

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ (03.03.04)

УДК 577.2(045)

DOI 10.17816/2075-2354.2018.18.6-11

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КОРЫ МОЗЖЕЧКА БЕЛЫХ КРЫС И ИХ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ¹

Шубина О.С., Егорова М.В.

ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический институт имени М.Е. Евсевьева», кафедра биологии, географии и методик обучения, Саранск

Для цитирования: Шубина О.С., Егорова М.В. Исследование морфологического состояния коры мозжечка белых крыс и их поведенческих реакций под влиянием черепно-мозговой травмы // Аспирантский вестник Поволжья. – 2018. – № 1–2. – С. 6–11. doi: 10.17816/2075-2354.2018.18.6-11

Поступила в редакцию: 17.01.2018

Принята к печати: 22.02.2018

▪ В статье представлены результаты морфологического исследования нейронов коры мозжечка и поведения половозрелых белых крыс-самцов при нанесении черепно-мозговой травмы. Показано, что экспериментальное нанесение черепно-мозговой травмы вызывало в посттравматический период у животных стойкие изменения в нейронах коры мозжечка, приводящие к отклонению поведения.

▪ **Ключевые слова:** поведение, черепно-мозговая травма, тест «Открытое поле».

INVESTIGATION OF THE MORPHOLOGICAL STATE OF THE CEREBELLAR CORTEX IN WHITE RATS AND THEIR BEHAVIORAL REACTIONS AFTER CRANIOCEREBRAL INJURY

Shubina O.S., Egorova M.V.

Mordovian State Pedagogical Institute n.a. M.E. Evsevev, Department of Biology, Geography and Teaching methods, Saransk

For citation: Shubina O.S., Egorova M.V. Investigation of the morphological state of the cerebellar cortex in white rats and their behavioral reactions after craniocerebral injury. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhiya*. 2018;(1-2):6-11. doi: 10.17816/2075-2354.2018.18.6-11

Received: 17.01.2018

Accepted: 22.02.2018

▪ The article presents the results of a morphological study of the neurons of the cerebellar cortex and the behavior of sexually mature white male rats in case of craniocerebral injuries. It is shown that the experimental traumatizing caused persistent changes in the neurons of the cerebellar cortex in animal and led to deviation in animal behavior.

▪ **Keywords:** behavior, craniocerebral trauma, “Open field” test.

Введение

Известно, что при черепно-мозговой травме (ЧМТ) в результате повреждения мозга в его паренхиме запускаются необратимые морфо-

функциональные дистрофические и некротические процессы, которые затем и определяют выраженность моторных и когнитивных нарушений в посттравматическом периоде [1–4,

¹ Работа выполнена в рамках гранта на проведение научно-исследовательских работ по приоритетным направлениям научной деятельности вузов — партнеров по сетевому взаимодействию (ФГБОУ ВО «ЧГУ им. И.Я. Яковлева» и ФГБОУ ВО «МГПИ») по теме «Морфофункциональные последствия постнатального воздействия черепно-мозговой травмы на головной мозг белых крыс».

6, 11]. Несмотря на работы многих исследователей в этой области, актуальность данной проблемы не снижается, поскольку нейродестабилизирующие патологии центральной нервной системы занимают одно из ведущих мест в структуре инвалидизации и смертности населения.

Цель исследования — изучение состояния нервных клеток коры мозжечка головного мозга у половозрелых белых крыс-самцов после нанесения черепно-мозговой травмы, а также особенностей поведения крыс в тесте «Открытое поле».

Материал и методы исследования

В качестве биологического объекта использовали половозрелых белых беспородных крыс-самцов массой 200–250 г. Выбор белых крыс для проведения исследования объясняется тем, что они обладают сходным с человеком строением отделов и коры головного мозга. В эксперимент были включены 20 животных, содержащихся на общем режиме вивария. Контрольную группу составили 10 интактных животных. Опытную группу — 10 животных, которым наносилась черепно-мозговая травма легкой степени. Черепно-мозговую травму наносили путем свободного падения груза на голову (модель падающего груза). Травму наносили под общей анестезией. Масса груза составляла 50 г, высота падения — 100 см.

До начала эксперимента животные содержались в пластиковых клетках размером 490 × 370 × 215 мм в стандартных условиях вивария. Двигательную активность и психоэмоциональное состояние животных оценивали по результатам изучения их поведения в тесте «Открытое поле». В «Открытом поле» крысы обследовались дважды, в течение 5 минут. «Открытое поле» представляло собой камеру 1 м в длину и 1 м в ширину, с высотой стенок 0,5 м, из белого пластика, дно которой было расчерчено на 25 равных квадратов. Освещение производилось лампой мощностью 100 Вт, подвешенной на высоте 1,5 м от дна камеры. Все процедуры, связанные с тестированием в «Открытом поле», проводились с 16.00 до 19.30. Крыс помещали в центр «Открытого поля» и засекали время выхода из центрального квадрата. Регистрировали следующие параметры: 1) горизонтальная двигательная активность (шт.) — количество пересеченных квадратов; 2) ориентировочная реакция (шт.) — количество вертикальных стоек; 3) исследовательская активность (шт.) — количество заглядываний внутрь отверстий «по глаза»; 4) фризинг — время

неподвижности (сек.), рассматривается как симптом страха; 5) дефекация (шт.) — число болюсов помета и актов уринации во время тестирования, количество которых расценивается как показатель эмоциональной тревожности; 6) груминг (шт.) и его длительность (сек.) [5, 6].

Убой контрольных и опытных групп животных производили при помощи декапитации, в утренние часы, под наркозом смеси эфира с хлороформом (1 : 1). Опыты проводили в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.77 и № 701 от 27.07.78, которые регламентируют обеспечение принципов гуманного обращения с животными.

Для получения материала головного мозга с полости черепа ножницами срезали кожно-мышечные покровы, полностью обнажая костную ткань, затем щипцами откусывали шейные позвонки и затылочную кость, срезали ее. Подводя браншу кусачек (щипцов) под крышу черепа сбоку, откусывали теменно-височные кости с обеих сторон и снимали их. Открытый головной мозг приподнимали со стороны лобных долей кверху, перерезали зрительный тракт, поднимали мозг еще выше, подрезали с обеих сторон твердую мозговую оболочку, покрывающую мозжечок, нервы, и вынимали головной мозг, перерезая спинной мозг в шейном отделе. Разрезая оболочку, освобождали из ложа орган [7].

Для гистологического исследования мозжечок животных фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина на фосфатном буфере (фирма «Биовитрум», Санкт-Петербург), затем его подвергали промывке в проточной воде, обезвоживанию путем помещения исследуемого материала в спирты возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Изготавливали фронтальные срезы толщиной 5–7 мкм. Срезы помещали на предметные стекла и окрашивали крезильовым фиолетовым по методу Ниссля. Морфометрическое исследование проводилось на сериях срезов гистологических препаратов коры полушарий мозжечка в соответствии с его характеристикой. С помощью цифрового микроскопа Axio Imager M2 с программным обеспечением для анализа изображений Axio Vision SE64 Rel. 4.8.3 и ZEN 2011 проводилось измерение толщины слоев полушарий коры мозжечка ($n = 100$, об. 40; ок. 10). В этих же слоях, в четырех полях зрения, измерялись морфометрические параметры нейронов: площадь клетки, диаметры клетки, площадь ядра, диаметры ядра, с видимым ядрышком ($n = 240$, об. 100; ок. 10). Индекс удлиненности ядер клеток (E) — частное от

деления максимального диаметра ядра на минимальный диаметр ядра. Объемы тел нейронов и их ядер вычислялись по формуле объема эллипсоида вращения [8]. Концентрация нейронов вычислялась по формуле:

$$K = x \times 10^6 / 41\,500 \times n,$$

где x — количество клеток (не менее 100), n — количество полей зрения (не менее 4), 41 500 — площадь каждого поля зрения, мкм^2 . Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ЯЦО} = V \text{ ядра} / V \text{ перикариона} - V \text{ ядра},$$

где V ядра — объем ядра, V перикариона — объем перикариона [9].

Полученные количественные данные обработаны с помощью общепринятых в медико-биологических исследованиях методов системного анализа, согласно современным требованиям к проведению анализа медицинских данных. Для статистической обработки полученных результатов применялся параметрический критерий t -Стьюдента. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение (s). Критический уровень значимости $p \leq 0,05$ [10].

Результаты и обсуждение

Морфологическое исследование показало, что у крыс, перенесших черепно-мозговую травму, отмечено отслоение мягких мозговых оболочек с признаками набухания за счет скопления массы эритроцитов. В перикарионах коры мозжечка животных преобладали гидропические изменения. В осветленной нейроплазме таких нейронов обнаруживались губчатая пеннистость и отдельные вакуоли, ядра обычно были измененной формы, осветленные. Также встречались гиперхромные нейроны с признаками пикноморфного набухания, либо сморщивающиеся, с плохо различимыми ядром и ядрышком. Обнаруживались нейроны с практически утраченным ядром, «клетки-тени». Признаки гидропического набухания выявляли также в цитоплазме астроцитов и олигодендроцитов. Увеличилось число нейронов с сателлитной глией.

В результате черепно-мозговой травмы происходило уменьшение концентрации нейронов во всех слоях коры мозжечка, а именно: в молекулярном слое корзинчатых нейронов — на 42 %, звездчатых — на 26 %, клеток Пуркинью в слое клеток грушевидных — на 15 %, клеток зернистого слоя — на 23 % меньше по сравнению с контролем. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) корзинчатых нейронов

уменьшилось на 26 %, звездчатых увеличилось на 200 %, клеток Пуркинью уменьшилось на 25 %, нейронов зернистого слоя также уменьшилось на 16 %. Толщина слоя коры мозжечка у опытных групп животных претерпевает следующие изменения: в молекулярном слое уменьшилась на 21 %, в слое клеток грушевидных нейроцитов увеличилась на 15 %, зернистого слоя уменьшилась на 62 % по сравнению с контролем (таблица 1). Коэффициент удлинённости ядра у корзинчатых нейронов составил 1,31, у звездчатых нейронов — 1,21, у клеток Пуркинью — 1,76, а у клеток-зерен составил 1,22.

Морфофункциональные изменения у звездчатых нейронов претерпевал минимальный диаметр ядра, он увеличился на 23 %, средняя площадь ядра уменьшилась на 16 %, средний объем ядра увеличился в два раза. У корзинчатых нейронов минимальный диаметр уменьшился на 20,3 %. Средняя площадь клеток уменьшилась на 43 %, в 1,5 раза уменьшился средний объем клеток. Максимальный и минимальный диаметры ядра уменьшились соответственно на 22 и 21 %. Площадь ядра увеличилась на 21 %, объем ядра уменьшился почти в два раза (таблица 2).

В слое клеток грушевидных нейроцитов минимальный диаметр нейрона и ядра уменьшились на 15 %, площадь нейрона уменьшилась на 44,2 %, объем уменьшился в два раза. Площадь и объем ядра уменьшились на 25 и 19 % соответственно. Плотность клеток Пуркинью уменьшилась на 15 % и составила $145,93 \pm 7,29 \text{ мкм}^2$. Число нейронов с сателлитной глией увеличилось по сравнению с контролем на 16 %. В основном нейрон контактировал с одним глиоцитом, реже — с двумя-тремя. Общее количество глиальных клеток после черепно-мозговой травмы превышало контроль в 0,5 раза. Нейроглиальный индекс равен $3,08 \pm 0,15$.

При исследовании зернистого слоя в опытной группе животных отмечено перемещение клеток-зерен в молекулярный слой. В нейронах преобладали гидропические изменения (таблица 3).

Изучение поведения животных при нанесении черепно-мозговой травмы показало, что в посттравматический период они впадали в легкое бессознательное состояние. В течение нескольких минут животные оставались заторможенными, дезориентированными, вялыми. Затем в течение первого часа их состояние улучшалось.

После посттравматического стресса горизонтальная двигательная активность экспериментальных животных по сравнению

Таблица 1 / Table 1

Количественные показатели молекулярного слоя коры полушарий мозжечка в норме и при черепно-мозговой травме ($x \pm s_x$)

Quantitative indices of the molecular layer of the cortex of the cerebellar hemispheres in the norm and in craniocerebral trauma ($x \pm s_x$)

Показатель, усл. ед.	Корзинчатые нейроны молекулярного слоя		Звездчатые нейроны молекулярного слоя	
	К	О	К	О
Минимальный диаметр ядра, мкм	9,1 ± 0,04	7,2 ± 0,10*	5,9 ± 0,07	7,3 ± 0,11*
Максимальный диаметр ядра, мкм	10,8 ± 0,09	8,4 ± 0,14*	8,3 ± 0,08	8,9 ± 0,14
Площадь ядра, мкм ²	64,3 ± 3,21	78,0 ± 1,73*	50,6 ± 2,53	42,7 ± 0,55*
Объем ядра, мкм ³	469,3 ± 23,15	255,0 ± 12,8*	152,3 ± 7,64	248,2 ± 12,41*
Минимальный диаметр клетки, мкм	12,1 ± 0,1	9,5 ± 0,16*	8,5 ± 0,08	8,3 ± 0,12
Максимальный диаметр клетки, мкм	14,5 ± 0,10	15,4 ± 0,16	10,8 ± 0,11	10,1 ± 0,11
Площадь клетки, мкм ²	199,9 ± 9,95	114,83 ± 1,84*	69,9 ± 3,49	52,9 ± 1,00*
Объем клетки, мкм ³	1115,2 ± 55,75	727,4 ± 36,36*	408,9 ± 20,41	324,1 ± 18,21*
Толщина слоя, мкм	320,3 ± 7,17		251,5 ± 5,97*	

Примечание: * различия в сравнении с контролем статистически значимы при $p < 0,05$.

Таблица 2 / Table 2

Количественные показатели слоя клеток грушевидных нейроцитов коры полушарий мозжечка в норме и при черепно-мозговой травме ($x \pm s_x$)

Quantitative indices of a layer of cells of pear-shaped neurocytes of the cortex of the cerebellar hemispheres in the norm and in craniocerebral trauma ($x \pm s_x$)

Показатель, усл. ед.	Клетки Пуркинье слоя клеток грушевидных нейроцитов	
	Контроль	Опыт
Минимальный диаметр ядра, мкм	14,6 ± 0,43	12,3 ± 3,18*
Максимальный диаметр ядра, мкм	22,4 ± 0,35	21,6 ± 4,37
Площадь ядра, мкм ²	337,9 ± 7,63	188,5 ± 6,39*
Объем ядра, мкм ³	2493,3 ± 23,89	1710,2 ± 85,51*
Минимальный диаметр клетки, мкм	21,9 ± 0,39	18,5 ± 5,99*
Максимальный диаметр клетки, мкм	32,7 ± 0,32	36,8 ± 6,12
Площадь клетки, мкм ²	732,9 ± 12,95	547,4 ± 16,85*
Объем клетки, мкм ³	8190,1 ± 81,89	6591,3 ± 65,91*
Толщина слоя, мкм	40,1 ± 0,60	46,9 ± 0,59*

Примечание: * различия в сравнении с контролем статистически значимы при $p < 0,05$.

с контрольными снизилась на 33 % ($p < 0,05$). О снижении исследовательского компонента поведенческой активности свидетельствует уменьшение по сравнению с контролем исследований «норок», меньшее количество заходов в центральную зону теста соответ-

ственно на 17 % ($p < 0,05$) и 18 % ($p < 0,05$). Изменение эмоциогенного напряжения в ходе эксперимента нашло отражение в изменении количества стоек, продолжительности и частоты груминга, числа фекальных болюсов. Так, интенсивность кратковременного гру-

Таблица 3 / Table 3

Количественные показатели зернистого слоя коры полушарий мозжечка в норме и при черепно-мозговой травме ($x \pm s_x$)

Quantitative indices of the granular layer of the cortex of the cerebellar hemispheres in the norm and in craniocerebral trauma ($x \pm s_x$)

Показатель, усл. ед.	Клетки-зерна зернистого слоя	
	Контроль	Опыт
Минимальный диаметр ядра, мкм	7,6 ± 0,08	7,2 ± 0,08
Максимальный диаметр ядра, мкм	8,2 ± 0,08	8,8 ± 0,05
Площадь ядра, мкм ²	43,9 ± 0,60	42,5 ± 0,98
Объем ядра, мкм ³	247,4 ± 12,37	237,8 ± 11,93
Минимальный диаметр клетки, мкм	9,2 ± 0,07	9,3 ± 0,07
Максимальный диаметр клетки, мкм	10,9 ± 0,05	10,9 ± 0,07
Площадь клетки, мкм ²	73,7 ± 0,71	73,4 ± 1,02
Объем клетки, мкм ³	483,7 ± 24,19	493,4 ± 24,67
Толщина слоя, мкм	620,2 ± 29,66	236,4 ± 8,68*

Примечание: *различия в сравнении с контролем статистически значимы при $p < 0,05$.

Таблица 4 / Table 4

Влияние черепно-мозговой травмы на поведение крыс-самцов в тесте «Открытое поле»

Influence of craniocerebral trauma on the behavior of male rats in the "Open field" test

Поведенческие показатели, ($M \pm m$)	Экспериментальные группы ($n = 10$)	Контроль	Черепно-мозговая травма
Горизонтальная двигательная активность, шт.		18,0 ± 1,2	12,6 ± 0,63*
Вертикальная двигательная активность, шт.		10,7 ± 1,4	7,5 ± 0,4*
Исследование «норок», шт.		4,7 ± 0,7	3,9 ± 0,3*
Кратковременный груминг, шт.		2,4 ± 0,1	3,0 ± 0,15*
Кратковременный груминг, длительность (сек.)		54,63 ± 3,2	72,75 ± 7,82*
Фекальные болюсы, шт.		0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2*
Уринации, шт.		3,48 ± 0,6	3,95 ± 0,6*
Фризинг, сек.		0	33*

Примечание: *различия в сравнении с контролем статистически значимы при $p < 0,05$.

минга возросла на 58 % ($p < 0,05$), количество фекальных болюсов увеличилось в 1,5 раза. Кроме того, были зафиксированы периоды «замирания» (фризинг) (таблица 4).

нейронов коры полушарий мозжечка, что может быть причиной отклонения поведенческих реакций животных.

Конфликт интересов отсутствует.

Заключение

Анализ морфологического состояния нейронов слоев коры полушарий мозжечка головного мозга половозрелых белых крыс свидетельствует о том, что в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы (ЧМТ) в посттравматический период развиваются стойкие морфологические изменения

Список литературы

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Наука, 1992. – С. 250. [Buresh Ya, Bureshova O, Kh'yuston DzhP. Metodiki i osnovnyye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya. Moscow: Nauka; 1992. P. 250. (In Russ.)]

2. Малиновская Н.В. Морфогистохимические характеристики системы «нейрон-глия-капилляр» и липидная перекисидация в базальных ядрах мозга человека при старении: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2003. – 34 с. [Malinovskaya NV. Morfogistokhimicheskie kharakteristiki sistemy "neyrongliya-kapillyar" i lipidnaya peroksidatsiya v bazal'nykh yadrah mozga cheloveka pri starenii. [dissertation] Moscow; 2003. 34 p. (In Russ.)]
3. Мамытова Э.М., Кадыралиев Т.К., Жолдошев Э.К. Черепно-мозговая травма и структурные мишени ее протекции // Вестник Кыргызско-российского славянского университета. – 2014. – Т. 14. – № 4. – С. 124–127. [Mamytova EM, Kadyraliev TK, Zholdoshev EK. Cherepno-mozgovaya travma i strukturnye misheni ee protektsii. *Vestnik Kyrgyzsko-rossiyskogo slavyanskogo universiteta*. 2014;14(4):124-127. (In Russ.)]
4. Судаков С.К., Назарова Г.А., Алексеева Е.В., Башкатова В.Г. Определение уровня тревожности у крыс в тестах «Открытое поле», «Крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте Фогеля // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155. – № 3. – С. 268–270. [Sudakov SK, Nazarova GA, Alekseeva EV, Bashkatova VG. Estimation of the level of anxiety in rats: Differences in results of open-field test, elevated plus-maze test, and Vogel's conflict test. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013;155(3):295-297. (In Russ.)]
5. Углов Б.А., Котельников Г.П., Углова М.В. Статистический анализ и математическое моделирование в медико-биологических исследованиях. – Самара: Самарский Дом печати, 1994. – 68 с. [Uglov BA, Kotel'nikov GP, Uglova MV. Statisticheskiy analiz i matematicheskoe modelirovanie v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh. Samara: Samarskiy Dom pechati; 1994. 68 p. (In Russ.)]
6. Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование. – Самара: Изд-во СамГУ, 1997. – 265 с. [Frolov YuP. Matematicheskie metody v biologii. EVM i programmirovaniye. Samara: Izd-vo SamGU; 1997. 265 p. (In Russ.)]
7. Cassidy JD, Carroll LJ, Peloso PM, et al. Incidence, risk factors and prevention of mild traumatic brain injury: results of the WHO collaborating centre task force on mild traumatic brain injury. *J Rehabil Med*. 2004;(43):28-60.
8. Belanger HG, Curtiss G, Demery JA, et al. Factors moderating neuropsychological outcomes following mild traumatic brain injury: A metaanalysis. *J Int Neuropsychol Soc*. 2005;3(11):215-227. doi: 10.1017/S1355617705050277.
9. Davis GA, Iverson GL, Guskiewicz KM, et al. Contributions of neuroimaging, balance testing, electrophysiology and blood markers to the assessment of sportrelated concussion. *Br J Sports Med*. 2009;(43):36-45. doi: 10.1136/bjism.2009.058123.
10. Lundin A, de Bousard C, Edman G, Borg J. Symptoms and disability until 3 months after mild TBI. *Brain Inj*. 2006;20(8):799-806. doi: 10.1080/02699050600744327.
11. Schneiderman AI, Braver ER, Kang HK. Understanding sequelae of injury mechanisms and mild traumatic brain injury incurred during the conflicts in Iraq and Afghanistan: persistent postconcussive symptoms and posttraumatic stress disorder. *Am J Epidemiol*. 2008;167(12):1446-1452. doi: 10.1093/aje/kwn068.

■ Информация об авторах

Ольга Сергеевна Шубина — доктор биологических наук, профессор кафедры биологии, географии и методик обучения. E-mail: o.shubina@mail.ru

Марина Владимировна Егорова — очный аспирант кафедры биологии, географии и методик обучения. E-mail: egorova.marina@mail.ru

■ Information about the authors

Olga S. Shubina — Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Biology, Geography and Teaching Methods. E-mail: o.shubina@mail.ru

Marina V. Egorova — Postgraduate student of Biological Sciences, Department of Biology, Geography and Teaching Methods. E-mail: egorova.marina@mail.ru