

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НЕЙРОНОВ, КЛЕТОК МИКРОГЛИИ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

МАЛЬЦЕВА Н.В.¹, ВОЛЧЕГОРСКИЙ И.А.², ШЕМЯКОВ С.Е.³

AGE CHANGES OF MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF NEURONS, MICROGLIA CELLS AND ANTIOXIDANT PROTECTION ENZYMES ACTIVITY IN HUMAN CORTEX AT THE INITIAL STAGES OF POSTNATAL ONTOGENESIS

MALTSEVA N.V., VOLCHEGORSKII I.A., SHEMAKOV S.E.

¹Кафедра анатомии человека (зав.кафедрой – профессор Е.Л. Куренков), ²кафедра фармакологии (зав.кафедрой – профессор И.А. Волчегорский) ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Челябинск, ³кафедра анатомии человека (зав.кафедрой – профессор В.Н. Николенко), ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», г. Москва.

Изучены возрастные изменения количества и размеров пирамидных нейронов, числа клеток микроглии в сопоставлении с активностью ферментов антиоксидантной защиты у плодов 2-й половина беременности и на ранних этапах постнатального онтогенеза (n = 108) в поле 6 коры головного мозга человека. Установлено параллельное увеличение плотности микроглиоцитов и снижение числа пирамидных нейронов. Динамика нарастания числа микроглиальных клеток и размеров нейронов однонаправлена. Морфологические изменения во фронтальной коре происходили на фоне увеличения активности ферментов антиоксидантной защиты (ферментно-активного церулоплазмينا, каталазы). Установленные факты позволяют считать, что возрастное накопление микроглиоцитов с одной стороны предотвращает избыточную пролиферацию нейрональных предшественников, а с другой – усиливает антиоксидантную защиту дифференцирующихся пирамидных нейронов.

Ключевые слова: поле 6 коры головного мозга, постнатальное развитие, пирамидные нейроны, микроглия, каталаза, церулоплазмин, супероксиддисмутаза.

It was studied age-related changes of pyramidal neurons quantity and size, quantity of microglial cells in comparison with the activity of antioxidant protection enzymes fetus on 2nd half of pregnancy and in the early stages of postnatal ontogenesis (n = 108) in

field of 6 human cerebral cortex. It was established parallel between microglia density increase and pyramidal neurons quantity decrease. The dynamics of microglial cells growth and neurons profile fields area are unidirectional. Morphological changes in the frontal cortex occurred on the background increasing of antioxidant protection enzymes activity (enzyme-active ceruloplasmin, catalase). Established facts suggest that the age-related accumulation of microglia on the one side prevents excessive proliferation of neuronal precursors and on the other side, strengthens the antioxidant protection differentiated pyramidal neurons.

Key words: Field of 6 cortex, postnatal development, pyramidal neurons, microglia, catalase, ceruloplasmin, superoxidedismutase.

Введение. Известно, что церебральные нейроны относятся к числу наиболее уязвимых и чувствительных к оксидативному стрессу (ОС) клеток. Данное обстоятельство иллюстрирует высокое функциональное значение глиальных клеток, обеспечивающих трофику нейронов и их защиту от разнородных повреждающих воздействий [1]. Отмеченные функции глиальных клеток наименее изучены в отношении микроглиоцитов, на долю которых приходится всего 6,5 % от всего количества глиоцитов [2]. Данная категория глиальных клеток имеет мезенхимальное происхождение и может рассматриваться в качестве резистентного макрофага центральной нервной системы (ЦНС). В последнее время выявлена важная роль микроглии в развитии мозга путем регулирования количества нейронных клеток-предшественников и нейронов во время внутриутробного развития и раннего постнатального онтогенеза [3]. Микроглиоциты фагоцитируют «лишние» клетки в пролиферативных зонах ЦНС, регулируя их численность, что является важным для правильного развития мозга. Остается недостаточно изученной роль микроглиоцитов в регуляции антиоксидантной защиты (АОЗ) головного мозга (ГМ), играющей

общеизвестную роль в нейрогенезе на ранних этапах постнатального онтогенеза [4]. Наиболее значимыми компонентами АОЗ являются такие ферменты как Cu-, Zn- и Mn-зависимые супероксиддисмутазы (СОД), каталаза, церулоплазмин (ЦП), неферментные антиоксиданты [5].

Цель исследования – оценка возрастных изменений морфометрических характеристик нейронов, клеток микроглии в сопоставлении с активностью ферментов АОЗ в коре головного мозга человека на начальных этапах постнатального онтогенеза.

Материал и методы исследования. Препараты ГМ получены при аутопсии 93 трупов людей, погибших в возрасте от 1 дня до 21 года от заболеваний и травм, не связанных с первичным поражением ГМ. Материал для исследования предоставлен Челябинским областным бюро судебно-медицинской экспертизы и областным детским патологоанатомическим бюро. Наиболее частой причиной смерти явилась механическая асфиксия ($n = 43$), реже – утопление ($n = 21$), в 29 случае смерть наступила в результате пневмонии, травм и отравлений. Препараты фетального ГМ получены при аутопсии 15 плодов, погибших в результате прерывания беременности по медицинским показаниям на 25-30-й неделях гестации. Во всех случаях образцы ГМ для биохимического исследования получали не позднее 12 часов с момента наступления смерти и для морфологического исследования не позднее 24 часов.

В соответствии с возрастной периодизацией [6], полученные образцы ГМ были разделены на 8 групп: плоды 2-й половины беременности, новорожденные (1-10 дней), грудной ребенок (от 11 дней до 1 года), раннее детство (от 1 года до 3 лет), 1-й период детства (3 – 7 лет), 2-й период детства (8 – 12 лет для мальчиков, 8 – 11 лет для девочек), подростковый возраст (13 – 16 лет для мальчиков, 12 – 15 лет для девочек), юношеский возраст (17 – 21 лет для мужчин, 16 – 20 лет для женщин).

Количество нейронов и микроглиоцитов, активность каталазы, Cu-, Zn-СОД и содержание ферментно-активного церулоплазмينا (ФАЦП) изучали в поле 6 коры ГМ. Микроглиоциты выявляли по методике Мийагавы в модификации Александровской [7], нейроны – методом окраски крезильовым фиолетовым по Нисслю [8]. Подсчет глиальных клеток и пирамидных нейронов проводили в V-ом слое коры поля 6. Активность каталазы оценивали по скорости снижения уровня перекиси водорода (H_2O_2) в среде инкубации [9]. Содержание ФАЦП определяли модифицированным методом [10] при увеличении времени инкубации до 180 мин. Активность Cu-, Zn-СОД регистрировали с помощью колориметрического метода [11].

Подсчет количества нервных и глиальных клеток, площади профильного поля перикариона производился на микроскопе Leica DMRXA с помощью компьютерной программы анализа изображения Image Scope, Leica (Германия). Статистическую сопоставимость (однородность) сформированных возрастных групп в целом оценивали по критерию Краскелла-Уоллиса. В случае выявления статистической неоднородности изученных выборок межгрупповые различия уточнялись по U-критерию Манна-Уитни. Изучение взаимосвязей проводили путем расчета коэффициентов корреляции по Спирмену (r_s). Проверку статистических гипотез проводили при критическом уровне $p=0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате проведенного исследования на начальных этапах постнатального онтогенеза установлено снижение числа пирамидных нейронов в поле 6 коры ГМ, которое к раннему детству достигло значимых отличий относительно плодов 2-й половины беременности и новорожденных (табл.). В период 8 лет – 21 год изучаемый показатель не изменялся, оставаясь достоверно ниже фетального уровня и значений новорожденных и грудных детей. Именно в данный возрастной период площадь профильного поля перикариона пирамидных нейронов достигала максимальных значений, в 1,6 раза превышая показатели плодов 2-й половины беременности. Число пирамидных нейронов поля 6 коры больших полушарий в изученные возрастные периоды отрицательно коррелировало со значениями календарного возраста ($r_s = -0,657$; $p < 0,001$), а размер их тел – наоборот ($r_s = 0,756$; $p < 0,001$). Выявленные возрастные изменения нейронов в поле 6 коры больших полушарий сопровождалось нарастанием числа клеток микроглии (таблица). Увеличение данного параметра наблюдалось сразу после рождения и продолжалось в последующие изученные возрастные периоды. Число клеток микроглии в поле 6 достигало максимальных значений в том возрасте, когда число пирамидных нейронов было минимальным. В поле 6 коры ГМ число клеток микроглии прямо коррелировало с абсолютными значениями календарного возраста ($r_s = 0,459$; $p < 0,001$).

Морфологические изменения во фронтальной коре происходили на фоне увеличения активности ферментов АОЗ (таблица). Прежде всего это касалось ФАЦП, содержание которого возрастало в 1,9 раза относительно фетальных значений уже в период новорожденности. В последующие изученные возрастные периоды уровень ФАЦП уменьшался, оставаясь выше значений плодов 2-й половины беременности и новорожденных. Активность каталазы в поле 6 коры ГМ также на-

Таблица.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА И РАЗМЕРА ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ, ЧИСЛА КЛЕТОК МИКРОГЛИИ, СОДЕРЖАНИЯ ФЕРМЕНТНО-АКТИВНОГО ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА, АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ПОЛЕ 6 КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА [M±m]

| Показатель Возраст | Количество нейронов (0,01 мм ³ ткани) | Площадь тел нейронов (мкм ²) | Количество клеток микроглии (0,01 мм ³ ткани) | Содержание ФАЦП (мг/ 10 гр ткани) | Активность каталазы (нмоль/сек/1 гр ткани) | Активность СОД (ЕД/мг ткани/мин. (×10 ⁻²)) |
|-----------------------|--|--|--|-----------------------------------|--|--|
| Плоды второй половины | 156,05±11,44 | 104,86±3,32 | 146,97±9,31 | 2,30 ± 0,36 | 1,07 ± 0,11 | 2,05 ± 0,62 |
| Новорожденные | 132,99±4,99 | 116,31±4,73 | ¹ 183,16±9,79 | ¹ 4,33 ± 0,24 | 1,20 ± 0,23 | 2,23 ± 0,37 |
| Грудной ребенок | 129,00±8,89 | ¹ 129,88±4,97 | ¹ 199,55±9,85 | ² 3,38 ± 0,17 | 1,04 ± 0,18 | 2,45 ± 0,26 |
| Раннее детство | ^{1,2} 110,96±4,81 | ^{1,2} 142,46±2,95 | ¹ 218,88±10,90 | ² 3,49 ± 0,25 | 1,10 ± 0,17 | ^{2,3} 1,55 ± 0,27 |
| Первый период детства | ^{1,2} 109,86±5,02 | ^{1,2} 146,10±6,45 | ^{1,2,3} 226,30±7,63 | ^{1,2} 3,38 ± 0,23 | ¹³⁴ 1,92 ± 0,19 | 2,14 ± 1,20 |
| Второй период детства | ^{1,2,3} 104,27±2,70 | ^{1,2,3,4} 166,46±8,06 | ^{1,2} 221,47±11,82 | ^{1,2} 3,61 ± 0,18 | ^{1,2,3,4} 2,18 ± 0,20 | 2,08 ± 0,40 |
| Подростковый возраст | ^{1,2,3} 106,42±2,81 | ¹²³ 154,91±7,14 | ^{1,2} 220,25±12,47 | ^{1,2} 3,67 ± 0,20 | ^{1,3,4} 1,77 ± 0,18 | ² 2,60 ± 0,85 |
| Юношеский возраст | ^{1,2,3} 103,15±4,04 | ^{1,2,3,4} 158,51±5,60 | ¹ 201,68±9,82 | 4,18 ± 1,17 | ⁶ 1,57 ± 0,21 | 1,67 ± 0,34 |

Примечание: $p < 0,05$ U-критерий Манна-Уитни – ¹ – с группой «плоды»; ² – с группой «новоорожденные»; ³ – с группой «грудной возраст»; ⁴ – с группой «раннее детство»; ⁶ – с группой «второй период детства» при значимой неоднородности показателей ($p < 0,05$; критерий Краскелла-Уоллеса).

растала, достигая максимального уровня во 2-м периоде детства. Исследованный отдел коры характеризовался прямой корреляцией между активностью каталазы и календарным возрастом ($r_s = 0,395$; $p = 0,001$). Также установлена значимая корреляционная связь между числом клеток микроглии и активностью каталазы ($r_s = 0,731$; $p = 0,040$). В изученных возрастных периодах активность СОД снижалась в раннем детстве относительно показателей новорожденных и грудных детей, после чего увеличивалась к подростковому возрасту.

Обсуждение результатов исследования. Результаты проведенного исследования продемонстрировали параллельное нарастание плотности микроглиоцитов и снижение числа пирамидных нейронов в поле 6 коры ГМ. Данный факт хорошо согласуется с представлениями о микроглиальном клиренсе «излишка» низкодифференцированных нейрональных предшественников [3]. Справедли-

вость данного положения подтверждается также однонаправленной динамикой нарастания числа микроглиальных клеток и площади профильного поля перикариона нейронов. Установленные факты позволяют считать, что возрастное накопление микроглиоцитов способствует процессу дифференцировки нейрональных предшественников и одновременно ограничивает избыточный пролиферативный потенциал стволовой нервной клетки. Установленное в работе соответствие нарастания ферментов АОЗ (ФАЦП, каталазы) и числа микроглиальных клеток свидетельствует о вероятной роли микроглиоцитов в онтогенетическом становлении АОЗ ГМ.

В целом, результаты проведенного исследования иллюстрируют регуляторную роль клеток микроглии во фронтальной коре формирующегося мозга человека: с одной стороны это связывают с предотвращением избыточной пролиферации

нейрональных предшественников, а с другой – с усилением АОЗ дифференцирующихся пирамидных нейронов. При это, важно подчеркнуть, что нарушение отмеченного баланса ведет к развитию патологических состояний. Известно, что чрезмерная пролиферация нейронов имеет прямое отношение к развитию расстройств аутистического спектра [3], а снижение АОЗ мозга является важнейшим механизмом нейродегенеративного процесса [12].

ЛИТЕРАТУРА:

1. *Streit, W.J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS / W.J. Streit // Glia. – 2002. – Vol. 40, № 2. – P. 133-139.*
2. *Jansen, A.N. The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases / A.N. Jansen, E.A. Reits, E.M. Hol // Front. Mol. Neurosci. – 2014. – № 7. – P. 73.*
3. *Cunningham, C.L. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex / C.L. Cunningham, V. Martinez-Cerdeno, S.C. Noctor // J. Neurosci. – 2013. – Vol. 33, № 10. – P. 1616.*
4. *Черешнев, В.А. Молекулярные механизмы воспаления / В.А. Черешнев, Б.А. Фролов, Н.М. Беляева [и др.]. – Екатеринбург : Изд-во УрО РАН, 2010. – 261 с.*
5. *Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов / М.В. Биленко. – Москва : Медицина, 1989. – 367с.*
6. *Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия : руководство / Г.Г. Автандилов. – Москва : Медицина, 1990. – 384 с.*
7. *Саркисов, Д.С. Микроскопическая техника : руководство / Д.С. Саркисов, Ю.П. Петров. – Москва : Медицина, 1996. – 544 с.*

8. *Сапожников, А.Г. Гистологическая и микроскопическая техника / А.Г. Сапожников, А.Е. Доросевич. – Смоленск : Изд-во САУ, 2000. – 476 с.*

9. *Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.*

10. *Колб, В.Г. Клиническая биохимия / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1976. – 311с.*

11. *Чевари, С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.*

12. *Шемяков, С.Е. Активность церулоплазмينا в головном мозге человека / С.Е. Шемяков // Морфология. – 2012. – Т. 141, № 3. – С. 177-178.*

Авторская справка:

1. Мальцева Наталья Васильевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры анатомии человека ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64; тел. 8(351) 232-13-09; e-mail: malinanv_1@mail.ru).

2. Волчегорский Илья Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64; тел. 8(351) 232-73-69; e-mail: volcheg@yandex.ru).

3. Шемяков Сергей Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры анатомии человека ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; e-mail: shemy-akov@mail.ru.