

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Ильичева В.Н., Штемберг А.С., 2014
УДК 611.813.1-018.1:612.014.481

**АНАЛИЗ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ РАЗЛИЧНЫХ ЗОН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**

В.Н. Ильичева¹, А.С. Штемберг²

ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко»
Минздрава России, г. Воронеж (1)
ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, г. Москва (2)

В работе, в эксперименте, проведенном на беспородных белых крысах-самцах, облученных однократно в дозе 1,0 Гр, анализировали морфофункциональные изменения нейроцитов новой, старой и древней коры головного мозга в течение 18 месяцев после радиационного воздействия. Полученные данные в виде регрессионных уравнений, позволяют на основании имеющихся данных о морфофункциональном состоянии нервных клеток облученного животного, рассчитывать время, прошедшее после облучения.

***Ключевые слова:** кора головного мозга, ионизирующее излучение, регрессионный анализ.*

Оценка закономерностей реакции человека на различные экзогенные факторы и поиск средств профилактики, защиты и лечения – одна из основных задач современной медицины [8, 10, 11, 13]. Создавая адекватные экспериментальные модели, исследователи преследуют цель – изучение механизмов воздействия исследуемого фактора на организм человека путем экстраполяции полученных данных эксперимента, опираясь на общность симптоматики у различных видов животных и человека [4, 6, 7] и разработанные коэффициенты экстраполяции [2, 3].

Материалы и методы

Эксперимент спланирован и проведен на базе Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины МО РФ (г. Москва). В его основу положены данные о лучевой нагрузке у военнослужащих-ликвидаторов аварии на ЧАЭС и состоянии их здоровья в ранние и отдаленные сроки пострадиационного периода.

Эксперимент проведен на 100 половозрелых крысах-самцах весом 200-230 г,

в возрасте 1,5-2 месяцев к началу эксперимента. Животные подвергались общему равномерному однократному гамма-облучению спектр 1,2 МЭв на установке «Хизатрон» (Co⁶⁰) в дозе и 1,0 Гр. Мощность дозы облучения составляла 50 сГр/ч. Взятие материала производилось через 1 сут, 6, 12 и 18 месяцев после воздействия. Протокол эксперимента в разделах выбора, содержания животных и выведения их из опыта был составлен в соответствии с принципами биоэтики и правилами лабораторной практики, представленных в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Дозиметрический контроль равномерности облучения осуществлялся клиническим дозиметром 27012, стержневая камера которого располагалась в поле облучения. Неравномерность дозового поля составила ± 15%. Материалом исследования служили участки мозга, выделяемые согласно цитоархитектоническим

картам [5, 12, 14] – вторичная моторная кора (кора верхней лобной извилины (ВЛИ), прелимбическая (кора передней лимбической области (ПЛО), цитоархитектонические поля CA₁–CA₄ гиппокампа и зубчатая фасция (ЗФ), пириформная зона древней коры (ПЗ). Фрагменты мозга фиксировали в 10%-ном растворе формалина, приготовленном на 0,2 М фосфатном буфере. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином Караци–эозином для обзорных целей. Для изучения цитоархитектоники микропрепараты окрашивали метиленовым синим по Нисслю [1]. В изучаемых отделах коры головного мозга с помощью программы “Видео-Тест-Морфо” (С.-Петербург) проводили измерение площадей сечения тела нейроцитов, их ядра и ядрышка. Вычисляли ядерно-клеточный, ядерно-цитоплазматический и ядрышко-ядерный индексы. Ввод изображения производился через оптическую систему микроскопа “Leika”, DM LS, с видеокамерой JVC TK-1280E и адаптером, подключенные к компьютеру “PENTIUM-II”. Для проведения регрессионного анализа у каждого животного учитывались морфометрические показатели

для 300 нормохромных нейроцитов.

Полученные данные обрабатывались с помощью программ «Microsoft Excel 2003», «Statistica 6.0» for Windows. Статистический анализ количественных переменных основывался на вычислении средней величины, дисперсии, среднего квадратичного отклонения, ошибки среднего арифметического, коэффициентов асимметрии и эксцесса. При этом учитывали характер закона распределения параметров: в условиях нормального распределения выборки для оценки вероятности различий использовали критерий Стьюдента, в остальных случаях – непараметрический критерий Вилкоксона–Манни–Уитни. Объем материала, необходимого для исследования, определяли методом аккумулярованных средних. Достоверными при этом считались различия с вероятностью более 0,95 (P<0,05).

Нами был выполнен множественный регрессионный анализ между шестью определенными независимыми параметрами, характеризующими строение нейроцита (табл. 1) и сроками прошедшими после воздействия радиоактивного излучения.

Таблица 1

Параметры, характеризующие строение нейроцита

Условное обозначение	Наименование показателя
a ₁	Площадь сечения нейрона
a ₂	Площадь сечения ядра
a ₃	Площадь сечения ядрышка
a ₄	Ядерно-клеточный индекс
a ₅	Ядерно-цитоплазматический индекс
a ₆	Ядрышко-ядерный индекс

Для исключения мультиколлинеарности матрицы данных перед выполнением регрессионного исследования в каждой выборке для каждого показателя был проведен анализ матрицы коэффициентов парной корреляции 6 абсолютных морфометрических показателей нейронов (a₁–a₆). Значения некоторых из них коррелируют между собой с коэффициентом r>0,7, то есть расцениваются статистически как одна независимая величина. Морфометрические показатели нейронов, имеющие высокий коэффициент корреляции

(r>0,7) были редуцированы.

Множественный линейный регрессионный анализ выполнялся в пакете программ IBM SPSS Statistics 20.0 методом пошагового исключения. Данная методика заключается в последовательном исключении факторов с помощью t-критерия. В результате построения уравнения регрессии и оценки значимости всех коэффициентов регрессии из модели исключался тот фактор, коэффициент при котором незначим и имел наименьшее значение t-статистики по абсолютной

величине. Таким образом, получалось новое уравнение множественной регрессии, и снова проводили оценку значимости всех оставшихся коэффициентов регрессии. Процесс исключения факторов останавливался лишь на том шаге, при котором все регрессионные коэффициенты были значимы.

В ходе регрессионного анализа сформированных выборок, получены следующие регрессионные уравнения с коэффициентами регрессии, статистически значимо отличные от нуля при $p=0,050$. После каждого уравнения в скобках указан коэффициент корреляции (R), коэффициент детерминации (R^2), коэффициент Фишера (F) и уровень значимости уравнения регрессии [9].

Результаты и их обсуждение

В результате проведенного исследования были получены данные, свидетельствующие о значительном снижении площади сечения нейрона, ядра и ядрышка в первые сутки после воздействия, далее в течение всего срока наблюдения – исследуемые показатели приближаются к исходным значениям, однако к концу срока все же остаются ниже контрольного уровня. Следует отметить, что, несмотря на сходную динамику всех исследуемых нейроморфологических параметров в старой и древней зонах коры головного мозга к 18 месяцам после воздействия площади сечения нейрона, ядра и ядрышка возвращаются к контролю или превышают исходный уровень.

Используя массив полученных характеристик нормохромных нейроцитов в филогенетически различных зонах коры головного мозга крыс, проведен регрессионный анализ с целью установления времени, прошедшего после сеанса облучения.

Для клеток верхней лобной извилины:
 $x_{ВЛИ}=6549,263-23073,808 \times a_4-19885,256 \times a_6$;
($R=0,991$, $R^2=0,983$, $F=6320,214$,
при $p=0,000$);

Для нейронов передней лимбической области:
 $x_{ДЛО}=3019,975-12543,889 \times a_4$; ($R=0,974$,
 $R^2=0,948$, $F=3994,051$, при $p=0,000$);

Для нейроцитов пириформной зоны древней коры:

$x_{ДК}=6734,480+12,316 \times a_2-38382,045 \times a_5$;
($R=0,999$, $R^2=0,999$, $F=161555,968$, при
 $p=0,000$);

Для пирамидных клеток поля СА₁ гиппокампа:

$x_{СА1}=-25867,205+3808,413 \times a_3+5947,680 \times a_4+27854 \times a_5$;
($R=0,999$, $R^2=0,999$, $F=108725,868$,
при $p=0,000$);

Для пирамидных клеток поля СА₂ гиппокампа:

$x_{СА2}=784,483+47,593 \times a_1+36,220 \times a_2-16108,331 \times a_5-98,302 \times a_6$;
($R=0,999$, $R^2=0,999$, $F=35594581,51$, при $p=0,000$);

Для пирамидных клеток поля СА₃ гиппокампа:

$x_{СА3}=-10093,915+232,619 \times a_2-427,988 \times a_4-314,462 \times a_5$;
($R=0,992$, $R^2=0,985$,
 $F=4855,678$, при $p=0,000$);

Для пирамидных клеток поля СА₄ гиппокампа:

$x_{СА4}=-6424,106-9,858 \times a_2+2579,453 \times a_3$;
($R=0,983$, $R^2=0,966$, $F=3185,017$, при $p=0,000$);

Для гранулярных клеток зубчатой фации:

$x_{ЗФ}=-2459,512+31,028 \times a_1+13,541 \times a_3-1996,030 \times a_5-215381,191 \times a_6$;
($R=0,999$, $R^2=0,999$, $F=656244,788$, при $p=0,000$).

Регрессионный анализ позволяет рассчитывать с известной долей допущений [2, 3] время, прошедшее после воздействия заданной дозы ионизирующего излучения, по известным морфофункциональным характеристикам нейроцитов. Соответственно, возможны прогнозирование и корректировка предполагаемых изменений в различных филогенетическом отношении зонах коры головного мозга.

Заключение

Таким образом, регрессионный анализ, проведенный по результатам эксперимента, позволил обосновать зависимость морфофункциональных изменений, развивающихся в нейронах филогенетически различных отделов мозга от времени, прошедшего после облучения.

Литература

1. Годовалова О.С. Нейрональная миграция под бороздами и извилинами неокортекса в фетальном

- периоде онтогенеза человека / О.С. Годовалова, С.В. Савельев // Клинич. и эксперим. морфология. – 2013. – № 1. – С. 30-33.
2. Даренская Н.Г. Общность реакции организма на воздействия различных физических факторов и ионизирующего излучения как основа для прогнозирования радиочувствительности организма / Н.Г. Даренская, А.Ю. Григорьев, С.С. Кузнецова // Радиация и организм. Комбинированное действие ионизирующей радиации и других физических факторов среды. – Обнинск, 1984. – С. 28-31.
 3. Даренская Н. Г. Радиочувствительность млекопитающих. Экспериментальные и клинические материалы к прогнозированию лучевого поражения: дис. д-ра мед. наук / Н.Г. Даренская. – М., 1971. – 596 с.
 4. Ильичева В.Н. Характеристика филогенетически различных отделов коры головного мозга крыс после облучения / В.Н. Ильичева, Б.Н. Ушаков // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2012. – № 2. – С. 87-91.
 5. Курепина М.М. Мозг животных / М.М. Курепина. – М.: Наука, 1981. – 148 с.
 6. Лосев Н.И. Некоторые методологические аспекты моделирования болезней человека на животных / Н.И. Лосев, П.Ф. Литвицкий // Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных: материалы Всесоюз. конф. (8-10 окт. 1980 г.). – М., 1980. – С. 258-260.
 7. Майстрах Е.В. К проблеме адекватности экспериментальных моделей патологических процессов условиям природной и клинической патологии / Е.В. Майстрах // Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных: материалы Всесоюз. конф. (8-10 окт. 1980 г.). – М., 1980. – С. 258-260.
 8. Медведев Ю.М. Некоторые теоретические аспекты экстраполяции экспериментальных данных / Ю.М. Медведев // Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных: материалы Всесоюз. конф. (8-10 окт. 1980 г.). – М., 1980. – С. 254-255.
 9. Медик В.А. Статистика в медицине и биологии: руководство: в 2-х т. / В.А. Медик, М.С. Токмачев, Б.Б. Фишман; под ред. Ю.М. Комарова. – М.: Медицина. – Т. 1. Теоретическая статистика. – 412 с.
 10. Насонова Н.А. Структурно-функциональная характеристика стриопаллидарной системы при облучении ионизирующим излучением в малых дозах / Н.А. Насонова, Д.А. Соколов // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2013. – Т. 2, № 1. – С. 43-45.
 11. Петров А.В. Морфологические формы адаптационной изменчивости нервных клеток при действии антропогенных факторов / А.В. Петров, В.П. Федоров // Новости клинической цитологии России. – 1998. – Т. 2, № 2. – С. 83-84.
 12. Филимонов И.Н. Цитоархитектоника коры большого мозга человека / И.Н. Филимонов. – М.: Медигз, 1949. – 433 с.
 13. Чернух А.М. Эксперимент, экспериментатор и клиника заболеваний человека / А.М. Чернух // Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных: материалы Всесоюз. конф. (8-10 окт. 1980 г.). – М., 1980. – С. 3-4.
 14. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – Elsevier Acad. Press, 2004. – 367 p.

**ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHANGES
OF PHYLOGENETICALLY DIFFERENT AREAS
OF THE CEREBRAL CORTEX IN RATS**

V.N. Ilicheva, A.S. Shtemberg

In experiment conducted on outbred white male rats, irradiated with a single dose of 1.0 Gy, morphological changes of neurocytes in neo-, archi- and paleocortex were analyzed within 18 months after the exposure. The obtained regression equations enable to count the time elapsed after irradiation, on the data of morphofunctional state of nerve cells in irradiated animals.

Keywords: cerebral cortex, ionizing radiation, regression analysis.

Ильичева В.Н. – канд. мед. наук, доц. кафедры нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России.
394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10.
E-mail: vera-vgma@rambler.ru.

Штемберг А.С. – д-р биол. наук, проф., вед. науч. сотрудник ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН.