

© С. М. Зиматкин, О. А. Карнюшко, О. Б. Островская, 2017
УДК 611.817.1.018:612.65:599.323.4

С. М. Зиматкин, О. А. Карнюшко, О. Б. Островская

ПОСТНАТАЛЬНЫЙ МОРФОГЕНЕЗ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ

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

С использованием электронно-микроскопического и гистохимического методов исследования проведена количественная оценка развития органелл клеток Пуркинье мозжечка у беспородных крыс ($n=36$) в постнатальный период онтогенеза (2-, 7-, 15-, 45-е сутки). Обнаружено уменьшение ядерно-цитоплазматического отношения, увеличение площади ядрышка, возрастание размеров и удлинение митохондрий, количества связанных с мембранами рибосом и длины канальцев гранулярной эндоплазматической сети, увеличение количества и размеров лизосом и относительной площади, занимаемой ими на срезах цитоплазмы.

Ключевые слова: *мозжечок, клетка Пуркинье, ультраструктура, морфометрия*

Формирование дефинитивной структуры коры мозжечка у крысы происходит в течение длительного периода постнатального онтогенеза [7]. Этот процесс связан с дифференцировкой нейронов, образованием нейронных связей и их функциональной специализацией [6]. Клетки Пуркинье (КП) мозжечка принимают поступающую в кору информацию и по своим аксонам осуществляют её выход. В связи с этим сведения о количестве, структурной и ультраструктурной организации этих нейронов являются необходимыми для понимания морфогенеза мозжечка [8].

У крысы предшественники КП формируются на 13–16-е сутки эмбриогенеза в вентрикулярном слое крыши IV желудочка, а затем мигрируют в радиальном направлении, образуют многорядный слой и только к 3–4-м суткам постнатального развития слой КП становится однорядным. Выравнивание КП в монослой обеспечивается механическими факторами: давлением утолщающегося зернистого слоя и барьером, образованным параллельными волокнами, препятствующими смещению перикарионов КП в молекулярный слой. Затем до 12-суточного возраста расстояние между перикарионами КП быстро увеличивается, что связано с формированием вокруг них нейропиля. Увеличение размеров самих перикарионов и рост дендритов продолжаются до 30-х суток, при этом сопровождаются ультраструктурными изменениями в этих нейронах [5]. У новорожденных крысят в цитоплазме КП содержатся большое количество свободных рибосом, формирующий комплекс Гольджи,

к 10-м суткам — большое количество митохондрий, гладкая эндоплазматическая сеть, тело КП окружено глией [4], а к 15-суточному возрасту увеличивается количество рибосом, связанных с мембранами [5]. На светооптическом уровне описана постнатальная дифференцировка КП, характеризующаяся увеличением размеров их перикарионов, уменьшением количества на единице длины извилины, изменением соотношения данных клеток по хроматофилии цитоплазмы [2]. Количественная оценка развития органелл КП — филогенетически древней коры мозжечка крысы в динамике постнатального онтогенеза в литературе отсутствует.

Цель настоящего исследования — качественная и количественная оценка динамики постнатального органеллогенеза в развивающихся КП мозжечка крысы.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на самках беспородных белых крыс с исходной массой 180 ± 20 г и родившемся от них потомстве — 36 крысят (электронно-микроскопическое исследование — 12 крысят, гистохимическое — 24). Исследование проведено с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», а также получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 7 от 23.12.2013 г.). Животные находились на стандартном рационе вивария. От каждой самки брали по одному крысенку по достижении ими 2-, 7-, 15-х и 45-х суток после рождения и декапитуировали. Для изучения особенностей метаболизма КП образцы мозжечка замораживали в жидком азоте. В криостате Leica CM 1850 (Leica Microsystems GmbH, Германия) при температуре -14°C готовили сагиттальные криостатные срезы, кото-

Сведения об авторах:

Зиматкин Сергей Михайлович (e-mail: smzimatkina@mail.ru), *Карнюшко Ольга Анатольевна* (e-mail: karnyushko-olga@mail.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, *Островская Оксана Борисовна* (e-mail: Astrowskaja@gmail.com), Научно-исследовательская лаборатория НИЧ УО «Гродненский государственный медицинский университет», 230015, г. Гродно, ул. Горького, 80

рые обрабатывали для выявления активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ, сукцинат: акцептор — оксидоредуктаза).

Расположение филогенетически древнего отдела коры мозжечка в гистологических препаратах развивающегося мозжечка крысят определяли по С.Н.Оленеву [3] и G.Paxinos и С.Watson [11]. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование и морфометрическое исследование проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). Количественную оценку активности СДГ осуществляли, определяя оптическую плотность полученного осадка хромогена в цитоплазме нейронов на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакций. Относительную активность фермента выражали в единицах оптической плотности.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки мозжечка помещали в 1% осмиевый фиксатор на буфере Миллонига (рН 7,4) на 2 ч при температуре 4 °С [10]. Далее их промывали в смеси буфера Миллонига (20 мл) и сахарозы (900 мг), обезвоживали в этаноле восходящей концентрации, ацетоне, проводили через смеси смол (Araldite M+Araldite M hardener 964+дибутилфталат+Araldite M accelerator 960) (Sigma-Aldrich) и ацетона, заключали в заливочную смолу. Затем изготавливали ультратонкие срезы толщиной около 35 нм на ультрамикротоме EM UC 7 (Leica, Германия), собирали на опорные медные сеточки (Sigma, размер ячейки 300x83), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца [12]. Полученные препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония), фотографировали цифровой камерой Olympus MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия). Морфометрию ультраструктур проводили с помощью программы для обработки изображения iTEM (JEOL, Япония). Измеряли площадь перикариона КП, ядра, ядрышка, подсчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение, оценивали количество лизосом, индивидуальную, относительную площадь в цитоплазме, форму митохондрий, количество и длину крист на 1 мкм² митохондрий, а также ширину цистерн комплекса Гольджи (КГ), длину цистерн гранулярной эндоплазматической сети (ГЭС), количество связанных рибосом на 1 мкм длины цистерны ГЭС. Полученные средние значения от животных каждой экспериментальной группы анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows (Stat. Soft, Inc., США). В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR).

Результаты исследования. У крыс в постнатальном периоде онтогенеза (со 2-х по 15-е сутки) по мере дифференцировки происходит прогрессивное увеличение размеров перикарионов и ядер КП. К 45-м суткам размеры перикарионов уже не возрастают, а ядер — даже уменьшаются. При этом происходит 3-кратное уменьшение ядерно-цитоплазматического отношения. Ядрышки КП со 2-х по 45-е сутки увеличиваются в размерах. На 45-е сутки после рождения их площадь в 4 раза больше, чем на 2-е сутки (табл. 1).

У 2-суточных крысят КП располагаются в несколько рядов, все нормохромные. В КП ядра овальные, ядерная оболочка образует неглубокие инвагинации, перинуклеарное пространство узкое. В ядре равномерно расположен эухроматин, который слегка конденсирован у ядерной оболочки. В центре ядра или несколько эксцентрично расположено ядрышко, состоящее из фибриллярного и гранулярного компонентов. В апикальной части КП сконцентрирована большая часть цитоплазмы, где равномерно расположены митохондрии, имеющие преимущественно округлую форму (рисунок, а).

Некоторые митохондрии имеют электронно-плотный матрикс. Цистерны ГЭС короткие (см. рисунок, д), расположены рядом с митохондриями. КГ еще полностью не сформирован, чаще представлен группой плотно расположенных вакуолей, реже состоит из нескольких коротких цистерн, параллельных друг другу (см. рисунок, и). Формирующаяся ГЭС представлена короткими канальцами. В базальной части перикарионов расположены только свободные рибосомы.

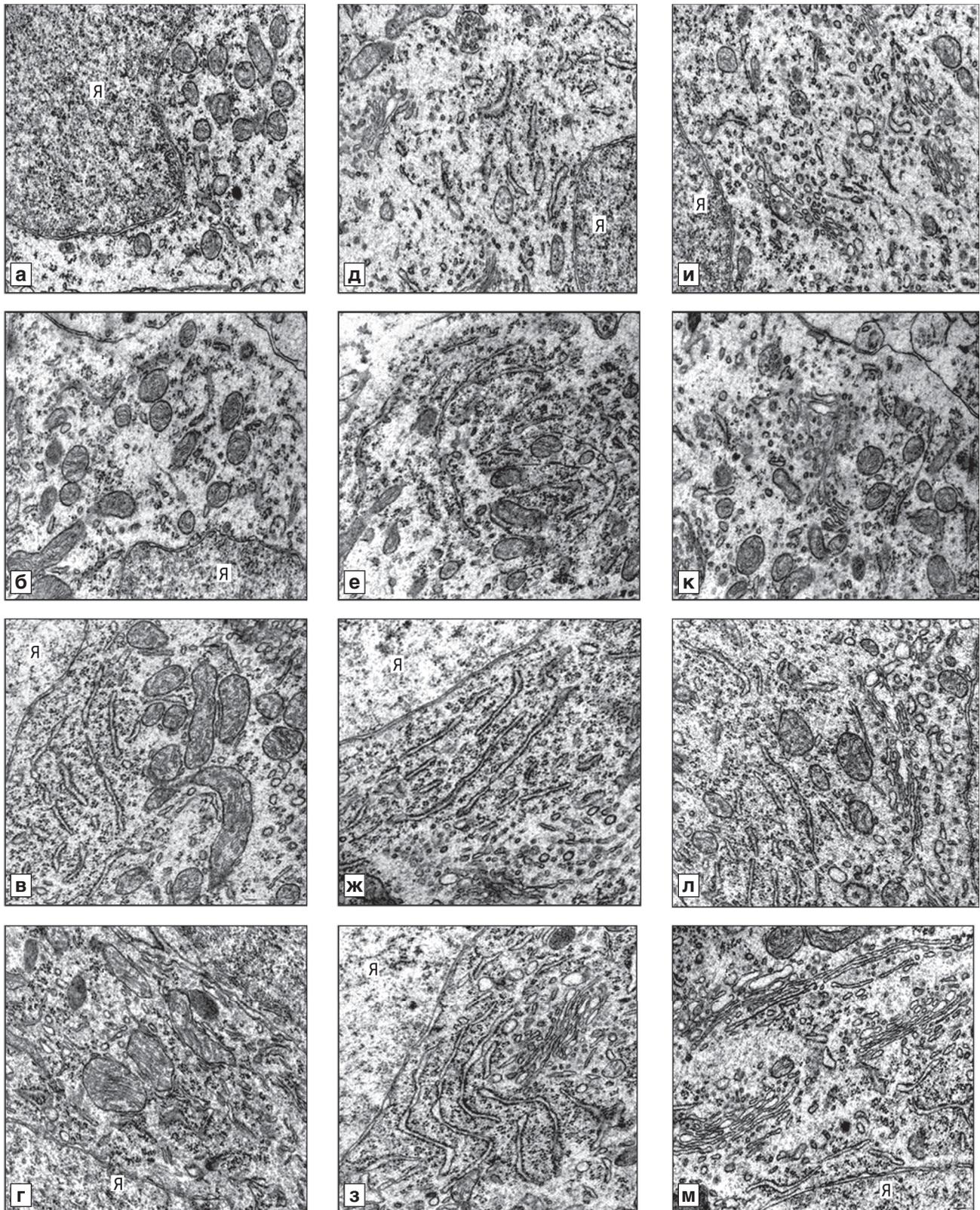
На 2-е сутки постнатального периода онтогенеза количество митохондрий на единице площади цитоплазмы наибольшее, а по мере роста перикариона к 45-м суткам — снижается в 2 раза, но прогрессивно увеличиваются (2–45-е сутки) их размеры. При этом площадь, занимаемая митохондриями в цитоплазме КП, варьирует в раз-

Таблица 1

Размеры клеток Пуркинье (КП) мозжечка в разные сроки постнатального развития крысы (Me±IQR)

Объект исследования	Показатель	Возраст крыс (сутки)			
		2-е	7-е	15-е	45-е
Перикарион КП	Площадь, мкм ²	48,39±4,27	94,68±26,25*	189,97±26,45*#	190,95±18,57*#
Ядро КП	Площадь, мкм ²	25,61±3,38	37,15±9,95*	56,13±9,17*#	48,61±13,22*#
Ядрышко КП	Площадь, мкм ²	0,86±0,34	1,97±0,76*	3,04±0,64*#	3,61±0,50*#
КП	Ядерно-цитоплазматическое отношение	1,05±0,49	0,78±0,22*	0,46±0,03*#	0,32±0,07*#

Здесь и в табл. 2: * различия значимы по сравнению с показателями на 2-е сутки, # по сравнению с показателями на 7-е сутки, + по сравнению с показателями на 15-е сутки при P<0,05.



Органеллы клеток Пуркинье мозжечка крыс.

а—г — митохондрии; д—з — гранулярная эндоплазматическая сеть; и—м — комплекс Гольджи. а, д, и — на 2-е сутки; б, е, к — на 7-е сутки; в, ж, л — на 15-е сутки; г, з, м — на 45-е сутки постнатального периода развития; Я —ядро. Ув. 40 000

ные сроки от 6 до 10% (табл. 2). Округлая форма этих органелл характерна для раннего периода постнатального онтогенеза (2–15-е сутки), затем она меняется на более удлиненную (45-е сутки) (см. табл. 2). Со 2-х по 45-е сутки относительное количество крист на 1 мкм² площади митохондрии почти не изменяется, но при этом к 45-м суткам в 1,5 раза увеличивается их длина (см. табл. 2). Соответственно в цитоплазме КП мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе прогрессивно повышается активность фермента митохондрий СДГ (2-е сутки — 0,10±0,02; 7-е сутки — 0,21±0,03; 15-е сутки — 0,22±0,02; 45-е сутки — 0,21±0,02 ед. опт. пл.).

Со 2-х по 45-е сутки прогрессивно увеличивается средняя длина цистерн ГЭС, количество рибосом, связанных с мембранами на 1 мкм длины цистерны ГЭС, почти не изменяется (см. табл. 2), но при этом в цитоплазме располагается большое количество свободных рибосом.

На 2-е и 7-е сутки в КП мозжечка КГ представлен скоплениями вакуолей и короткими узкими цистернами, на 15-е и 45-е сутки — параллельно расположенными более протяженными цистернами, количество которых возрастает. Ширина

цистерн КГ со 2-х по 45-е сутки постепенно возрастает (см. рисунок, и–м; табл. 2).

На 2–15-е сутки постнатального развития количество лизосом на единице площади цитоплазмы и их удельная площадь в цитоплазме остаются крайне небольшими, а к 45-м суткам резко возрастают. Небольшое увеличение площади лизосом в КП наблюдается у 7-суточных крысят по сравнению с таковым у 2-суточных, к 15-м суткам их площадь становится меньше, а затем возрастает к 45-м суткам почти в 2 раза, чем в 15 сут (см. табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, постнатальная дифференцировка КП сопровождается изменениями ультраструктуры. По мере созревания нейронов площадь их перикарионов увеличивается в большей степени, чем площадь ядра, что приводит к прогрессивному уменьшению ядерно-цитоплазматического отношения.

Незрелая КП характеризуется малым количеством цитоплазмы, в которой не сформирована эндоплазматическая сеть, а свободные рибосомы значительно преобладают над связанными, митохондрии округлой формы, имеют небольшие

Таблица 2

Постнатальный органеллогенез в клетках Пуркинье (КП) мозжечка крысы (Me± IQR)

Структура цитоплазмы КП	Исследованные показатели	Возраст крыс (сутки)			
		2-е	7-е	15-е	45-е
Митохондрии	Количество на 1 мкм ² цитоплазмы	2,60±1,25	1,19±0,05*	1,37±0,16*#	1,07±0,24*+
	Средняя площадь, мкм ²	0,04±0,01	0,06±0,04	0,07±0,03*	0,09±0,01*#
	Фактор элонгации	1,46±0,55	1,55±0,52	1,78±0,62	2,62±0,85*#
	Фактор формы	0,87±0,10	0,83±0,07	0,83±0,15	0,68±0,14*#
	Количество крист на 1 мкм ² митохондрии	55,21±10,07	51,22±19,64	42,38±5,83*	56,77±13,51+
	Длина крист на 1 мкм ² митохондрии	7,50±1,36	8,87±1,59	8,91±1,96	11,29±4,69*#+
	Доля площади, занимаемая в цитоплазме, %	8,18±4,29	6,68±4,72	10,35±4,91	9,75±3,25#
Рибосомы	Связанные на 1 мкм цистерн ГЭС	37,06±7,69	34,18±4,70	31,38±3,48	38,81±18,13
	Свободные на 1 мкм ² цитоплазмы	61,98±21,78	70,18±27,52	62,51±11,34	71,77±30,13
Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГЭС)	Длина цистерны	0,25±0,06	0,34±0,05	0,45±0,04*#	0,86±0,26*#+
Комплекс Гольджи	Ширина цистерн	0,03±0,00	0,04±0,00*	0,05±0,01*#	0,05±0,01*#
Лизосомы	Количество на 1 мкм ² цитоплазмы	0,03±0,06	0,02±0,06	0,02±0,03	0,10±0,02*
	Средняя площадь, мкм ²	0,03±0,01	0,06±0,01*	0,04±0,01*#	0,07±0,03*+
	Доля площади, занимаемая в цитоплазме, %	0,06±0,18	0,14±0,32	0,09±0,11	0,68±0,12*#+

размеры. На начальном этапе развития КП преобладание свободных рибосом обусловлено биосинтезом белков, определяющих морфогенетические процессы, лежащие в основе дифференцировки клеток. Длительное сохранение большого количества свободных рибосом в КП связано с продолжительным периодом роста дендритов этих клеток [1]. Основным показателем созревания нейронов — увеличение количества рибосом на мембранах и формирование ГЭС связано с биосинтезом белков, осуществляющих синаптическую передачу. Со 2-х по 45-е сутки происходит уменьшение плотности расположения митохондрий в цитоплазме, что обусловлено значительным (в 4 раза) увеличением площади перикарионов. При этом площадь, занимаемая этими органеллами в цитоплазме, изменяется мало, что связано с увеличением их размеров. Наблюдается также возрастание количества и длины крист, сопровождающееся повышением в цитоплазме активности СДГ (фермент цикла Кребса), что является необходимым для энергетического обеспечения функций зрелых КП. Уменьшение фактора формы и увеличение фактора элонгации митохондрий обусловлено изменением их округлой формы на более удлиненную. К 45-м суткам в 3 раза (по сравнению с 2-суточными крысами) возрастает количество лизосом на 1 мкм² цитоплазмы, что свидетельствует о формировании внутриклеточного аппарата переваривания и защиты, необходимого для удаления (путем аутофагии) поврежденных мембран и органелл. В постнатальном онтогенезе процесс дифференцировки КП сопровождается формированием КГ, ростом, упорядоченным расположением и расширением его цистерн.

Полученные количественные данные согласуются и дополняют уже имеющиеся сведения о созревании КП мозжечка крысы в постнатальном онтогенезе [4, 9]. Наиболее информативными морфометрическими показателями зрелости КП были: уменьшение ядерно-цитоплазматического отношения, увеличение площади ядрышка, возрастание размеров и удлинение митохондрий, увеличение количества связанных с мембранами рибосом и длины канальцев ГЭС, увеличение количества, размеров лизосом и относительной площади, занимаемой ими в цитоплазме.

Таким образом, применение морфометрии ультраструктур для описания динамики постнатального органеллогенеза КП мозжечка позволяет объективно оценить процесс постнатальной дифференцировки КП мозжечка крысы, сопровождающийся усложнением синтетического, энергетического аппарата и аппарата внутриклеточного

переваривания и защиты. Данный способ является эффективным и может быть использован также при изучении влияния на постнатальный морфогенез мозжечка различных экспериментальных воздействий и патологических состояний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Будко К.П., Гладкович Н.Г., Максимова Е.В. Нейроонтогенез. М.: Наука, 1985.
2. Карнюшко О.А., Зиматкин С.М. Нарушения морфогенеза коры мозжечка потомства крыс с экспериментальным холестазом и их коррекция // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2015. № 3. С. 95–101.
3. Оленев С.Н. Развивающийся мозг. Л.: Наука, 1978.
4. Altman J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer // J. Comp. Neurol. 1972. Vol. 145, № 4. P. 399–463.
5. Altman J., Winfree A.T. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. V. Spatial organization of Purkinje cell perikarya // J. Comp. Neurol. 1977. Vol. 171, № 1. P. 1–16.
6. Andjus P.R., Zhu L., Cesa R. et al. A change in the pattern of activity affects the developmental regression of the Purkinje cell polyinnervation by climbing fibers in the rat cerebellum // Neuroscience. 2003. Vol. 121, № 3. P. 563–572.
7. Asari M.A., Abdullan M.S., Ismail Z.I. Histomorphometric study on the effect of low dose deltamethrin on the developing cerebellar cortex // Turk. J. Med. Sci. 2010. Vol. 40, № 6. P. 943–948.
8. Castejon O.J. Correlative microscopy of Purkinje cells // Biocell. 2011. Vol. 35, № 3. P. 1–29.
9. Lewandowska E., Stępień T., Wierzbą-Bobrowicz T. et al. Alcohol-induced changes in the developing cerebellum. Ultrastructural and quantitative analysis of neurons in the cerebellar cortex // Folia Neuropathol. 2012. Vol. 50, № 4. P. 397–406.
10. Millonig G. Advantages of a phosphate buffer or OsO₄ solutions in fixation // J. Appl. Physics. 1961. Vol. 32. P. 1637–1643.
11. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th ed. London: Academic Press, 2007.
12. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. Vol. 17. P. 208–212.

Поступила в редакцию 02.11.2016
Получена после доработки 17.03.2017

POSTNATAL MORPHOGENESIS OF PURKINJE CELLS IN RAT CEREBELLUM

S.M. Zimatkin, O.A. Karniushko, O.B. Ostrovskaya

Using electron microscopical and histochemical methods, the development of the organelles was examined quantitatively in the cerebellar Purkinje cells of the outbred rats (n=36) in the postnatal period of ontogenesis (Days 2, 7, 15, 45). The study has demonstrated a decrease of nuclear-cytoplasmic ratio, an increase of the nucleolar area, enlargement and lengthening of mitochondria, an increase of the number of membrane-bound ribosomes and of the length of rough endoplasmic reticulum cisterns, an increase in the number and size of lysosomes and the relative area they occupy in the sections of cell cytoplasm.

Key words: *cerebellum, Purkinje cell, ultrastructure, morphometry*

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