСФСР, 1959. С. 47–51.
7. Попова Э. Н., Лапин С. К., Кривецкая Г. Н. Морфология приспособительных изменений нервных структур: монография. М.: Медицина, 1976.
8. Смирнова Г. В. Ультраструктура вегетативных ганглиев белых крыс в онтогенезе: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саранск, 1999.

9. Parnavelas J. G., Lieberman A. R. An ultrastructural study of the maturation of neuronal somata in the visual cortex of the rat // Anat. Embryol. 1979. Vol. 157. P. 311–328.
10. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Sydney: Academic Press, 1998.
11. Sato I., Konishi K., Mikami A. Developmental changes in enzyme activities and in morphology of rat cortex mitochondria // Okajimas Folia Anat. Jpn. 2000. Vol. 76. P. 353–361.

Поступила в редакцию 10.05.2016

Получена после доработки 24.11.2016

POSTNATAL ORGANELLOGENESIS IN PYRAMIDAL NEURONS OF RAT CEREBRAL CORTEX

S. M. Zimatkin, Ye. I. Bon'

Quantitative ultrastructural and histochemical assessment of postnatal organellogenesis in internal pyramidal layer neurons was performed on rat brain frontal cortex 5, 20, and 45 days after birth (4 animals of each age). Enlargement of perikarya and orderly development of neuronal organelles was found in postnatal ontogenesis. With age, the number of mitochondria progressively increased and they became more elongated, in parallel with the continuous growth of the amount and length of their cristae. This was accompanied by the increase of the activity of mitochondrial marker enzymes succinate dehydrogenase and NADH dehydrogenase. At postnatal Day 5, free ribosomes prevailed in the cytoplasm of neurons, while later granular endoplasmic reticulum became more prominent with a progressive growth of the length of its cisterns. The Golgi complex was not yet organized at postnatal Day 5, its formation was completed by Day 20. The content of lysosomes and their size increased considerably by Day 20; the activity of lysosomal marker enzyme acid phosphatase changed in a similar manner.

Key words: *organellogenesis, pyramidal neurons, frontal cortex*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, Belarus