

10. Castacevra-Perdomo A. Afferent connections of the visual cortex in the albino mous. J. Hirnforsch., 1984, v. 25, № 4, p. 405–416.
11. Ilinsky I., Ambardekar A. and Ilinsky K. Organization of projections from anterior pole of nucleus reticularis thalami (MRT) and electron microscopic studies in the rhesus monkey. J. Comp. Neurol., 1999, v. 409, № 3, p. 369–384.
12. Laborsky L., Hoemke L., Moheberg H. et al. Stereotaxic probabilistic maps of the magnocellular cell groups in human forebrain. Neuroimage, 2008, v. 42, p. 1127–1141.
13. Schenker N.M., Buxhoeveden D.P., Blackmon W.L et al. A comparative qualitative analysis of cytoarchitecture and minicolumnar organization in Broca's area in humans and great apes. J. Comp. Neurol., 2008, v. 510, p. 117–128.
14. Scheperjans F., Eickhoff S.B., Hömke L. et al. Probabilistic maps, morphometry and variability of cytoarchitectonic areas in the human superior parietal cortex. Cereb. Cortex, 2008, v. 18, p. 2141–2157.
15. Uylings H.B.M., Jacobsen A.M., Zilles K. and Amunts K. Left-right asymmetry in volume and number of neurons in adult Broca's Area. Cortex, 2006, v. 42, p. 652–658.

Поступила в редакцию 05.03.10

PECULIARITIES OF NEURONAL SIZES OF ANTERIOR DORSAL AND RETICULAR NUCLEI OF THE THALAMUS IN WOMEN

V.V. Amunts, A.D. Antiukhov, I.N. Bogolepova and A.V. Sveshnikov

Profile field areas (PFA) were studied in 100 neurons in the anterior dorsal (ADN) and reticular nuclei (RN) of the thalamus in the left and right cerebral hemispheres of five women (10 hemispheres) aged from 19 to 33 years, using 20 µm-thick sections stained with Nissl's cresyl violet. Morphometric method using Image Scope Color «Leica DM 2500» program-device complex (Germany) was applied. «Statistica 6.0» (Wilcoxon matched pairs test) was used for the analysis of the data obtained. Greater variability of neuronal maximal PFA was detected in both nuclei in the right hemisphere. PFA average value was greater in RN than in ADN, and this difference was more significant in the left hemisphere in all women. The variability of average PFA value was greater in RN than in ADN, however in both nuclei it was greater on the right than on the left. Neuronal PFA variability was more expressed than its interhemispheric asymmetry.

Key words: *neurons, thalamus, morphometry, asymmetry*

Laboratory of Brain Anatomy and Architectonics, RAMS Scientific Center of Neurology, Moscow

© Коллектив авторов, 2010
УДК 11.813.3:612.273.2:612.64:599.323.4

Л.И. Хожай, В.А. Отеллин, Т.Т. Шишко и В.Б. Косткин

НАРУШЕНИЯ СТАНОВЛЕНИЯ РАЗНЫХ ПОЛЕЙ ГИППОКАМПА У КРЫС КАК ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ОСТРОЙ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

Лаборатория онтогенеза нервной системы (зав. — чл.-кор. РАН проф. В.А. Отеллин), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; e-mail: astarta0505@mail.ru, otellin@mail.ru, infran@mail.ru

Целью работы было изучение отдаленных последствий воздействия острой нормобарической гипоксии в перинатальный период в становлении гиппокампальной формации у крыс. Проведенное исследование показало, что воздействие гипоксии на 2-е сутки постнатального развития приводит к значительному повреждению структуры полей гиппокампа, при этом обнаружена разная их чувствительность к повреждающему фактору. На 20-е сутки во всех полях наблюдается гибель клеток и истончение слоев пирамидных нейронов. Наиболее выраженная гибель нейронов имеет место в полях CA4 и CA3. На 30-е сутки в поле CA4 сохраняется значительная гибель нейронов, она снижается в поле CA3 и не обнаруживается в поле CA1, однако в fascia dentata гибель нейронов зернистого слоя увеличивается. Наряду с этим, уменьшаются размеры тел пирамидных нейронов во всех полях гиппокампа. Также во всех полях гиппокампа обнаруживается активация астроцитарной реакции, она более выражена в поле CA4, где глиоз сохраняется до препубертатного возраста (30 сут).

Ключевые слова: гиппокамп, перинатальная гипоксия, гибель клеток, размер нейронов, реакция астроцитов.

Перинатальная гипоксия является одной из основных причин возникновения энцефалопатий у новорожденных, как животных, так и человека. Последствиями этих нарушений, как правило, являются риск развития эпилепсии и нарушения многочисленных поведенческих реакций в дальнейшей жизни [2, 3, 5]. Наблюдения указанных

авторов показали, что краткосрочная гипоксия новорожденных вызывает изменения в некоторых отделах головного мозга, в частности, в гиппокампе — центре лимбической системы, обеспечивающем организацию ориентировочного рефлекса и внимания, регуляцию вегетативных реакций, мотиваций и эмоций, двигательных реак-

ций, механизмов памяти и обучения. Становление и созревание гиппокампа происходит в основном в ранний постнатальный период, поэтому он очень уязвим и чувствителен к воздействиям разного рода повреждающих факторов именно в это время. Показано, что перинатальная гипоксия приводит к гибели части пирамидных нейронов и изменению их числа в полях гиппокампа [2, 4, 6], а также оказывает воздействие на макроглию коры большого мозга и гиппокампа [8, 9]. При этом имеющиеся морфологические данные свидетельствуют об изменениях в основном в дорсальном отделе гиппокампа. Вместе с тем, несмотря на внимание, которое уделяется этой структуре, до настоящего времени отсутствуют сравнительные данные о чувствительности к гипоксии нейронов разных полей гиппокампа в неонатальный период. Вопрос о морфологических изменениях в отделах гиппокампа после воздействия перинатальной гипоксии, проявляющихся в последующем онтогенезе, остается открытым и нуждается в специальном исследовании для более глубокого понимания механизмов развития психоневрологических расстройств у детей.

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение отдаленных последствий острой нормобарической гипоксии мозга в перинатальный период при формировании разных полей гиппокампальной формации у крыс.

Материал и методы. Воздействие гипоксии на головной мозг новорожденных крысят осуществляли в барокамере СВК-150 (Россия), оснащенной устройством для автоматически управляемого обогрева, смены газовой смеси и определения скорости потока газа. Азотно-кислородную газовую смесь готовили с помощью газоаналитической и газосмесительной установки (Laorg, Франция). Подопытных животных помещали в барокамеру на 1 ч. Во время экспериментов содержание кислорода в барокамере составляло 7,6–7,8%; углекислого газа — 0,15–0,21%; температура — 21,3–23 °C; общее давление — нормальное. В работе были использованы 3 группы животных: 1-я (экспериментальная) группа — крысята, подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии; 2-я (контрольная) группа — животные после нахождения в барокамере при нормальных условиях (содержание кислорода в воздухе 21–22%, температура — 21–23 °C и нормальное давление); 3-я (контрольная) группа — интактные животные того же возраста. В каждой группе было по 8–10 крысят. Воздействие гипоксии осуществляли на 2-е сутки после рождения. Гистологическое исследование отделов гиппокампа (CA1, CA3, CA4 и fascia dentata) проводили на 20-е и 30-е сутки. Головной мозг фиксировали в жидкости Буэна или в смеси этилового спирта 96°, формалина и хлорида цинка (для иммуноцитохимического исследования) [1]. Материал по общепринятой методике заливали в парафин, готовили фронтальные срезы толщиной 5 мкм, которые после депарафинирования окрашивали метиленовым синим по методу Ниссля. Иммуноцитохимическую реакцию для выявления глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) проводили

с использованием поликлональных антител (Dako, США) и вторичных антител EnVision+Rb (DakoCytomation, США). Для выявления продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, США). После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Майера. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Для компьютерной морфометрии использовали гистологические фронтальные срезы гиппокампа на уровне Bregma –4,44 мм и –4,56 мм, окрашенные метиленовым синим по методу Ниссля. С помощью цифровой камеры, встроенной в микроскоп, получали изображения, на которых при помощи программы ImageJ исследовали площадь тел нейронов разных полей гиппокампа. Измерения проводили на 15 серийных гистологических срезах мозга (использовали каждый 3-й срез) у 5 животных в экспериментальной и контрольных группах. Определяли среднее арифметическое значение площади тел нейронов разных полей гиппокампа и ошибку среднего значения. Статистическую обработку полученных морфометрических показателей осуществляли при помощи компьютерных программ ImageScope Color и Origin 50. Различия считали значимыми (по критерию Стьюдента) при $P < 0,05$.

Исследования проводили под световым микроскопом DME (Leica, Германия), изображения были получены при помощи цифровой видеокамеры EC3 фирмы Leica (Германия).

Результаты исследования. В гиппокампальной формации у крысят обеих контрольных групп различий в структуре всех ее полей не выявлено. При исследовании полей гиппокампа на 20-е сутки после воздействия острой гипоксии обнаружено, что во всех полях имеет место гибель пирамидных нейронов.

В поле CA1 встречаются единичные нейроны с признаками гиперхроматоза, при этом слой пирамидных нейронов истончен и состоит из 3–4 рядов клеток, тогда как в контроле присутствуют 6–7 рядов нейронов. В поле CA3 локально (уровень Bregma –4,56 мм и –4,80 мм) обнаруживается значительная гибель нейронов, в некоторых местах слой нейронов истончается до 2–3 рядов клеток, многие из которых также имеют признаки гиперхроматоза разной степени выраженности. На других уровнях поля CA3 выявляются места выпадения нейронов. В поле CA4 в данный срок развития имеется значительная гибель клеток (рисунок, а). В fascia dentata преимущественно в нижних рядах нейронов зернистого слоя присутствуют единичные диффузно рассеянные клетки с признаками гиперхроматоза.

При исследовании полей гиппокампа на 30-е сутки после воздействия гипоксии обнаружено, что в отличие от предыдущего срока развития гибель клеток происходит не во всех полях.

В поле CA1 гибель клеток не выявлена, однако слой пирамидных нейронов истончен и состоит из 3–4 рядов клеток. В поле CA3 присутствуют

как погибшие, так и клетки с признаками гиперхроматоза разной степени выраженности. Слой нейронов также истончен до 2–3 рядов клеток (см. рисунок, б, в). В поле СА4 сохраняется значительное число нейронов, имеющих признаки гиперхроматоза. В fascia dentata гибель нейронов зернистого слоя, преимущественно в нижних рядах, увеличивается.

При сравнительном морфометрическом исследовании на 20-е и 30-е сутки обнаружено изменение размеров площадей сечения клеточных тел нейронов в разных полях гиппокампа после воздействия гипоксии. В поле СА1 в контроле к 20-м суткам нейроны достигают дефинитивного размера, который к 30-м суткам практически не изменяется. После воздействия гипоксии как на 20-е, так и на 30-е сутки размеры нейронов значительно меньше, чем в контроле (таблица). Нейроны в поле СА3 у контрольных животных также достигают дефинитивного размера к 20-м суткам. После воздействия гипоксии размеры клеток значимо меньше, чем в контроле, и остаются таковыми до 30-х суток (см. таблицу). В поле СА4 нейроны достигают дефинитивных размеров также к 20-м суткам, после воздействия гипоксии их размеры значимо меньше, чем в контроле, и по мере развития эти значения не изменяются с увеличением постнатального возраста (см. таблицу).

Иммуноцитохимическая реакция на GFAP показала, что перинатальная гипоксия приводит к увеличению количества активированных астроцитов во всех полях гиппокампа и особенно значительно в поле СА4 (см. рисунок, г, д).

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование показало, что воздействие острой нормобарической гипоксии в перинатальный период приводит к существенному повреждению структуры всех полей гиппокампа, при этом обнаружена разная их чувствительность к повреждающему фактору. У крыс на 20-е сутки во всех полях наблюдается истончение слоев

пирамидных нейронов и клеточная гибель, наиболее выраженная в полях СА4 и СА3. По мере увеличения возраста (к 30-м суткам развития) сохраняется значительная гибель клеток в поле СА4, сокращается — в поле СА3 и не обнаруживается — в поле СА1, однако в fascia dentata гибель нейронов зернистого слоя с увеличением возраста повышается. Наряду с этим, имеет место статистически значимое уменьшение размеров клеточных тел пирамидных нейронов во всех полях гиппокампа. Также во всех полях обнаруживается активация астроцитарной реакции, она более выражена в поле СА4, где глиоз сохраняется до препубертатного возраста (30-е сутки).

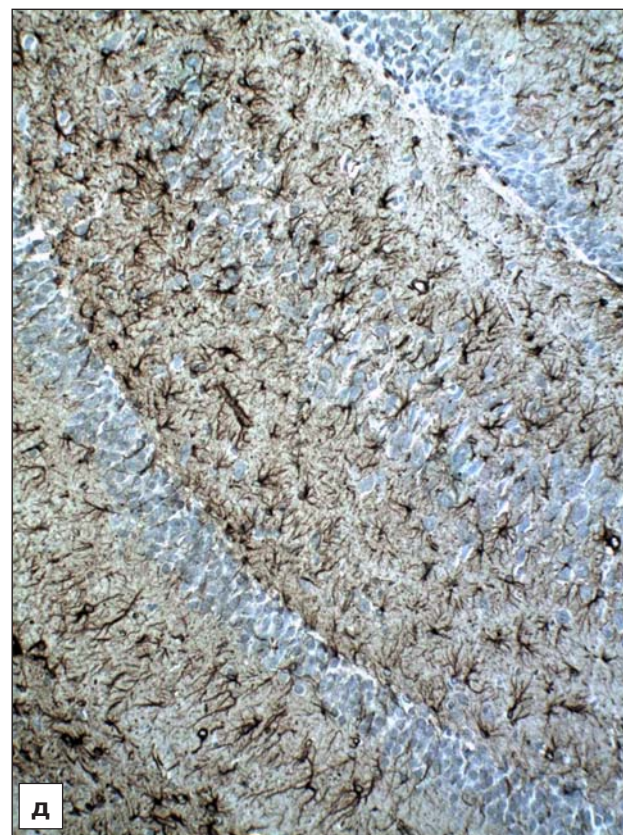
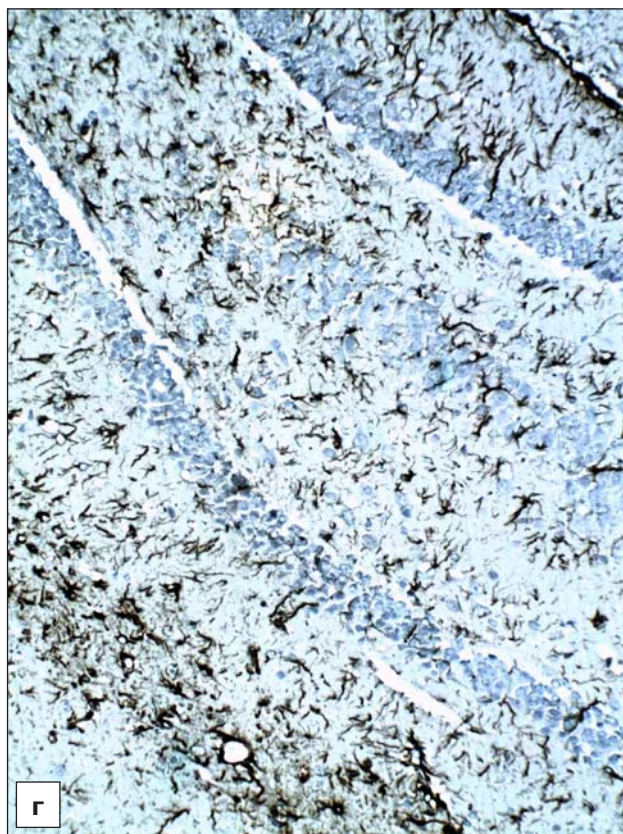
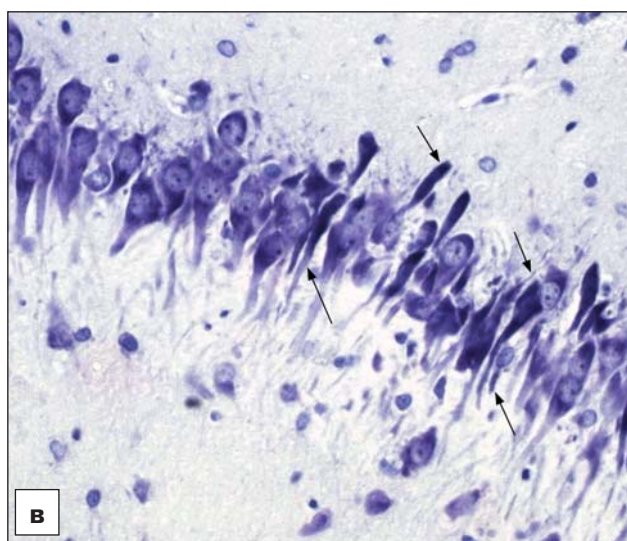
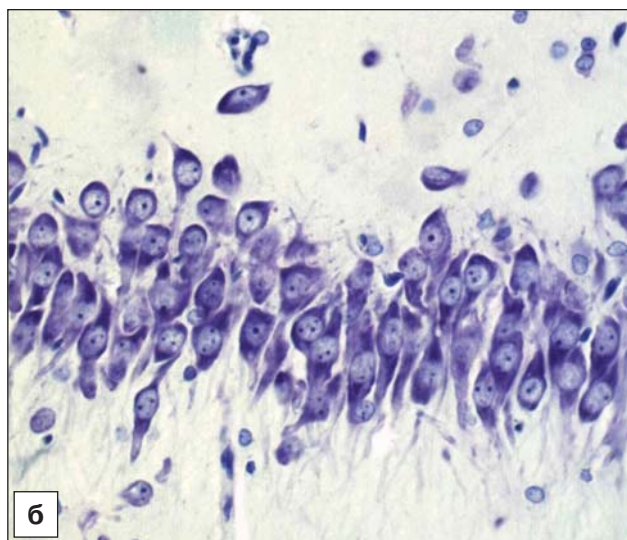
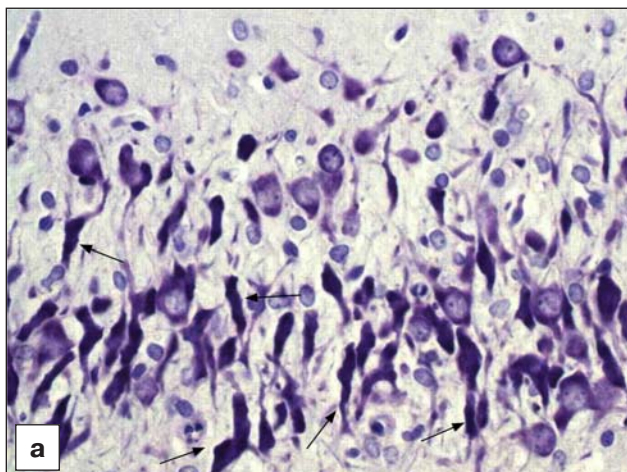
В настоящем исследовании впервые получены данные о том, что разные поля гиппокампа в перинатальный период неодинаково реагируют на гипоксическое воздействие, а также представлены доказательства существования длительного следа перинатальной гипоксии в структуре такой многофункциональной формации головного мозга, как гиппокамп, участвующего в формировании и регуляции множества функций мозга и окончательно созревающего у человека и млекопитающих животных после рождения.

Полученные в настоящей работе данные дополняют результаты работ других исследователей, свидетельствующие о том, что гипоксия новорожденных приводит к изменению числа клеток [4, 6] и нарушению аксональной архитектуры в гиппокампе [9]. Биохимически показано уменьшение концентрации некоторых протеиновых комплексов, являющихся необходимыми компонентами постсинаптического аппарата, а также аспартата, креатина, гамма-аминомасляной кислоты, глутамата, глутамина, глутатиона [2, 7]. Эти изменения в сочетании с уменьшением числа пирамидных нейронов в полях гиппокампа, их отсроченной гибелью, уменьшением размеров нейронов, развитием глиоза, выявленными в настоящем исследовании, несомненно, могут лежать в основе нарушения функций ЦНС, пато-

Площадь сечения тел пирамидных нейронов в разных полях гиппокампа у крыс после действия гипоксии на 2-е сутки после рождения и в контроле ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Возраст крыс, сут	Исследованные параметры	Поля гиппокампа		
		СА1	СА3	СА4
20	Площадь сечения тел нейронов, мкм ² :			
	в контроле	158±8	256±13	198±12
	после гипоксии	129±10*	208±10*	152±10*
30	Площадь сечения тел нейронов, мкм ² :			
	в контроле	162±6	247±16	195±9
	после гипоксии	120±6*	202±10*	155±9*

* Различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,05$.



Гиппокамп крысы на 30-е сутки в контроле (б, г) и после воздействия гипоксии на 2-е сутки (а, в, д) постнатального развития. а — пирамидные нейроны поля СА4 с признаками гиперхроматоза (стрелки); б, в — поле СА3; в — гиперхроматоз пирамидных нейронов (стрелки); г, д — поле СА4; д — увеличение количества активированных астроцитов. а-в — окраска метиленовым синим по Нислю; г, д — иммуноцитохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок, докраска гематоксилином Майера. а, б, в — об. 40, ок. 10; г, д — об. 20, ок. 10.

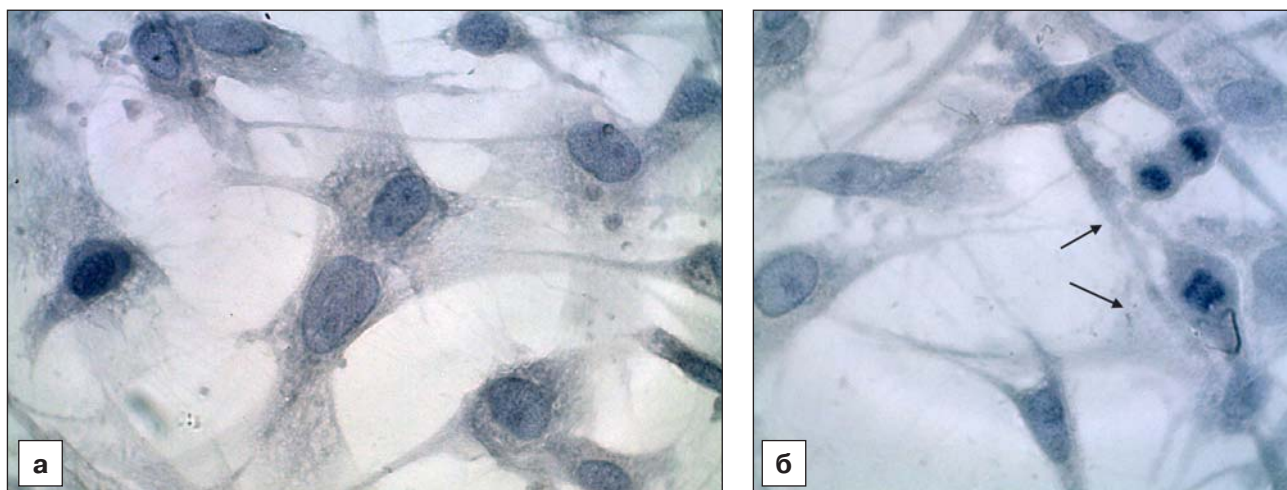


Рис. 1. Фибробласты крысы после длительного культивирования в синтетических средах.

а — зрелые фибробласты; б — делящиеся фибробласты (стрелки). Окраска гематоксилином Майера. Об. 100, ок. 10.

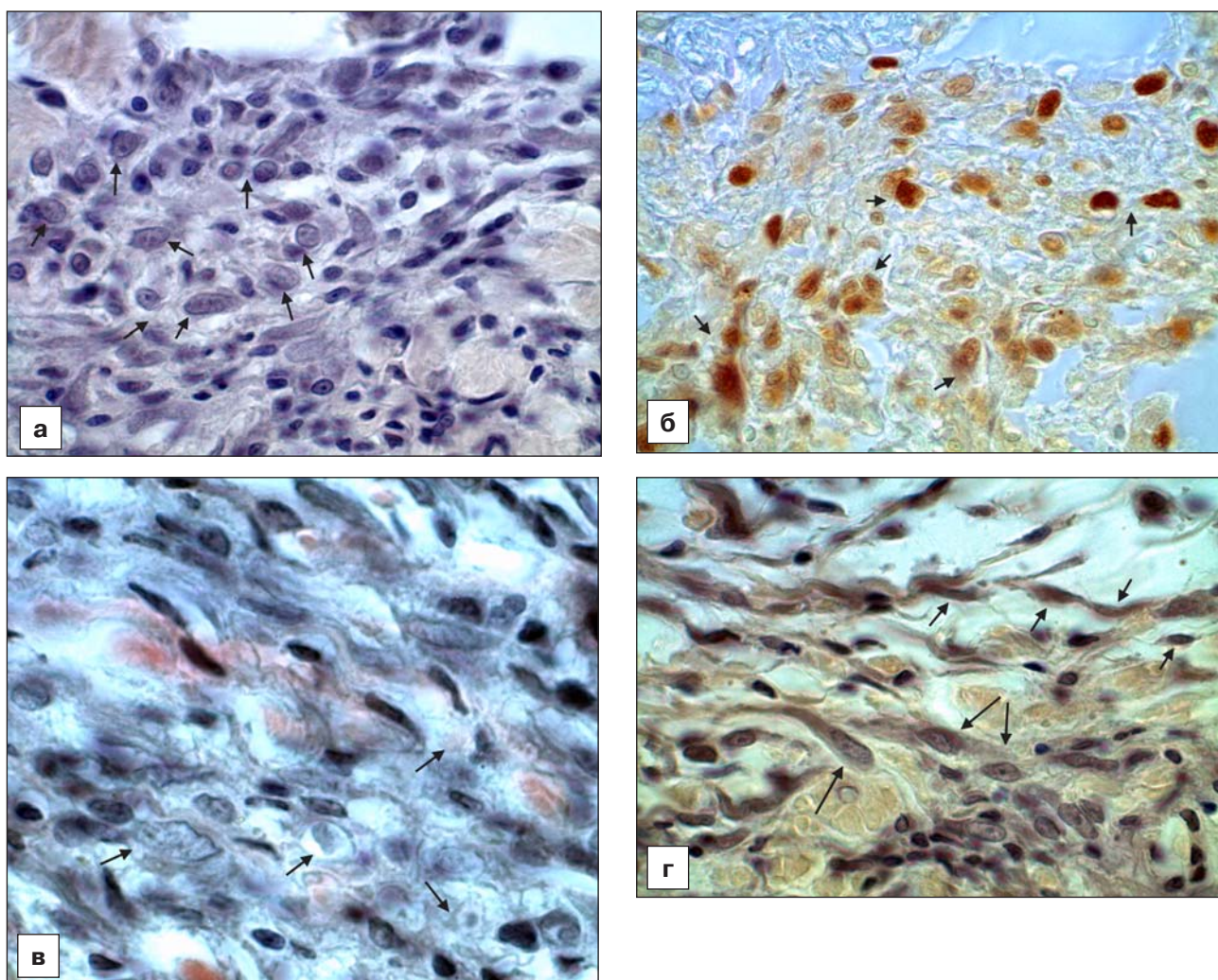


Рис. 2. Фибробласты крысы в трансплантате через 3 сут (а, б) и через 5 сут (в, г) после введения суспензии клеток.

а — фибробласты в трансплантате (стрелки); б — ядра фибробластов (стрелки); в — клетки с признаками хроматолиза (стрелки); г — зрелые фибробласты (длинные стрелки) и дифференцирующиеся фиброциты (короткие стрелки). а, г — окраска гематоксилином Майера; б — иммуноцитохимическая реакция на ядерный антиген пролиферирующих клеток; в — окраска гематоксилином Майера — эозином. Об. 40, ок. 10.

генеза нервно-психических заболеваний и расстройств в постнатальном онтогенезе.

Работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-00700, грантом президиума РАН по программе «Фундаментальные науки — медицине».

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П. и Отеллин В.А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–87.
2. Chen W.F., Chang H., Huang L.T. et al. Alterations in long-term seizure susceptibility and the complex of PSD-95 with NMDA receptor from animals previously exposed to perinatal hypoxia. Epilepsia, 2006, v. 47, № 2, p. 288–296.
3. Chen W.F., Chang H., Wong C.S. et al. Impaired expression of postsynaptic density proteins in the hippocampal CA1 region of rats following perinatal hypoxia. Exp. Neurol., 2007, v. 204, № 1, p. 400–410.
4. Daval J.L., Pourié G., Grojean S. et al. Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus. Pediatr. Res., 2004, v. 55, № 4, p. 561–567.
5. Louzoun-Kaplan V., Zuckerman M., Perez-Polo J.R. and Golan H.M. Prenatal hypoxia down regulates the GABA pathway in newborn mice cerebral cortex; partial protection by MgSO₄. Int. J. Dev. Neurosci., 2008, v. 26, № 1, p. 77–85.
6. Nuñez J.L., Alt J.J. and McCarthy M.M. A novel model for prenatal brain damage. II. Long-term deficits in hippocampal cell number and hippocampal-dependent behavior following neonatal GABA_A receptor activation. Exp. Neurol., 2003, v. 181, № 2, p. 270–280.
7. Raman L., Tkac I., Ennis K. et al. In vivo effect of chronic hypoxia on the neurochemical profile of the developing rat hippocampus. Brain Res., 2005, v. 156, № 2, p. 202–209.
8. Simonová Z., Sterbová K., Brozek G. et al. Postnatal hypobaric hypoxia in rats impairs water maze learning and the morphology of neurones and macroglia in cortex and hippocampus. Behav. Brain Res., 2003, v. 141, № 2, p. 195–205.
9. Sizonenko S.V., Sirimanne E., Mayall Y. et al. Selective cortical alteration after hypoxic-ischemic injury in the very immature rat brain. Pediatr. Res., 2003, v. 54, № 2, p. 263–269.

Поступила в редакцию 30.03.10

DISTURBANCES IN THE DEVELOPMENT OF VARIOUS HIPPOCAMPAL FIELDS IN RATS AS A LONG-TERM EFFECT OF ACUTE PERINATAL HYPOXIA

L.I. Khozhai, V.A. Otellin, T.T. Shishko and V.B. Kostkin

The aim of this study was to determine the long-term effects of acute normobaric hypoxia in the perinatal period on the development of a hippocampal formation in rats. The experiments performed have shown that the exposure to hypoxia on postnatal day 2 resulted in a significant damage to the hippocampal field structure. Differential field sensitivity to the damaging factor was also detected. At postnatal day 20, the cell death was found in all the fields and the thinning of pyramidal neuron layers was observed. The neuronal death was mostly expressed in CA4 and CA3 fields. At postnatal day 30, the neuronal death remained significant in CA4 field, while it was reduced in CA3 field and was not found in CA1 field, however, in fascia dentata the death of neurons of the granular layers was increased. Along with it, the dimensions of the pyramidal neuron cell bodies were reduced in all the hippocampal fields. Also, in all the hippocampal fields, the activation of astrocytic reaction was found, which was more expressed in CA4 field, where gliosis was found to remain until prepuberal age (day 30).

Key words: *hippocampus perinatal hypoxia, cell death, neuronal dimensions, astrocytic reaction*

Laboratory of the Nervous System Ontogenesis, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg