

УДК 616-092.12 : 612.6

# ВЛИЯНИЕ АНТИГЕНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПЛОДА НА НЕЙРОГЕНЕЗ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ ГАНГЛИОЗНОГО СЛОЯ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ У ПОТОМСТВА КРЫС

Р.Е. Лис, к.б.н., О.Н. Шинкевич, Е.А. Поглавская, Л.Е. Виноградова  
УО «Гродненский государственный медицинский университет», ЦНИЛ

*Исследовались возможные нарушения нейрогенеза пирамидных нейронов ганглиозного слоя сенсомоторной коры больших полушарий у крыс при введении в организм самок антигенов головного мозга плода на 15-й день беременности. Выявлено, что введение антигенов головного мозга плода приводит к изменению объёмов ядер нейронов, изменению содержания РНК и активностей СДГ, ЛДГ, НАДН-ДГ и НАДФН-ДГ в цитоплазме нейронов.*

**Ключевые слова:** антигены головного мозга, нейрогенез.

*The possible disorders of pyramidal neuron neurogenesis in rat sensomotor cortical ganglionic layer after fetal cerebral antigen administration to female rats on the 15<sup>th</sup> day of pregnancy were studied. These antigens led to changes in neuron nuclear volumes, RNA content and enzymatic activities (SDH, LDH, NADH-DH and NADPH-DH) in neuron cytoplasm.*

**Key words:** cerebral antigens, neurogenesis.

## Введение

Одной из жизненно важных систем, способствующих выживанию индивидуума в постоянно меняющейся информационной среде, является ЦНС. Нарушения в ней приводят к неадекватной адаптации к изменяющимся условиям существования. В связи с этим исследования, направленные на изучение механизмов нарушения процессов формирования ЦНС, приобретают особую значимость.

Развитие нервной системы представляет собой сложнейшую цепь последовательных взаимосвязанных событий, включающих пролиферацию, миграцию, дифференцировку и гибель клеток, процессы роста нервных отростков, синаптогенез, формирование клеточных агрегатов и стабилизацию нервных связей. В их основе лежит проявление специфического генотипа, выражающегося в смене синтеза определенных пептидов и приводящего к образованию различных типов нервных клеток и к сложнейшим морфогенетическим процессам. Ведущую роль в дифференцировке нервной системы играют различные формы межклеточного взаимодействия – процессы индукции, узнавания и адгезии, которые определяют детерминацию потенциалов нейроэпителиальных клеток, направленный рост аксонов и образование специфических нервных связей [7,10]. Поэтому нарушение какого-либо из звеньев в цепи развития нервной системы может приводить к повреждениям в ЦНС, часто необратимым.

Основываясь на литературных данных последних лет о взаимодействии иммунной и нервной систем [2, 9, 11], можно предположить, что в процессах формирования нервной системы у млекопитающих одна из важнейших ролей принадлежит иммунной системе матери.

Нарушения иммунной системы могут вызываться различными факторами: инфекциями, различными лекарственными препаратами и химическими соединениями, опухолями, ожогами, стрессом, радиацией [3]. При этом вышеперечисленные факторы, воздействуя на иммунную систему, оказывают побочное действие на другие системы организма и развивающийся плод. Для изучения роли иммунной системы матери во время беременности в формировании нервной системы потомства в качестве агента воздействия необходимо выбрать такой, который бы не оказывал существенного действия на другие системы и органы материнского и плодного организмов. Для этих целей наиболее подходящим, на наш взгляд, будет использование антигенов головного мозга плодов и антител к ним, введенных в организм самки в различные сроки беременности.

Исходя из вышесказанного, нами была поставлена цель исследования – изучить возможные нарушения нейрогенеза пирамидных нейронов ганглиозного слоя сенсомоторной коры больших полушарий у крыс при введении в организм самок антигенов головного мозга плода на 15-й день беременности.

## Материалы и методы исследования

В эксперименте было использовано 18 беременных самок крыс на 20-й день беременности (ДБ), 172 плода на 20-й ДБ и 51 крысенок на 5-й, 15-й и 30-й день постнатального развития (ДПР). Масса самок составляла 200 - 250 граммов. Животные подопытных, контрольных и интактных групп содержались в стандартных условиях вивария.

Антигены головного мозга плодов были получены путем гомогенизации и суспендирования головного мозга плодов на 20-й ДБ.

Нативные антигены головного мозга плода вводились однократно, внутривенно самкам крыс на 15-й ДБ в дозе 3 мг/кг в объеме 0,5 мл физиологического раствора [1]. Животным контрольной группы вводился гомогенат печени интактных животных в тех же количествах и в те же сроки, что и подопытным. Животные интактных групп никаким воздействиям не подвергались.

Для определения возможных нарушений нейрогенеза в антенатальный период развития беременных самок декапитировали на 20-й ДБ под эфирным наркозом. У каждой самки брались по два плода, у одного из которых мозг фиксировали в смеси Карнуа, а у второго – замораживали в жидком азоте.

Для определения нарушений в постнатальный период развития исследовали крысят. Крысята рождались естественным путем. На 5-й, 15-й и 30-й ДПР крысят декапитировали под эфирным наркозом. У крысят выделяли головной мозг, из которого в области зрительного перекреста вырезался фронтальный слой толщиной 3-4 мм. Этот кусочек делился сагитально на две равные части, одну из которых фиксировали в смеси Карнуа, а вторую замораживали в жидком азоте.

Из фиксированного в смеси Карнуа головного мозга плодов и крысят готовили гистологические препараты, окрашенные по Нисслю толуидиновым синим, и гистохимические препараты, окрашенные галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для выявления нуклеиновых кислот [5, 8].

На гистологических препаратах головного мозга, окрашенных по Нисслю, производили морфометрические исследования с помощью компьютерного анализатора изображений BIOSCAN-NT. У плодов производили измерение диаметров ядер клеток кортикальной пластинки с последующим вычислением объемов ядер и измерение толщины кортикальной пластинки. У крысят на 5-й, 15-й и 30-й ДПР также производили измерение диаметров ядер пирамидальных клеток ганглиозного слоя сенсомоторной коры больших полушарий с последующим вычислением объемов ядер (теменная кора).

На гистохимических препаратах, окрашенных галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону, у крысят производили количественный учет относительного содержания РНК в цитоплазме нервных клеток с помощью компьютерной системы анализа изображений BIOSCAN-NT по коэффициенту пропускания окрашенного среза в единицах оптической плотности.

Из замороженного в жидком азоте головного мозга плодов и крысят готовили криостатные поперечные фронтальные срезы мозга на микрометре-криостате. На криостатных срезах проводили

гистохимические реакции по выявлению активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – маркера ЦТК [4, 6], активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – маркера анаэробного гликолиза [4, 6], NADH-дегидрогеназы (НАДН-ДГ) – показателя активности митохондриальных процессов [4, 6], NADPH-дегидрогеназы (НАДФН-ДГ) – показателя обеспеченности синтетических процессов [4, 6] в цитоплазме нейроцитов. Уровень активности ферментов учитывался с помощью микроабсорбиметра-флюориметра в комплекте со сканирующим микроскопом МФТХ-2М (ЛОМО) по коэффициенту пропускания окрашенного среза в единицах оптической плотности. Фотометрирование уровня активности дегидрогеназ производилось при длине волны 580 нм.

Для всех количественных характеристик определяли среднее значение по группе (М) и ошибку среднего значения (m). Достоверность различий определяли, используя критерий Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Морфологическая картина нейроцитов кортикальной пластинки в основном практически одинакова у плодов как подопытной, контрольной, так и интактной групп: имеется апикальный отросток; ядро, ядрышко и цитоплазма ясно отграничены; межклеточное пространство хорошо выражено.

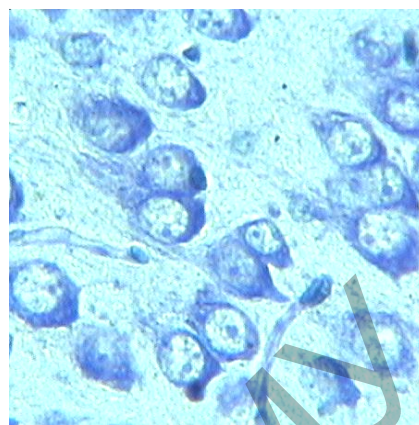
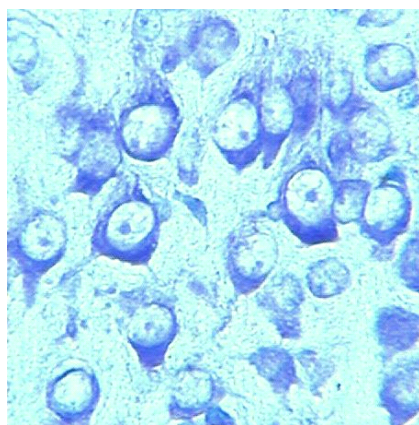
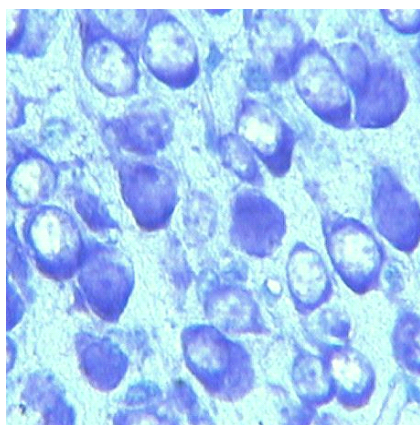
У подопытных и контрольных животных на 5-й ДПР также не наблюдается существенных различий с интактными в морфологии нейронов. Нейроны имеют округлое ядро, центрально расположенное ядрышко, выраженный апикальный отросток, достаточно широкий базальный слой цитоплазмы.

На 15-й ДПР у контрольных животных отличий в морфологии нейронов с интактными нет. Однако у подопытных животных наряду с нормальной картиной, в 50% случаев наблюдаются в большом количестве гиперхромные нейроны пятого слоя (рис 1).

На 30-й ДПР морфология пирамидных нейронов пятого слоя у подопытных, контрольных и интактных животных также не отличается друг от друга.

Морфометрические показатели подопытных животных отличны от таковых у контрольных и интактных.

В антенатальный период развития у плодов на 20-й ДБ наблюдается превышение объема ядер нейроцитов кортикальной пластинки над интактными показателями, как у подопытных плодов, так и у контрольных – на 14 и 11 % соответственно, однако различия статистически недостоверны. Толщина кортикальной пластинки у плодов подопытной и контрольной групп практически от интактных показателей не отличается (табл. 1).



Подопытные

Контрольные

Интakтные

Рис. 1. 15-й день постнатального развития. Гиперхроматоз нейронов пятого слоя коры головного мозга у подопытных животных. Окраска по Нислю. Ок.10х, об. 40х.

Таблица 1. Объем ядер ( $\text{мкм}^3$ ) нейроцитов кортикальной пластинки и толщины кортикальной пластинки ( $\text{мкм}$ ) у плодов на 20-й ДБ при введении АГ головного мозга в опытной, контрольной и интактной группах

| Вид воздействия | Объем ядра, $\text{мкм}^3$ | % к интактным | Толщина кортикальной пластинки, $\text{мкм}$ | % к интактным |
|-----------------|----------------------------|---------------|----------------------------------------------|---------------|
| АГ гол. мозга   | $74,57 \pm 3,16$           | 114           | $130,42 \pm 2,91$                            | 100           |
| Контрольная     | $72,38 \pm 5,18$           | 111           | $128,16 \pm 4,32$                            | 99            |
| Интakтная       | $65,15 \pm 2,47$           |               | $129,96 \pm 5,86$                            |               |

\*- статистически достоверные различия с контрольными показателями.

В постнатальный период развития у крысят наблюдаются достоверные отличия в объемах ядер нейронов ганглиозного слоя коры больших полушарий. Это касается двух сроков – 5-й ДПР и 15-й ДПР. На 5-й ДПР объемы ядер у подопытных и контрольных животных выше, чем у интактных, на 18 и 41% соответственно, а на 15-й ДПР – ниже на 31 и 15% соответственно. К 30-му ДПР различия в объемах ядер между подопытными, контрольными и интактными животными практически исчезают (табл.2).

В постнатальный период развития содержания РНК в цитоплазме нейронов ганглиозного слоя коры у подопытных животных выше, чем у интактных. Это касается всех сроков исследования: на 5-й ДПР на 14 %; на 15-й ДПР на 19%; на 30-й ДПР – 17 %. В контрольной группе наблюдается увеличение содержания РНК только на 30-й ДПР – на 22 % (табл. 2.).

У подопытных плодов наблюдается снижение уровня активности всех исследуемых ферментов в цитоплазме биполярных клеток кортикальной пластинки. При этом уровни активности НАДН-ДГ и НАДФН-ДГ ниже-

Таблица 2. Объем ядер ( $\text{мкм}^3$ ) и Относительное количество РНК (в единицах оптической плотности X 1000) в цитоплазме нейронов ганглиозного слоя коры больших полушарий потомства крыс при введении АГ головного мозга в опытной, контрольной и интактной группах на различные сроки постнатального развития

| Вид воздействия | Объем ядра, $\text{мкм}^3$ | % к интактным | Содержание РНК в цитоплазме | % к интактным |
|-----------------|----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| 5-й ДПР         |                            |               |                             |               |
| АГ гол. мозга   | $293,10 \pm 21,88$         | 118           | $90,00 \pm 8,00$            | 114           |
| Контрольная     | $348,78 \pm 36,00$         | 141           | $85,00 \pm 6,00$            | 103           |
| Интakтная       | $247,70 \pm 40,79$         |               | $80,00 \pm 13,00$           |               |
| 15-й ДПР        |                            |               |                             |               |
| АГ гол. мозга   | $266,31 \pm 28,24$         | 69            | $106,00 \pm 14,00$          | 119           |
| Контрольная     | $326,32 \pm 31,28$         | 85            | $83,00 \pm 19,00$           | 93            |
| Интakтная       | $383,43 \pm 41,90$         |               | $89,00 \pm 7,00$            |               |
| 30-й ДПР        |                            |               |                             |               |
| АГ гол. мозга   | $446,91 \pm 48,49$         | 92            | $69,00 \pm 6,00$            | 117           |
| Контрольная     | $436,42 \pm 10,67$         | 90            | $75,00 \pm 17,00$           | 122           |
| Интakтная       | $484,51 \pm 37,38$         |               | $59,00 \pm 4,00$            |               |

\*- статистически достоверные различия с контрольными показателями

ны достоверно, соответственно на 14 и 49 %, по сравнению с интактными показателями (Табл. 3). В контрольной группе, наоборот, наблюдается повышение уровня активности почти всех исследуемых ферментов, за исключением НАДФН-ДГ, который достоверно снижен на 38 % (табл. 3).

Таблица 3. Уровень активности (в единицах оптической плотности X 1000) СДГ, ЛДГ, НАДН – ДГ, НАДФН – ДГ в цитоплазме биполярных клеток кортикальной пластинки коры головного мозга плодов крыс на 20-й день беременности, в цитоплазме нейронов ганглиозного слоя коры больших полушарий потомства крыс при ведении АГ головного мозга крыс в опытной, контрольной и интактной группах

| Вид воздействия                             | Уровень активности СДГ | % к интактным | Уровень активности ЛДГ | % к интактным | Уровень активности НАДН-ДГ | % к интактным | Уровень активности НАДФН-ДГ | % к интактным |
|---------------------------------------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| Плоды, 20-й день беременности               |                        |               |                        |               |                            |               |                             |               |
| АГ гол. мозга                               | $126,67 \pm 8,82$      | 87            | $403,33 \pm 21,86$     | 96            | $266,67 \pm 8,82^*$        | 86            | $130,00 \pm 5,77^*$         | 51            |
| Контрольные                                 | $156,67 \pm 14,53$     | 108           | $476,67 \pm 56,96$     | 114           | $373,33 \pm 24,04$         | 120           | $156,67 \pm 12,02^*$        | 62            |
| Интakтные                                   | $145,71 \pm 14,78$     |               | $418,57 \pm 21,76$     |               | $311,43 \pm 15,03$         |               | $252,86 \pm 8,37$           |               |
| Крысята, 5-е сутки постнатального развития  |                        |               |                        |               |                            |               |                             |               |
| АГ гол. мозга                               | $187,14 \pm 6,06^*$    | 125           | $440,00 \pm 20,59$     | 109           | $374,29 \pm 14,46$         | 103           | $135,00 \pm 29,60$          | 102           |
| Контрольные                                 | $146,67 \pm 3,33$      | 98            | $420,00 \pm 34,64$     | 104           | $316,67 \pm 14,53^*$       | 87            | $145,00 \pm 5,00$           | 109           |
| Интakтные                                   | $150,00 \pm 8,16$      |               | $405,00 \pm 11,90$     |               | $362,50 \pm 6,29$          |               | $132,50 \pm 13,80$          |               |
| Крысята, 15-е сутки постнатального развития |                        |               |                        |               |                            |               |                             |               |
| АГ гол. мозга                               | $204,29 \pm 14,29$     | 93            | $566,67 \pm 26,54$     | 101           | $471,43 \pm 19,20$         | 103           | $192,86 \pm 11,07^*$        | 81            |
| Контрольные                                 | $197,50 \pm 10,31$     | 90            | $535,00 \pm 27,23$     | 96            | $410,00 \pm 17,80^*$       | 90            | $195,00 \pm 11,90^*$        | 82            |
| Интakтные                                   | $220,00 \pm 12,91$     |               | $560,00 \pm 26,77$     |               | $457,50 \pm 4,79$          |               | $237,50 \pm 8,54$           |               |
| Крысята, 30-е сутки постнатального развития |                        |               |                        |               |                            |               |                             |               |
| АГ гол. мозга                               | $334,29 \pm 21,48$     | 101           | $550,00 \pm 20,70^*$   | 82            | $415,71 \pm 13,95$         | 97            | $148,57 \pm 13,70$          | 85            |
| Контрольные                                 | $260,00 \pm 4,08$      | 79            | $565,50 \pm 25,00^*$   | 84            | $505,00 \pm 52,04$         | 118           | $180,00 \pm 17,80$          | 103           |
| Интakтные                                   | $330,00 \pm 47,64$     |               | $670,00 \pm 25,69$     |               | $428,00 \pm 13,93$         |               | $175,00 \pm 6,50$           |               |

\*-статистически достоверные различия с интактными показателями.

У крысят также наблюдаются достоверные изменения уровня активности исследуемых ферментов в цитоплазме нейронов ганглиозного слоя коры больших полушарий. При этом изменения в активности исследуемых ферментов регистрируются во все сроки исследования, но не для всех ферментов: на 5-й ДПР происходит достоверное увеличение уровня активности СДГ по сравнению с интактными показателями – на 25 % (Табл. 3), на 15-й ДПР происходит достоверное уменьшение на 19 % уровня активности НАДФ-ДГ (Табл. 3); на 30-й ДПР происходит достоверное уменьшение активности ЛДГ на 18 % (Табл. 3). В контрольной группе регистрируется достоверное уменьшение активности НАДН-ДГ на 5-й ДПР; уменьшение активности НАДН-ДГ и НАДФН – ДГ на 10 и 18 % соответственно на 15-й ДПР и уменьшение активности СДГ и ЛДГ на 21 и 16 % соответственно на 30-й ДПР (Табл. 3).

Таким образом, модификация иммунной системы матери во время беременности с помощью антигенов головного мозга плода и аллоантигенов печени интактных животных оказывает влияние на процессы нейрогенеза пирамидных нейронов ганглиозного слоя сенсомоторной коры больших полушарий потомства. В основном это отражается в изменении функциональных параметров: объема ядра, содержания РНК и активностей СДГ, ЛДГ, НАДН-ДГ и НАДФН-ДГ в цитоплазме нейронов. При этом выраженность изменений выше при введении антигенов головного мозга плода.

**Работа была выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Договор № Б01-333)**

#### Литература

1. Амброзиус Х. Получение сывороток от различных животных / Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. - М.: Медицина. - 1987. - С. 13 -14.

2. Абрамов В.В. Интеграция иммунной и нервной систем. Новосибирск: Наука, 1991. - 168 с.
3. Йегер Л. Клиническая иммунология и аллергология. - М.: Медицина, 1990. - Т. 3. - 586 с.
4. Ковальский Г.Б. Количественная гистохимия дегидрогеназ // Введение в количественную гистохимию ферментов / Под ред. Т. В. Журавлевой и Р.А. Прочуханова. - М.: Медицина, 1978. - С.58 - 114.
5. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. - М.: Мир, 1969.
6. Лойда З., Госсрай Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. - М.: Мир, 1982. - 272 с.
7. Максимова Е.В. Основные этапы дифференцировки нервных клеток // Нейроонтогенез / Под ред. д.б.н. К.В. Шулейкина. - Москва: Наука, 1985. - С. 6 - 76.
8. Ташкэ К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. - Изд-во Академии CPP. - 1980. - 191 с.
9. Adinolfi M. The maternal-fetal interaction: controversies and solutions // Exp. Clin. Immunogenet. - 1993. - 10. - №. 2. - P. 103 -117.
10. Berry M. Development of the cerebral neocortex of the rat // Studies on the development of the behavior and the nervous system: Aspects of neurogenesis. - N - Y. Acad. Press, 1974. - P. 8 -68.
11. Potapova A. A., Maliukova I.V., Proshliakova E.V., Zakharova L.A Hypothalamo-pituitary system controls the development of humoral immune response during prenatal ontogenesis in rats / Ontogenez. - 2000. - Vol. 33. - № 2. - P. 124 -129.

#### Resume

#### THE INFLUENCE OF FETAL CEREBRAL ANTIGENS ON THE NEUROGENESIS OF PYRAMIDAL NEURONS IN GANGLIOS LAYER OF SENSOMOTOR BRAIN CORTEX IN RATS OF THE 1<sup>ST</sup> GENERATION

R.E. Lis, O.N. Shinkevich, E.A. Poplowskaya,  
L.E. Vinogradova

Grodno State Medical University

The possible disorders of pyramidal neuron neurogenesis in rat sensomotor cortical ganglionic layer after fetal cerebral antigen administration to female rats on the 15<sup>th</sup> day of pregnancy were studied. These antigens led to changes in neuron nuclear volumes, RNA content and enzymatic activities in neuron cytoplasm.

Поступила 31.01.07