



СОДЕРЖАНИЕ ДНК В НЕЙРОНАХ ЦНС ИНТАКТНЫХ И ПЕРЕНЕСШИХ КЛИНИЧЕСКУЮ СМЕРТЬ СОБАК

АВРУЩЕНКО М. Ш., МАРШАК Т. Л.

Институт общей реаниматологии АМН СССР, Институт биологии развития АН СССР, Москва

Методом цитофотометрии на окрашенных по Фельгену препаратах измерено содержание ДНК в ядрах нейронов различных отделов ЦНС у собак. Показано, что у интактных животных клетки Пуркинье и клетки-зерна мозжечка, большие и малые пирамиды гиппокампа и нейроны двигательной области коры больших полушарий диплоидны. На 14-е сутки после перенесенной клинической смерти различной этиологии и длительности у 5 собак содержание ДНК в ядрах клеток Пуркинье и клеток-зерен мозжечка не отличалось от нормы. У двух животных с нарушениями неврологического статуса обнаружено 1,4% гипердиплоидных клеток Пуркинье, а также изменение структуры хроматина клеток-зерен. Высказывается предположение о функциональной обусловленности обнаруженных изменений.

Изучение постреанимационной патологии мозга является центральной задачей современной реаниматологии [1]. Наиболее раними при клинической смерти кора больших полушарий, кора мозжечка, гиппокамп [2, 3].

С точки зрения функциональной цитологии главным образом изучена популяция клеток Пуркинье коры мозжечка собак, перенесших клиническую смерть различной этиологии и длительности [4, 5]. Установлено, что в постреанимационном периоде происходит существенное изменение популяции: снижается число клеток Пуркинье, изменяется соотношение светлых и темных нейронов, резко возрастает число морфологически измененных клеток. Наряду с этим происходит увеличение размеров ядра, ядрышка, цитоплазмы клеток Пуркинье и возрастает их сухая масса. Выраженность изменений зависит от длительности перенесенной ишемии и коррелирует со степенью восстановления неврологического статуса животных [5, 6].

В настоящем сообщении приведены данные о содержании ДНК в нейронах мозжечка интактных и перенесших клиническую смерть собак. Необходимость проведения такого исследования определена имеющимися в литературе данными о том, что ядра клеток Пуркинье могут содержать гипердиплоидное количество ДНК. Предполагается, что число гипердиплоидных (Н2С) клеток может быть функционально зависимым [7].

Кроме того, содержание ДНК определялось в ядрах нейронов двигательной области коры больших полушарий и в ядрах пирамидных клеток гиппокампа.

Материалы и методы

Работа выполнена на половозрелых беспородных собаках обоего пола, содержащихся в стандартных условиях вивария. Определялось содержание ДНК в ядрах нейронов двигательной области коры больших полушарий, больших и малых пирамид гиппокампа (2 собаки), а также клеток Пуркинье и клеток-зерен мозжечка интактных животных (7 собак). Проведено также определение содержания ДНК в ядрах клеток Пуркинье и клеток-зерен мозжечка собак, перенесших клиническую смерть различной этиологии и длительности: 10-минутную клиническую смерть от острой кровопотери (4 собаки с нарушениями неврологического статуса), 12 мин остановки системного кровообращения от электротравмы (2 собаки с полным восстановлением неврологического статуса) и 15 мин остановки системного кровообращения от электротравмы (1 собака с нарушениями неврологического статуса)*. Мозжечок исследовали через 14 суток после оживления животных. У интактных и подопытных собак в мозжечке всегда исследовали клетки Пуркинье и клетки-зерна, взятые из трех различных функциональных областей—медиальной, интермедиальной и латеральной [8].

Для определения содержания ДНК в ядрах нейронов готовили препараты [9], которые фиксировали 96%-ным спиртом (30 мин) и окрашивали затем по Фельгену с предварительным гидролизом в 5 н. HCl при 37° в течение 10 мин. Содержание ДНК в ядрах нейронов определяли на сканирующем микроденситометре Виккерс М 86 при длине волны 540 нм.

Гаплоидный уровень содержания ДНК определяли по сперматидам, использование которых в качестве эталона плоидности при измерении содержания ДНК в нейронах доказано ранее [10].

Результаты и обсуждение

Гистограммы распределения клеток Пуркинье и клеток-зерен коры мозжечка по содержанию ДНК у интактных собак представлены на рис. 1 (для примера приведены результаты измерения содержания ДНК в ядрах нейронов у 2 животных). Как видно из рисунка, клетки Пуркинье и клетки-зерна диплоидны. Симметричность гистограммы свидетельствует об однородности популяции клеток Пуркинье по содержанию ДНК. Для исследования брались клетки Пуркинье из разных функциональных областей мозжечка. Следовательно, эти данные демонстрируют, что клетки Пуркинье медиальной, интермедиальной и латеральной областей мозжечка имеют одинаковое содержание ДНК.

Таким образом, у интактных собак не обнаружено H2C клеток Пур-

* Опыты поставлены научными сотрудниками Института общей реаниматологии АМН СССР Е. А. Мутускиной и И. С. Новодержкиной

кинье. Это полностью совпадает с данными, полученными Мапп и соавт. [11], однако результаты работы Lee и соавт. [12] свидетельствуют о том, что в мозжечке собак имеется небольшое число $2C$ и $4C$ клеток Пуркинье.

Результаты определения содержания ДНК в ядрах пирамидных клеток гиппокампа и коры больших полушарий интактных животных представлены на рис. 2. Содержание ДНК в ядрах этих нейронов соответствует содержанию ДНК в ядрах клеток Пуркинье. Следовательно, у собак, так же как и у крыс [13], нейроны коры больших полушарий и гиппокампа диплоидны.

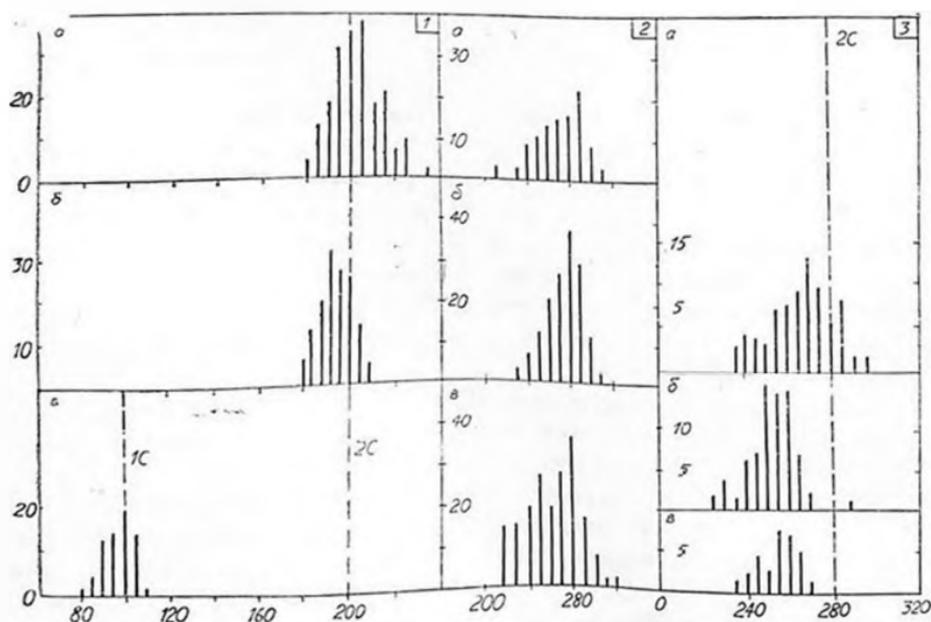


Рис. 1. Содержание ДНК в ядрах клеток Пуркинье (а), клеток-зерен (б), мозжечка и сперматид (а). По оси абсцисс—содержание ДНК в усл. ед., по оси ординат—число ядер. 1С—гаплоидный уровень содержания ДНК, 2С—диплоидный уровень содержания ДНК

Рис. 2. Содержание ДНК в ядрах нейронов гиппокампа (и), коры больших полушарий (б) и клеток Пуркинье (а) у интактных собак. Обозначения те же, что на рис. 1

Рис. 3. Содержание ДНК в ядрах клеток-зерен мозжечка у собак через 14 суток после оживления: а—у животных с полным восстановлением; б, в—у животных с нарушениями неврологического статуса. Обозначения те же, что на рис. 1

Через 14 суток после оживления у 5 из 7 подопытных собак не выявлено изменений в содержании ДНК в ядрах клеток-зерен. У двух подопытных животных обнаружен сдвиг влево гистограммы распределения клеток зерен по содержанию ДНК (рис. 3). Известно, что интенсивность связывания ДНК с фуксином реактива Шиффа при реакции Фельгена зависит от изменения структуры хроматина [14, 15]. Следствием этого, в

гоятно, и является сдвиг гистограммы распределения клеток-зерен по содержанию ДНК в их ядрах.

Изменения структуры хроматина выявлены в клетках-зернах и клетках Пуркинье мышей под воздействием кортикостероидов [16], а также в нейронах гиппокампа в период постнатального развития крыс [17] и в различных отделах ЦНС при болезни Альцгеймера [18, 19]. Сдвиг гистограммы влево свидетельствует о том, что, по-видимому, происходит компактизация хроматина, как правило сопровождающаяся снижением матричной активности. Выявленные изменения состояния хроматина клеток-зерен коррелируют с наблюдаемым в постреанимационном периоде резким увеличением числа дистрофически измененных клеток Пуркинье и снижением общей плотности популяции клеток Пуркинье [5].

Содержание ДНК в клетках Пуркинье через 14 суток после оживления у 5 из 7 исследованных собак соответствовало диплоидному уровню. У двух подопытных собак выявлены Н2С ядра, число которых составляло 1,4%. Существенно, что обе собаки имели стойкие нарушения неврологического статуса. Поскольку у интактных собак при измерении содержания ДНК в ядрах большого числа нейронов Н2С клетки Пуркинье не были выявлены, можно полагать, что появление единичных гипердиплоидных ядер в постреанимационном периоде у некоторых животных может быть проявлением одного из механизмов компенсации нарушенных функций нейрона [7]. Малое число выявленных в коре мозжечка Н2С клеток является, возможно, следствием того, что феномен имеет наибольшее развитие в более ранние сроки после оживления животных. В настоящей работе содержание ДНК в клетках Пуркинье исследовалось на 14-е сутки постреанимационного периода, что было обусловлено необходимостью определения полноты восстановления неврологического статуса собак. Принимая во внимание, что основные изменения популяции клеток Пуркинье происходят в течение 1 суток после оживления [5], можно предположить, что именно в раннем постреанимационном периоде появляются Н2С клетки, а позднее избыток ДНК в ядре исчезает. Это предположение согласуется с представлением о том, что функциональные изменения количества ДНК в ядрах могут быть кратковременными и транспортными [16, 20, 21].

Итак, результаты работы показали, что нейроны мозжечка, большие и малые пирамиды гиппокампа и нейроны коры больших полушарий у собак диплоидны. Это позволяет с позиций развиваемых представлений о метаболической роли ДНК в нервных клетках [21] рассматривать как функционально обусловленные любые выявляемые в экспериментальных условиях изменения в содержании ДНК в отдельных нервных клетках или изменения характера распределения нервных клеток по содержанию ДНК в них. Обнаруженные в настоящей работе на 14 сутки после оживления изменения структуры хроматина ядер клеток-зерен и появление единичных Н2С клеток Пуркинье у животных с нарушениями статики указывают на принципиальную возможность реализации этого механизма регуляции активности нейрона после тяжелой гипоксии. Все вышесказан-

ное предопределяет необходимость исследования в дальнейшем содержания ДНК в клетках Пуркинье и других нейронах ЦНС на ранних сроках постренимационного периода.

DNA CONTENT IN THE NEURONS OF CNS OF CONTROL DOGS AND THOSE WHO SUFFERED FROM CLINICAL DEATH

AVRUSHCHENKO M. Sh., MARSHAK T. L.

Institute of Resuscitation, Academy of Medical Sciences of the USSR and
Institute of Developmental Biology, Acad. Sci USSR, Moscow

Using the method of cytophotometry DNA content was measured in Feulgen-stained samples in the nuclei of neurons of different parts of dog CNS. In intact dogs Purkinje and granule-cells of cerebellum, large and small pyramidal cells of hippocampus and the neurons of the motor cortex were shown to be diploid. On the 14th day after clinical death of different etiology and duration no change was found in the DNA content of Purkinje or granule-cells nuclei. In two dogs with disturbances of neurological status 1,4% of Purkinje cells were hyperdiploid, and there was a change in the chromatin structure of granule-cells. The changes observed are assumed to be functionally determined.

ЛИТЕРАТУРА

1. Неговский В. А. Очерки по реаниматологии. М., Медицина, 1986.
2. Туманов В. П., Кривоцкая Г. Н., Черняк В. А.—В кн.: Реактивные и регенеративные процессы в нервной системе (под ред. И. Меллсашвили), с. 190—195, Тбилиси, Сабчота сакартвело, 1971.
3. Аутард В., Floquet J. *Tempo med.*, v. 193, № 23—25, p. 27—28, 1985.
4. Гурвич А. М., Романова Н. П., Мутускина Е. А. *Журн. высш. нерв. деят-сти*, т. 21, № 4, с. 802—809, 1971.
5. Аврущенко М. Ш. Изменения популяции клеток Пуркинье мозжечка собак в постренимационном периоде. Автореферат канд. дисс., М., 1984.
6. Маршак Т. Л., Аврущенко М. Ш. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 10, с. 477—478, 1986.
7. Маршак Т. Л., Марси В., Бродский В. Я.—В кн.: Цитологические механизмы гистогенезов, с. 109—111, Ташкент, Фан, 1983.
8. Jansen J., Brodal A.—In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. 4. Teil 8, 323 ss., Berlin, Springer-Verlag, 1958.
9. Sandritter W., Pitny J., Novakova V., Klefer G. *Histochemie*, v. 7, p. 1, 1966.
10. Маршак Т. Л., Марси В., Бродский В. Я. *Цитология*, т. 20, № 6, с. 651—656, 1978.
11. Mann D. M. A., Yates P., Barton C. J. *Comp. neurol.*, v. 180, № 2, p. 345—347, 1978.
12. Lee G. M., Rasch E. M., Thornthwente J. T. *Cell. Biochem. a Function*, v. 2, 4, p. 225—231, 1984.
13. Маршак Т. Л., Марси В., Штупек С., Црковска И. *Цитология*, т. 25, № 5, с. 539—545, 1983.

14. Маршак Т. Л., Бродский В. Я., Урываева И. В. Онтогенез, т. 1, № 4, с. 421—427, 1970.
15. Котельников В. М., Литинская А. А. Цитология, т. 21, № 5, с. 491—507, 1979.
16. Marshak T. L., Mares V., Brodsky V. J. Acta histochem., v. 76, p. 193—200, 1985.
17. Krug H., Wenk A. Acta Histochem., v. 45, № 2, p. 305—321, 1973.
18. Crapper D., Quittkat S., De Boni U. Brain, v. 3, p. 483—495, 1979.
19. Levis P. N., Lukla V. J., De Boni U., Crapper D. R., Luchlan H. C. J. Neurochem., v. 37, № 5, p. 1153—1202, 1981.
20. Ашапкин В. В., Ванюшин Б. Ф. Успехи соврем. биол., т. 98, № 3(6), с. 323—337, 1984.
21. Guititta A.—In: Handbook of Neurosciences (ed. Lajtha), v. 5, p. 251—275, N—J, London, Plenum Press, 1933.

Поступила 17. XII 1987

Хайдарлиу С. Х. Нейромедиаторные механизмы адаптации (№ 94).
Кишинев, Штиинца, 12 л., 1989 г.

В монографии обобщаются данные литературы и результаты собственных исследований автора, посвященные раскрытию механизмов формирования приспособительных реакций организма при действии стресс-факторов. Раскрыта роль медиаторных систем и межмедиаторных взаимодействий в активации специфических и неспецифических механизмов адаптации. Рассмотрены способы повышения адаптивных возможностей организма и профилактики вредных последствий стресса путем воздействия на медиаторные системы разной ергичности.

Для биохимиков, физиологов, патофизиологов и специалистов в области практической медицины, спорта, животноводства.