МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ И КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА БАЗАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ МОЗГА КРЫС В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

[1]Васильев Д.С., [2]Туманова Н.Л., [3]Белостоцкая Г.Б., [4]Попов А.А., [5]Журавин И.А

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, г.Санкт-Петербург

Проведен морфометрический и кластерный анализ структуры нервной ткани базальных ганглиев мозга в раннем постнатальном онтогенезе крыс после гипоксии на 13-й день эмбриогенеза. Кластерный анализ показал наличие четырёх размерных классов клеток в исследованной структуре мозга. Морфометрический анализ этих классов выявил уменьшение количества клеток и их суммарной площади, хотя средняя площадь клеток оставалась неизменной. Наиболее сильные дегенеративные изменения отмечались у самых крупных клеток.

Целью настоящей работы являлся морфометрический и кластерный анализ структуры нервной ткани базальных ганглиев мозга в раннем постнатальном онтогенезе нормально развивающихся крыс и крыс, перенесших гипоксию на 13-14е сутки эмбриогенеза. **Материал и методы.** На 13-14-й дни беременности группу самок крыс линии Вистар подвергали гипоксическому воздействию в специальной камере в течение трёх часов при концентрации O_2 – 7%. Другая группа самок (контроль) находилась в камере в течение трёх часов при нормальной концентрацией O_2. Исследования проводили на материале, полученном из мозга крысят на 5 и 10 сутки после рождения. Срезы мозга толщиной 30 мкм, изготовленные на замораживающем микротоме, окрашивали по методу Ниссля. Светооптическое исследование и ввод изображений срезов стриатума (на уровне AP=0, стереотаксические координаты по [1]) проводили на микроскопе NU-2 (Карл Цейс, Йена, Германия) с дополнительной микротеленасадкой МТН-413 (АОЗТ Альфа Телеком, СПб, Россия). Количественный анализ структуры ткани 38 срезов стриатума от 4 контрольных и 31 среза от 5 экспериментальных животных проводили с использованием программы по анализу изображений “ВидеоТест-Мастер-Морфология” (ООО “ВидеоТест”, СПб, Россия). Оценивали суммарную площадь и количество клеток в кадре размером 1300x1030 пикселей, что соответствует 0,264 мм^2 при увеличении объектива микроскопа x25. С помощью набора инструментов программы проводилось ручное оконтуривание клеток. Критерием выделения границ клетки являлось визуальное различие в оптической плотности (0.02 относительных единиц) между интенсивностями окраски цитоплазмы клетки и фона. Программа рассчитывала суммарную и индивидуальную площадь, количество и оптическую плотность оконтуренных клеток. Статистическую обработку данных проводили по стандартной программе Microsoft Excel 97. Для подтверждения достоверности различий массивов данных использовали t-критерий Стьюдента ($p<0,05$).

Кластерный анализ. Морфологические классификации клеток мозга, предложенные в литературных источниках, как правило, основаны на тонких деталях строения, незаметных на препаратах, окрашенных по Нисслю. Отсюда возникает необходимость классификации, основанной на более общих характеристиках клеток. Поскольку форма клеток мозга, в частности стриатума, крайне изменчива, в качестве универсальной меры величины клетки на двухмерных изображениях была выбрана площадь клеточного тела. Границы размерных классов, как правило, в той или иной степени искусственны, поэтому было необходимо найти метод разбиения, при котором субъективность проведения границ была бы минимальна. При помощи пакета статистических программ STATISTICA for Windows 5.1 (StatSoft.inc), был проведён кластерный анализ, а также анализ по методу К-средних площади 7442 клеток стриатума. При проведении кластерного анализа был использован

метод Варда [2], а в качестве меры расстояния между кластерами выбран квадрат евклидова расстояния. Результаты кластерного анализа показали наличие четырёх размерных классов площади клеток стриатума крыс (Таб. 1).

Таблица.1 Значения центров кластеров и количество клеток, попавших в кластер, при анализе площади клеток стриатума крысы по методу К-средних.

Номер Кластера	1	2	3	4
Средняя площадь клетки в кластере (мкм2)	20,47362	44,05999	67,92171	96,57784
Количество клеток в кластере	2000	2387	1984	1071

Дополнительно, анализ площади клеток по методу К-средних позволил найти оптимальные, статистически достоверные границы этих классов (кластеров). Причем кластеры 2 и 3 оказались ближе друг к другу, чем к кластерам 1 и 4 (Таб. 2).

Таблица 2. Матрица расстояний между кластерами. Эвклидовы расстояния располагаются под диагональю, квадраты эвклидовых расстояний над диагональю.

	Кластер No. 1	Кластер No. 2	Кластер No. 3	Кластер No. 4
Кластер No. 1	0	556,3169	2251,322	5791,853
Кластер No. 2	23,58637	0	569,382	2758,124
Кластер No. 3	47,4481	23,86173	0	821,1733
Кластер No. 4	76,10423	52,51785	28,65612	0

На основании результатов кластерного анализа и анализа площади клеток, попадающих в тот или иной кластер, были выделены мелкие (площадью менее 30 мкм^2, кластер 1), средние (от 30 до 45 мкм^2, кластер 2), крупные (от 45 до 60 мкм^2, кластер 3) и самые крупные (более 60 мкм^2, кластер 4) клетки. Большая часть клеток стриатума относится к средним (2 и 3 классы), в литературе неоднократно отмечалось, что в стриатуме наиболее многочисленны клетки средних размеров [3]. В 4 класс попадают самые крупные клетки, в том числе “гигантские” нейроны стриатума, однако последних немного, численность клеток 4 класса создаётся за счет более мелких нейронов. Ожидаемый хиатус между “гигантскими” нейронами и более мелкими клетками не был обнаружен.

При проведении кластерного анализа площади клеток было отмечено, что, в случае выделения размерных классов для выборок, соответствующих контрольным и экспериментальным животным разных возрастов, центры соответствующих кластеров не совпадают. Более того, количество клеток, отнесённых к соответствующим кластерам у контрольных и экспериментальных животных, а также у животных разных возрастных групп может довольно сильно варьировать (Таб. 3), хотя границы классов остаются неизменными.

Таблица 3. Суммарное количество клеток, попавших в соответствующий кластер, для каждой группы животных

	Контроль 5 сутки	Контроль 10 сутки	Гипоксия 5 сутки	Гипоксия 10 сутки	суммарно по всем группам
1кл	1033	1063	909	727	3732
2кл	1279	1058	1080	772	4189
3кл	1165	680	848	574	3267
4кл	710	260	492	286	1748

Мы предполагаем, что эти различия не случайны и они отражают структурные изменения ткани стриатума, обусловленные действием пренатальной гипоксии, а также возрастные изменения. Для подтверждения этого предположения мы провели морфометрический анализ клеток стриатума в зависимости от изменения экспериментальных условий.

Результаты морфометрического анализа. Морфометрический анализ показал как уменьшение общего количества клеток (рис.1), так и их суммарной площади (рис.2). Примечательно, что наиболее сильные дегенеративные изменения отмечались у самых крупных клеток (4 класс). Именно в этом классе происходило сильное уменьшение их количества и суммарной площади клеток, вызванное действием пренатальной гипоксии. Статистически значимых изменений средней площади клетки не было отмечено ни в одном из размерных классов. “Глиальная реакция”, столь характерная для нервной ткани коры, в стриатуме не наблюдалась. Дегенеративные изменения нервной ткани, вызванные действием гипоксии на 13-14 сутки эмбриогенеза, в стриатуме выражены в меньшей степени, чем в сенсомоторной коре [4, 5].

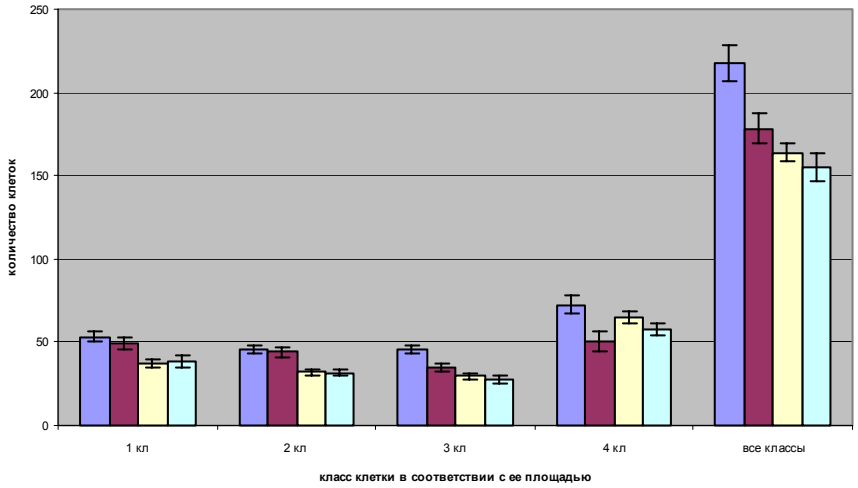

Рис.1. Общее количество клеток (на площади 264 мкм^2) стриатума мозга крыс в норме и после гипоксии (E13-14) в различные сроки онтогенеза (5-е сутки после рождения: синий столбик – контроль, коричневый – после гипоксии, 10-е: желтый – контроль, бирюзовый – после гипоксии).

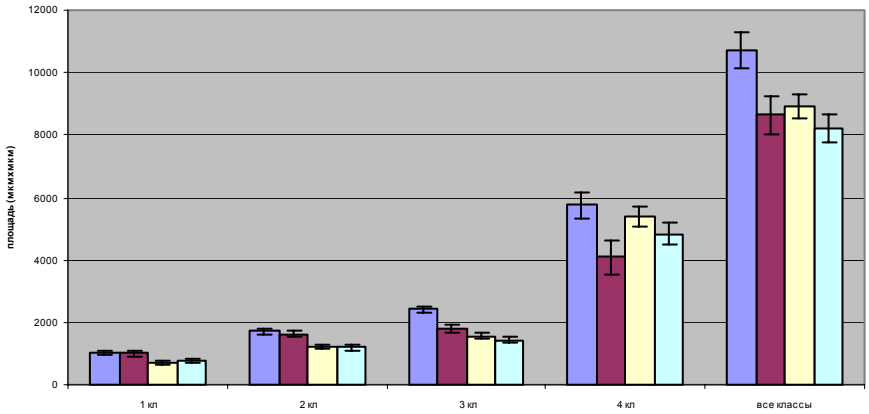

Рис.2. Суммарная площадь клеток стриатума мозга крыс, в норме и после пренатальной гипоксии (E13-14) в различные сроки онтогенеза (5, 10-е сутки после рождения). Остальные обозначения как на рис.1.

Работа поддержана грантами Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», РФФИ 02-04-49385, ФЦП «Интеграция» А0144.

Литература

1. *Fifkova E., Marsala J.* Stereotaxic atlases for the cat, rabbit and rat // in: Bures J., Petron, M., Zahar J. Electrophysiological methods in biological research. - Prague Academia - 1967.
2. *StatSoft, Inc. (1995). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, O.K.: StatSoft, Inc., WEB: http://www.statsoft.com.*
3. *Андреева Н.Г., Обухов Д.К.* Эволюционная морфология нервной системы позвоночных. С-Пб,: Изд. СПбГУ, 1991. 296 с.
4. *Журавин И.А., Дубровская Н.М., Туманова Н.Л.* Постнатальное физиологическое развитие у крыс после острой пренатальной гипоксии // Российский физиол. журнал им. И.М.Сеченова. 2003. Т. 89, № 5, с. 522-532.
5. *Журавин И.А., Туманова Н.Л., Дубровская Н.М., Федосеева К.Н.* Нарушение формирования старой и новой коры при изменении условий эмбрионального развития // Ж. эвол. биохим. физиол. 2003. Т.38. №6, с. 609-618.