

С. В. Емельянчик¹ и С. М. Зиматкин²

СТРУКТУРНЫЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В НЕЙРОНАХ ТЕМЕННОЙ КОРЫ МОЗГА КРЫС ПРИ ОТВЕДЕНИИ ЖЕЛЧИ

¹ Кафедра зоологии и физиологии человека и животных (зав. — д-р биол. наук Н. П. Канунникова), Гродненский государственный университет им. Я. Купалы; ² кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. С. М. Зиматкин), Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь, e-mail: zimatkin@grsmu.by

Целью исследования явилась оценка структурных и метаболических изменений в нейронах теменной коры мозга крыс при полном наружном отведении желчи. Использованы количественные гистологические, гистохимические и электронно-микроскопические методы исследования. Установлено, что отведение желчи из организма приводит к постепенному нарастанию числа гиперхромных, сморщенных нейронов и клеток-теней, гибели и уменьшению числа нейронов и возрастанию числа глиоцитов во всех слоях теменной коры. Наблюдаются постепенное уменьшение размеров, потеря сферичности (вытягивание) нейронов. При этом, в их цитоплазме происходит угнетение сукцинатдегидрогеназы, NADH- и NADPH-, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уменьшение содержания РНК, но активация лактатдегидрогеназы и кислой фосфатазы. Наблюдается деструкция ядра и органелл (митохондрий, эндоплазматической сети, комплекса Гольджи), что сопровождается увеличением числа и размеров лизосом и фагосом. В некоторых нейронах происходят активация ядерного аппарата и увеличение относительного содержания свободных рибосом. Таким образом, потеря желчи организмом вызывает прогрессивное нарастание структурных и метаболических изменений в нейронах теменной коры мозга, приводящих к гибели одних и компенсаторным изменениям в других.

Ключевые слова: головной мозг, теменная кора, нейроны, структура и метаболизм, потеря желчи

При завершении хирургического вмешательства на желчных путях, с целью создания декомпрессии часто производят их дренирование [6]. Это создает условия для наружного отведения и полной потери желчи организмом. Желчь — важный секрет печени, который стимулирует моторику кишечника, оказывает бактериостатическое действие на кишечную флору, участвует во многих обменных процессах [11]. В эксперименте при отведении желчи 50% крыс погибают уже через 4 сут [12]. При длительной потере желчи в организме больных развивается так называемая ахолическая болезнь, при которой страдает пищеварение, появляются кровоточивость, порозность костей, развивается авитаминоз А, В, D, Е, К, геморрагический диатез, нарушаются обмен кальция, кислотно-щелочное равновесие крови, деятельность печени и почек, а также нервной системы [2]. У собак наблюдали ослабление анализа и синтеза комплексных раздражителей, приводящее к снижению условно-рефлекторной деятельности [4]. При этом совершенно не изучены гистологические изменения в нервной системе, в частности состояние нейронов коры головного мозга. Поэтому цель настоящего исследования — выявление структурных и гистохимических изменений в нейронах теменной коры мозга у крыс в динамике полного наружного отведения желчи.

Материал и методы. Исследование проведено на 55 беспородных белых крысах-самках массой 200±25 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. В работе учтены «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) и получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета. Подопытным крысам накладывали фистулу общего желчного протока по методу Л. С. Василевской [3]; при этом желчь отводили в стеклянный желчеприёмник, подвешенный на боку. Животным контрольной группы проводили ложную операцию. Контрольных и подопытных животных через 1, 3 и 5 сут после операции (не менее 7 крыс на каждую временную точку) в утренние часы (для синхронизации по времени) декапитировали под эфирным наркозом, сразу же извлекали головной мозг, и кусочки теменной коры фиксировали в жидкости Карнуа (для заливки в парафин), замораживали и хранили в жидком азоте (для дальнейшего гистоэнзиматического исследования) или фиксировали в 1% растворе OsO₄ (для электронно-микроскопического исследования).

Парафиновые срезы толщиной 7–10 мкм окрашивали гематоксилином—эозином, 0,1% раствором толуидинового синего по методу Ниссля выявляли погибшие нейроны [16] и РНК по Эйнарсону. Криостатные срезы (криостат Leica CM 1840, Германия) образцов, хранящихся в жидком азоте, обрабатывали общепринятыми гистохимическими методами для выявления активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), NADH-дегидрогеназы (NADH-ДГ), NADPH-дегидрогеназы (NADPH-ДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и кислой фосфатазы (КФ) [10]). Для электронно-микроскопического исследо-

вания срезы изготавливали на ультрамикротоме MT-7000 (RMC, США), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, изучали и фотографировали при помощи электронного микроскопа JEM 100CX II (Jeol, Япония) в Центре электронной микроскопии Института физиологии НАН Беларуси. Идентификацию структур проводили согласно стереотаксическому атласу мозга крысы [14].

Изучение и микрофотографирование гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus с цифровой видеокамерой Axioscam MRc5 (Carl Zeiss, Германия). На препаратах, окрашенных по методу Ниссля, подсчитывали общее число нейронов в слоях II, III и V теменной коры на площади 1 мм² (и отдельно: нормохромных, гипохромных, гиперхромных несморщенных, гиперхромных сморщенных, клеток-теней; а также — количество глиоцитов).

Морфометрию и цитофотометрию проводили при помощи компьютерного анализатора изображения Bioscan NT 2.0 (Беларусь, США) при увеличении объектива микроскопа — 40 раз и видеокамеры — 7. Измеряли минимальный и максимальный диаметр, периметр, площадь, объем нейронов, определяли факторы формы и элонгации. В каждой экспериментальной группе оценивали 120–200 нейронов. Количественную оценку активности изучаемых ферментов проводили цитофотометрически в максимуме поглощения окрашенного продукта реакции. В каждой экспериментальной группе оценивали 150–200 нейронов. Электронную морфометрию проводили по методу И. А. Морозова [9].

Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 5.5 для Windows. Значимыми считали различия между контрольной и подопытной группами при значениях $P < 0,05$.

Результаты исследования. При отведении желчи из организма крыс структурные изменения в коре большого мозга на светооптическом уровне визуально начинают определяться только на 3-и сутки опыта в виде гиперхроматоза, сморщивания и гибели отдельных нейронов преимущественно в слое III. При потере желчи в течение 5 сут эти нарушения выявляются чаще и во всех слоях коры. В некоторых нейронах отмечены вакуолизация цитоплазмы, утолщение апикального дендрита, в гиперхромных, сморщенных и вытянутых нейронах он штопорообразно извивается (рис. 1). Погибшие нейроны встречаются рядом с практически неизмененными. Кроме того, среди нейронов в слоях III и V обнаружены клетки-тени, случаи сателлитоза и нейронофагии. При этом число нормохромных нейронов в слое III теменной коры уменьшается в 2,5 раза, в 4,4 раза возрастает количество гипохромных нейронов, гиперхромных не сморщенных — в 4,4 раза, гиперхромных сморщенных — в 11 раз и клеток-теней — в 10,2 раза. Общее число нейронов уменьшается на 21,7%, количество погибших нейронов возрастает в 37,7 раза, а число глиоцитов — на 38,8% (табл. 1). Аналогичные, но несколько менее выраженные изменения выявлены в нейронах слоёв коры II и V.

В динамике отведения желчи постепенно уменьшаются размеры нейронов всех слоёв теменной коры; при этом их тела удлинняются и теряют сферическую форму (рис. 2). Аналогичным обра-

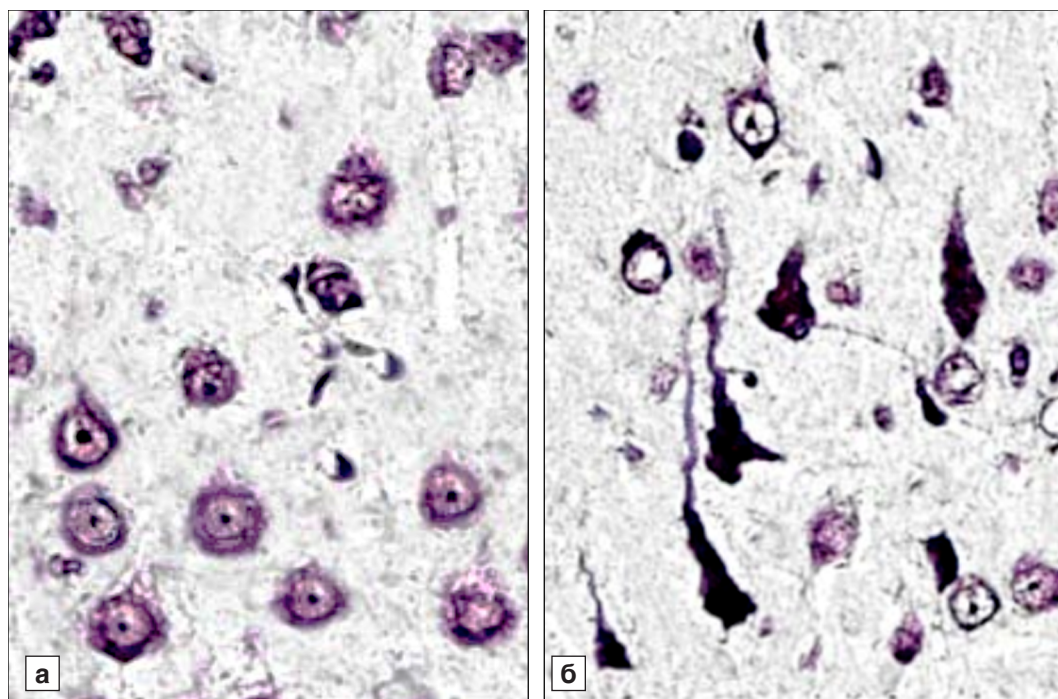


Рис. 1. Нейроны слоя III теменной коры большого мозга крысы.

а — контроль — 5 сут после ложной операции; б — 5 сут отведения желчи. Сморщенные и гиперхромные нейроны, апикальные отростки штопорообразно извиты. Окраска толудиновым синим по методу Ниссля. Ув. 400.

Таблица 1

Количество разных форм нейронов и глиоцитов в слое III теменной коры мозга крыс в контроле и на 5-е сутки от начала отведения желчи (Me±IQR)

Исследованные клетки	Контроль (n=5)	Опыт (n=5)
Нормохромные нейроны	648±34	256±66*
Гипохромные нейроны	13±6	57±4*
Гиперхромные не сморщенные нейроны	13±3	57±23*
Гиперхромные сморщенные нейроны	10±6	105±23*
Клетки-тени	6,40±0,0012	65±12*
Погибшие нейроны	1,60±0,03	60±8*
Все нейроны	690±46	540±40*
Глиоциты	395±46	549±56*

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: Me — медиана; IQR — интерквартильный размах.

* Различия значимы по сравнению с контролем при P<0,01.

зом меняются размеры и форма ядер изученных нейронов.

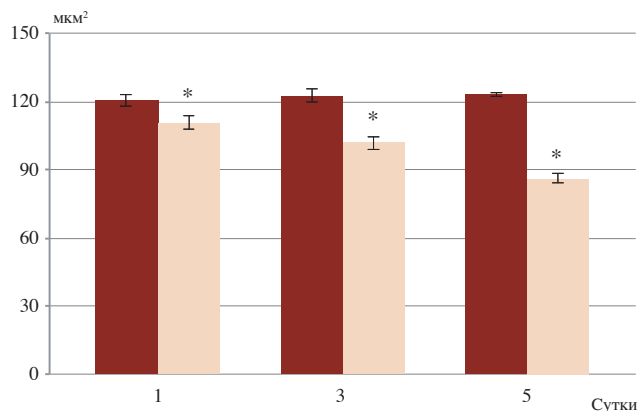
Отведение желчи из организма приводит к постепенному снижению в цитоплазме нейро-

Таблица 2

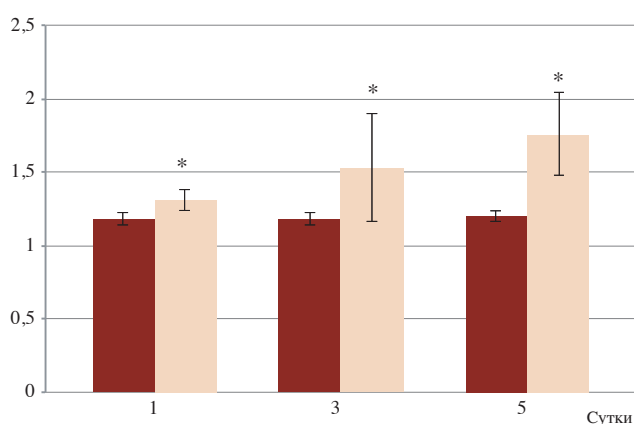
Активность ферментов и содержание РНК в перикарионах нейронов слоя III теменной коры мозга крыс в динамике потери желчи организмом (Me±IQR)

Исследованные вещества	Срок от начала опыта (сутки)	Контроль (n=7)	Опыт (n=7)
СДГ	1-е	427,6±1,3	428±5
	3-и	445±14	250±6***
	5-е	446±10	212±82**
NADH-ДГ	1-е	458±15	438±18*
	3-и	460±30	348±4**
	5-е	454±7	272±97**
Г-6-ФДГ	1-е	216±7	212±18
	3-и	218,2±2,3	150±22**
	5-е	217±7	129±11**
КФ	1-е	334±29	348±78**
	3-и	350±43	458±16**
	5-е	330±34	508±66**
ЛДГ	1-е	216,5±1,1	243±30
	3-и	246±15	342±51***
	5-е	244±5	428±45**
РНК	1-е	776±25	676±108
	3-и	759±4	491±81**
	5-е	765,5±1,2	466±49**

Примечание. Все цифровые значения представлены в единицах оптической плотности ×10³. Здесь и в табл. 3 различия по сравнению с контролем значимы: * при P<0,05; ** при P<0,01; *** при P<0,001.



а



б

Рис. 2. Изменение размеров и формы перикарионов нейронов в слое V теменной коры мозга крыс в динамике отведения желчи.

Темные столбики — контроль; светлые столбики — опыт. По осям абсцисс — срок от начала опыта (сут); по осям ординат: а — площадь тела нейрона (мкм²); б — фактор элонгации (усл. ед.); звездочки — различия по сравнению с контролем значимы при P<0,01; вертикальные отрезки — интерквартильный размах.

нов всех слоёв коры СДГ, NADH-ДГ, Г-6-ФДГ и содержания РНК, но возрастанию активности ЛДГ и КФ в цитоплазме тел нейронов слоя III теменной коры (табл. 2).

В нейронах всех слоёв теменной коры нарастают ультраструктурные нарушения. Появляются сморщенные, вытянутой формы нейроны с удлинёнными, подковообразными ядрами. Оболочка ядра многих нейронов образует глубокие складки, причем в некоторых участках она становится размытой и нечеткой, увеличивается число ядерных пор, через которые происходит усиленный выход гранул рибонуклеопротеинов в цитоплазму, перинуклеарное пространство местами расширено. При этом, ядрышки могут достигать больших размеров и находиться на периферии ядра, у его оболочки. В цитоплазме появляются набухшие митохондрии, иногда гантелевидной

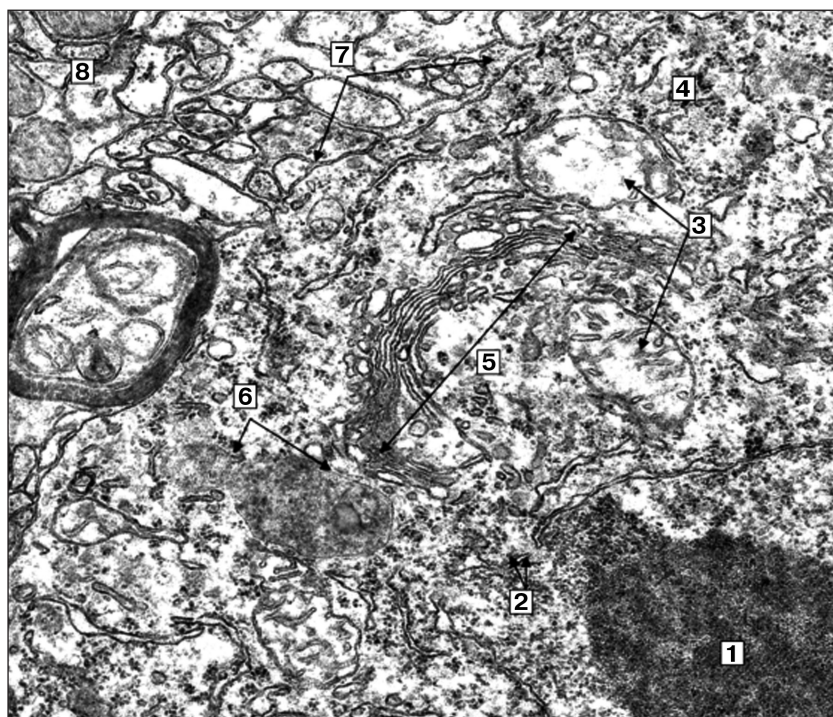


Рис. 3. Участок нейрона слоя V коры теменной доли мозга крысы после 5 сут отведения желчи.

1 — ядрышко; 2 — пора в оболочке ядра; 3 — митохондрии с разрушенными кристами; 4 — полирибосомы; 5 — расширенные цистерны комплекса Гольджи; 6 — фаголизосома; 7 — плазмолемма; 8 — нейропиль. Ув. 14 000.

Обсуждение полученных данных. При отведении желчи из организма крыс в теменной коре нами обнаружено появление значительного числа гиперхромных, сморщенных нейронов и клеток-теней. Эти нарушения являются тяжёлыми [7] и завершаются гибелью части нейронов, сателлитозом и нейронофагией, что количественно подтверждается уменьшением общего числа нейронов и возрастанием числа глиоцитов.

или сферической формы с разрушенными кристами. Местами митохондрии располагаются вблизи оболочки ядра, вдавливаясь в него; наблюдаются контакты митохондрий с комплексом Гольджи. Выявляются участки гранулярной эндоплазматической сети (ГЭС) с расширенными цистернами, лишенными рибосом, при этом увеличивается относительное количество свободных рибосом. Определяется гипертрофия комплекса Гольджи, иногда появляются слоистые тельца. Во многих нейронах отмечаются многочисленные фаголизосомы различных размеров и формы, а иногда и локальные участки дегенерации в виде скоплений бесструктурной массы и липофусциновые тела (рис. 3). Окружающие глиоциты реагируют на потерю желчи аналогично нейронам, однако их изменения выражены не так сильно.

Ультрамикроскопическая морфометрия выявила сходные нарушения в нейронах всех изученных слоёв. Например, в нейронах слоя III происходит значимое уменьшение площади поверхности мембран ГЭС — на 35,7%, а её цистерны расширяются на 22,4%. Общее число рибосом уменьшается на 31,6%, из них количество связанных форм снижается на 61,7%. Число митохондрий уменьшается на 16,3%, а их относительный объем увеличивается на 56,8%, коэффициент фрагментации крист возрастает на 41,5%. Площадь поверхности мембран комплекса Гольджи возрастает на 62,2%. Количество лизосом возрастает в 1,7 раза, а их средняя площадь увеличивается в 2,8 раза (табл. 3).

Обнаружено также существенное уменьшение размеров и вытягивание, потеря сферичности нейронов, вероятно, вследствие повышения осмоларности межклеточной жидкости [13]. Сжатие нейронов происходит через активизацию транспортных систем $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ и/или сопряженных с ними путей обмена Na^+/H^+ и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ [13, 15]. При этом в цитоплазме нейронов происходит угнетение системы транспорта электронов (NADH-ДГ и NADPH-ДГ), пентозофосфатного пути (Г-6-ФДГ), митохондриальных энергетических процессов (СДГ), но компенсаторная активация гликолиза (ЛДГ). Одновременно активность маркерного фермента лизосом, КФ значительно возрастает. Значительно снижается и содержание РНК в цитоплазме. Такая закономерность прослеживается во всех изученных нейронах коры.

Эти гистохимические изменения хорошо коррелируют с выявленными в нейронах нарушениями ультраструктуры: деструкцией митохондрий, ГЭС, уменьшением числа связанных рибосом и увеличением числа лизосом и фагосом. Последнее можно рассматривать как проявление усиленной аутофагии, направленной на удаление повреждённых мембран и органелл.

Наряду с деструктивными изменениями, в нейронах наблюдаются отчетливо выраженные адаптационные, компенсаторные процессы, особенно хорошо заметные на электронномикроскопическом уровне: увеличение складчатости оболочки ядра и числа ядерных пор, гипертрофия ядрышек, смещение их на периферию ядра и усиленный выход субъединиц рибосом в

Таблица 3

Ультраструктурные изменения нейронов слоя III теменной коры мозга крыс после 5 сут отведения желчи (Me±IQR)

Объект исследования	Показатель	Контроль	Опыт
Тело нейрона	Средняя площадь 1 клетки, мкм ²	100±5	89±5*
Гранулярная эндоплазматическая сеть	Площадь поверхности мембран, в 1 мкм ²	5,5±1,2	3,5±1,2*
	Степень расширения цистерн, усл. ед.	0,82±0,04	1,0±0,3**
Рибосомы	Общее количество в 1 мкм ² :	49±4	34±5**
	связанные	30,0±2,5	11,5±2,5**
	свободные	16±4	20±6
Агранулярная эндоплазматическая сеть	Площадь поверхности мембран, в 1 мкм ²	3,0±0,6	2,2±1,2
	Степень расширения цистерн, усл. ед.	1,0±0,17	1,5±1,0
Митохондрии	Количество, в 1 мкм ²	0,080±0,015	0,067±0,014*
	Площадь 1 органеллы, мкм ²	7,8±1,4	3,5±1,1**
	Степень набухания, усл. ед.	1,06±0,13	1,7±0,5**
	Площадь поверхности крист, усл. ед.	0,72±0,18	0,60±0,17
	Коэффициент фрагментации крист, усл. ед.	0,67±0,20	0,94±0,17*
Комплекс Гольджи	Площадь поверхности мембран, в 1 мкм ²	1,95±0,21	3,2±1,2**
	Степень расширения цистерн, усл. ед.	1,0±0,25	1,50±0,17
Лизосомы	Количество, в 1 мкм ²	3,5±1,0	6,0±2,0**
	Площадь 1 органеллы, в 1 мкм ²	2,6±1,0	7,1±1,9**

цитоплазму. Наблюдаемые в нейронах тесные контакты митохондрий с ядром и органеллами (особенно с комплексом Гольджи) трактуются как отражение повышенной потребности их в энергии в связи с усиленным функционированием [7]. Увеличение относительного числа свободных рибосом свидетельствует о переключении биосинтеза белка на собственные нужды клетки для восполнения утраченных структур.

При потере желчи организмом отмечается большое разнообразие ультраструктурных изменений в однотипных нейронах теменной коры мозга. При световой и электронной микроскопии можно условно выделить три степени изменения нейронов. I — когда нейроны визуально ничем не отличаются от таковых у интактных (контрольных) животных. II — нейроны с отчетливо выраженными изменениями: фрагментация ГЭС, разрушение крист митохондрий с просветлением матрикса, гипертрофия комплекса Гольджи, увеличение числа фаголизосом. III — нейроны с необратимыми, терминальными деструктивными изменениями: сморщенные нейроны, с разрушением ядра (кариорексис), тотальным повреждением органелл, появлением в цитоплазме участков дегенерации. В целом, через 5 сут отведения желчи из организма крыс количество неизмененных нейронов невелико, несколько больше — сильно измененных, а большинство — это нейроны со средней степенью нарушений. Это может быть обусловлено как разным исходным функциональным

состоянием нейронов, так и индивидуальными различиями в скорости деструктивных и репаративных процессов.

Одной из возможных причин повреждения мембран нейронов и структурных нарушений клеток является потеря холестерина, который поставляется из других органов в печень для синтеза биологически важных соединений — желчных кислот, теряющихся при отведении желчи [1]. Считают, что именно потеря холестерина является основной причиной дегенерации нейронов. Так, при удалении циклодекстраном холестерина из нейронов мозга (гиппокампа) *in vitro* происходили нейродегенеративные изменения нейрофиламентов в виде прерывистости и варикозных расширений [5]. Кроме того, при потере желчи организмом и, соответственно, непоступлении её в двенадцатиперстную кишку имеет место длительная афферентная импульсация с периферии, приводящая, в результате, к процессу центрального торможения [8]. Критическое количество измененных нейронов (неодинаковое в различных отделах мозга) и количество погибших нейронов могут вносить определённый вклад в реакцию всего организма на потерю желчи и, в частности, начало полиорганной недостаточности, приводящей к гибели животных на 6–7-е сутки опыта.

Таким образом, нейроны теменной коры мозга очень чувствительны к потере желчи организмом, но, вместе с тем, проявляют высокую пластичность. При этом, процессы репарации (внутри-

клеточной регенерации, восстановления) в нейронах идут параллельно с процессами деструкции. В целом, выявленные изменения в нейронах неспецифичны и отличаются от реактивных изменений при других патологических воздействиях лишь скоростью возникновения и относительной выраженностью составных компонентов этих изменений.

ЛИТЕРАТУРА

- Арчаков А. И. и Бородин Е. А. Холестерин биологических мембран и пути его выведения из организма. В кн.: Биомембраны. Структура. Функции. Мед. аспекты. Рига, Зинатне, 1981, с. 167–184.
- Брегадзе И. Л. и Иванов П. А. Наружные желчные свищи. М., Медицина, 1965.
- Василевская Л. С. Отделение липопротеинового комплекса с желчью у крыс. *Вопр. питания*, 1965, т. 24, № 3, с. 47–49.
- Ганиткевич Я. В. Влияние задержки и потерь желчи на аналитико-синтетическую деятельность коры головного мозга. *Журн. высш. нервн. деят.*, 1959, т. 9, № 5, с. 690–700.
- Кудинов А. Р., Кудинова Н. В. и Березов Т. Т. Холестерин — важнейшая молекула в процессах синаптической пластичности и дегенерации нейронов. *Вестн. РАМН*, 2006, № 9–10, с. 61–66.
- Кузин Н. М., Дадвани С. С., Ветшев П. С. и др. Лапароскопическая и традиционная холецистэктомия: сравнение непосредственных результатов. *Хирургия*, 2000, № 2, с. 25–27.
- Манина А. А. Ультраструктурные изменения и репаративные процессы в центральной нервной системе при различных воздействиях. Л., Медицина, 1971.
- Меркулова О. С. и Даринский Ю. А. Реакция нейронов на длительную стимуляцию. *Морфофизиологическое исследование*. Л., Наука, 1982.
- Морозов И. А. Топографические особенности ультраструктуры обкладочных клеток слизистой оболочки желудка (морфометрическое исследование). *Бюл. exper. биол.*, 1976, т. 82, № 11, с. 1390–1394.
- Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М., Изд-во иностр. лит-ры, 1962.
- Подымова С. Д. Болезни печени: Руководство для врачей. М., Медицина, 1998.
- Enderlin F. E. and Honohan T. Long term bile collection in the rat. *Lab. Anm. Sci.*, 1977, v. 27, № 4, p. 490–493.
- Lang F., Busch G. I. and Volke H. The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell. Physiol. Biochem.*, 1998, v. 8, p. 1–45.
- Paxinos G. and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London, Acad. Press, 2007.
- Strange K., Emma F. and Jackson P. S. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am. J. Physiol., Cell. Physiol.*, 1996, v. 270, p. C711–C730.
- Victorov I. V., Prass K. and Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. *Brain Res. Protoc.*, 2000, № 5, p. 135–139.

Поступила в редакцию 07.11.2011

Получена после доработки 09.02.2012

STRUCTURAL AND HISTOCHEMICAL CHANGES IN RAT PARIETAL CEREBRAL CORTEX NEURONS SUBJECTED TO BILIARY DRAINAGE

S. V. Yemelyanchik and S. M. Zimatkin

The aim of this study was the estimation of structural and metabolic changes in the rat parietal cortical neurons during complete external biliary removal. Quantitative histological, histochemical and electron microscopic methods were used. Biliary drainage was found to result in the progressive increase of the number of hyperchromic, shrunken neurons and ghost cells, cell death and the reduction of the number of neurons, with the increase of the glial cell number in all layers of parietal cortex. Gradual decrease of size, loss of sphericity and elongation of neurons were also recorded. In neuronal cytoplasm, the activity of succinate, NADH, NADPH and glucose-6-phosphate dehydrogenases, as well as RNA content were decreased, while lactate dehydrogenase and acid phosphatase activities were increased. Partial destruction of the nucleus and organelles (mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi complex) was also observed, accompanied by the increase in lysosomal number and size, activation of nuclear apparatus and the increase in relative amount of free ribosomes. Thus, the loss of bile by the organism lead to the progressive structural and metabolic disturbances in parietal cerebral cortex neurons, that resulted in the death of some of these cells and compensatory changes in the others.

Key words: *brain, neurons, structure and metabolism, biliary drainage*

Department of Zoology and Human and Animal Physiology, Grodno Ya. Kupala State University, Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, Belarus