

© С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин, 2013
УДК 611.817.1.018:612.357.6

С. В. Емельянчик и С. М. Зиматкин

СТРУКТУРНЫЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА КРЫС ПРИ ХОЛЕСТАЗЕ

Кафедра зоологии и физиологии человека и животных (зав. — канд. мед. наук С. В. Емельянчик), Гродненский государственный университет им. Янки Купалы; кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. С. М. Зиматкин), Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

Целью исследования явилась оценка структурных и метаболических изменений в клетках Пуркинье (КП) мозжечка крыс в динамике подпеченочного холестаза. Использованы гистологические, гистохимические и электронно-микроскопические методы. Установлено, что холестаз вызывает прогрессивное нарастание структурных и метаболических нарушений в КП мозжечка с максимумом на 10–20-е сутки, приводящих к гибели и уменьшению их числа. В цитоплазме этих нейронов происходит снижение активности дегидрогеназ: сукцината, NADH, глюкозо-6-фосфата и уменьшение содержания РНК, но активация лактатдегидрогеназы и кислой фосфатазы. Нарушения ультраструктуры клеток Пуркинье включали деструкцию ядра и органелл (особенно митохондрий), что сопровождалось увеличением количества и размеров лизосом и фагосом, увеличением относительного числа свободных рибосом, появлением тесных контактов митохондрий с ядром и органеллами. Через 45–90 сут у выживших животных происходила постепенная нормализация структуры и метаболизма КП мозжечка вследствие самопроизвольного устранения холестаза, по-видимому, в результате образования обходных желчевыводящих путей.

Ключевые слова: мозжечок, клетки Пуркинье, структура и метаболизм, холестаз

В последние десятилетия неуклонно растет число заболеваний желчевыведительной системы. Существенный вклад в эту патологию вносит желчнокаменная болезнь: от 10 до 15% людей в промышленно развитых странах, 20% европейцев и около 50% американских индейцев страдают этим заболеванием [8, 9]. Нарушение оттока желчи приводит к её застою в желчевыводящих путях (холестазу), прекращению её поступления в двенадцатиперстную кишку и накоплению компонентов желчи в крови. При этом происходит нарушение пищеварения и всасывания пищи в кишечнике (особенно жиров), уменьшается масса тела и усвоение жирорастворимых витаминов А, D, Е, К, а также кальция; в органах нарушаются процессы перекисного окисления липидов, изменяется текучесть мембран и активность Na^+/K^+ -АТФазы [6]. В условиях холестаза отмечаются функциональные и морфологические изменения во многих органах и системах организма, включая ЦНС [5, 11, 13]. Однако в литературе отсутствуют систематические и детальные морфологические работы по изучению структур мозга и, в частности мозжечка, в динамике подпеченочного холестаза. Поэтому целью настоящего исследования явилось установление структурных и гистохимических

изменений в клетках Пуркинье (КП) мозжечка крыс в динамике полного подпеченочного холестаза.

Материал и методы. В работе использован материал от 92 беспородных белых крыс-самцов массой 200 ± 25 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Все опыты проведены с учётом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). На проведение данных исследований получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета. Подопытным крысам под эфирным наркозом перевязывали общий жёлчный проток на 3–5 мм ниже слияния долевых протоков двумя лигатурами с последующим пересечением между ними. Животным контрольной группы проводили ложную операцию. Через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 сут в утренние часы (для синхронизации по времени) животных контрольной и подопытной групп декапитировали (на каждую временную точку приходилось не менее 4 особей). Извлекали головной мозг, и кусочки мозжечка фиксировали в жидкости Карнуа (для заливки в парафин), замораживали и хранили в жидком азоте (для дальнейшего гистоэнзиматического исследования) или фиксировали в 1% растворе OsO_4 (для электронно-микроскопического исследования).

Парафиновые срезы толщиной 5–10 мкм окрашивали гематоксилином—эозином, толуидиновым синим по методу Ниссля; по I. V. Victorov и соавт. [14] для выявления погибших нейронов и РНК — по Эйнарсону [4]. Криостатные срезы мозжечка толщиной 10 мкм (криостат Leica CM

Сведения об авторах:

Емельянчик Сергей Владимирович, кафедра зоологии и физиологии человека и животных, Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, Беларусь, 230023, Гродно, ул. Ожешко, 22

Зиматкин Сергей Михайлович (e-mail: zimatkin@grsmu.by), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь, 230015, Гродно, ул. Горького, 80

1840, Германия) обрабатывали общепринятыми гистохимическими методами для выявления активности ферментов: связанных с циклом Кребса — сукцинатдегидрогеназы (СДГ; КФ 1.3.99.1); с пентозофосфатным путем — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ; КФ 1.1.1.49); с транспортом электронов — NADH-дегидрогеназы (NADH-ДГ; КФ 1.6.99.3); с гликолизом — лактатдегидрогеназы (ЛДГ; КФ 1.1.1.27). Для выявления кислой фосфатазы — маркерного фермента лизосом (КФ; КФ 3.1.3.2) срезы предварительно фиксировали в 10% нейтральном формалине и обрабатывали по методу Гомори [4]. Для электронно-микроскопического исследования 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.

При помощи микроскопа «Axioscop» с цифровой видеокамерой «AxioCam MRc5» (Carl Zeiss, Германия) проводили визуальную оценку и микрофотографирование гистологических препаратов. В препаратах, окрашенных по методу Ниссля, на отрезках извилин коры мозжечка длиной 250 мкм подсчитывали число неизмененных и патологических форм КП (общее количество нейронов, среди них: нормохромных, гипохромных, гиперхромных не сморщенных, гиперхромных сморщенных, клеток-теней; а также — количество глиоцитов). На препаратах, окрашенных по методу I. V. Victorov и соавт. [14], подсчитывали количество погибших нейронов.

Морфометрию и цитофотометрию проводили с помощью программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). На препаратах, окрашенных по методу Ниссля, измеряли минимальный и максимальный радиус перикариона, периметр, площадь сечения, объем, определяли факторы и формы элонгации КП. Активность ферментов и содержание РНК оценивали цитофотометрически по оптической плотности осадка продуктов реакции с помощью системы компьютерного анализа изображения, состоящей из компьютера с программой анализа изображения («Bioscan NT» 2.0, Капасо Ltd, Беларусь), микроскопа и видеокамеры, в единицах оптической плотности, умноженной на 1000 (ед.). Измерения оптической плотности цитоплазмы нейронов проводили в максимуме поглощения окрашенного продукта реакции. В каждой группе оценивали 150–250 нейронов. Электронную морфометрию проводили по методике И. Я. Морозова [3]. Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 5.5 для Windows. В описательной статистике для каждого показателя определяли значение медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Различия между показателями в контрольной и подопытной группах считали значимыми при $P < 0,05$ по U-критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

Результаты исследования. Полный подпечёночный холестаз от 5 до 40 сут приводит к гибели 67% животных. Холестаз в течение 2 и 5 сут не вызывает видимых структурных изменений в мозжечке на светооптическом уровне. На 10-е сутки в КП определяются значительные структурные нарушения: деформация и увеличение ядер, эксцентричное расположение ядрышек. Апикальные отростки нейронов расширяются. В цитоплазме одних нейронов наблюдается хро-

толиз, что приводит к появлению гипохромных участков, других — гиперхроматоз. Встречаются одиночные и небольшие группы (очаги) сморщенных КП. При подсчете различных морфологических форм нейронов выявлено, что 10-суточный холестаз приводит к уменьшению числа нормохромных КП в 3 раза, число гиперхромных не сморщенных нейронов увеличивается в 3,8 раза. В значительном количестве появляются гиперхромные сморщенные, гипохромные нейроны и клетки-тени, которые в контроле не встречаются. Количество погибших нейронов, выявляемых по методу Викторова, возрастает в 9,6 раза, однако общее количество нейронов, выявляемых по Нисслию, существенно не меняется. При подсчете общего числа КП через 90 сут от начала опыта обнаружено уменьшение их числа на 14%.

При морфометрическом исследовании изменения размеров и формы перикарионов КП выявляются уже на 2-е сутки холестаза, к 5-м суткам они усиливаются, а на 10-е сутки — достигают максимума. Так, уменьшаются: большой радиус перикарионов — на 8,6%, малый — на 11,0%, периметр — на 9,7%, фактор формы — на 5,7%, площадь сечения — на 17,0% и объем — на 18,2%; при этом фактор элонгации возрастает на 3,9%. Это свидетельствует о некотором сморщивании и вытягивании нейронов. Ядра КП в целом претерпевают аналогичные изменения. В дальнейшем (45-е сутки) происходит нормализация изученных показателей, и к 90-м суткам статистически значимых изменений не обнаруживается.

Холестаз приводит к постепенному снижению в цитоплазме КП активности СДГ, NADH-ДГ, Г-6-ФДГ и содержания РНК, но возрастанию активности ЛДГ и КФ. Эти изменения достигают максимума на 10-е и 20-е сутки холестаза, а затем (на 45–90-е сутки опыта) у выживших животных постепенно исчезают (рис. 1).

Электронно-микроскопическое исследование КП на 10-е сутки холестаза выявило разнообразные деструктивные изменения. Ядра нейронов несколько вытянуты, ядерная оболочка имеет сильно извитой ход и образует многочисленные складки, местами она нечеткая, размыта. В этих участках наблюдается массовый выход субъединиц рибосом в цитоплазму. Размер ядрышка часто увеличен и расположение гранул в нем — компактное. Митохондрии набухшие, кристы частично или полностью разрушены, иногда встречаются гигантские митохондрии. Комплекс Гольджи гипертрофирован, его цистерны значительно увеличены, иногда образуют кольцевидные структуры (рис. 2). Выявляются многочисленные лизосомы, а также фаголизосомы, мультивезикулярные

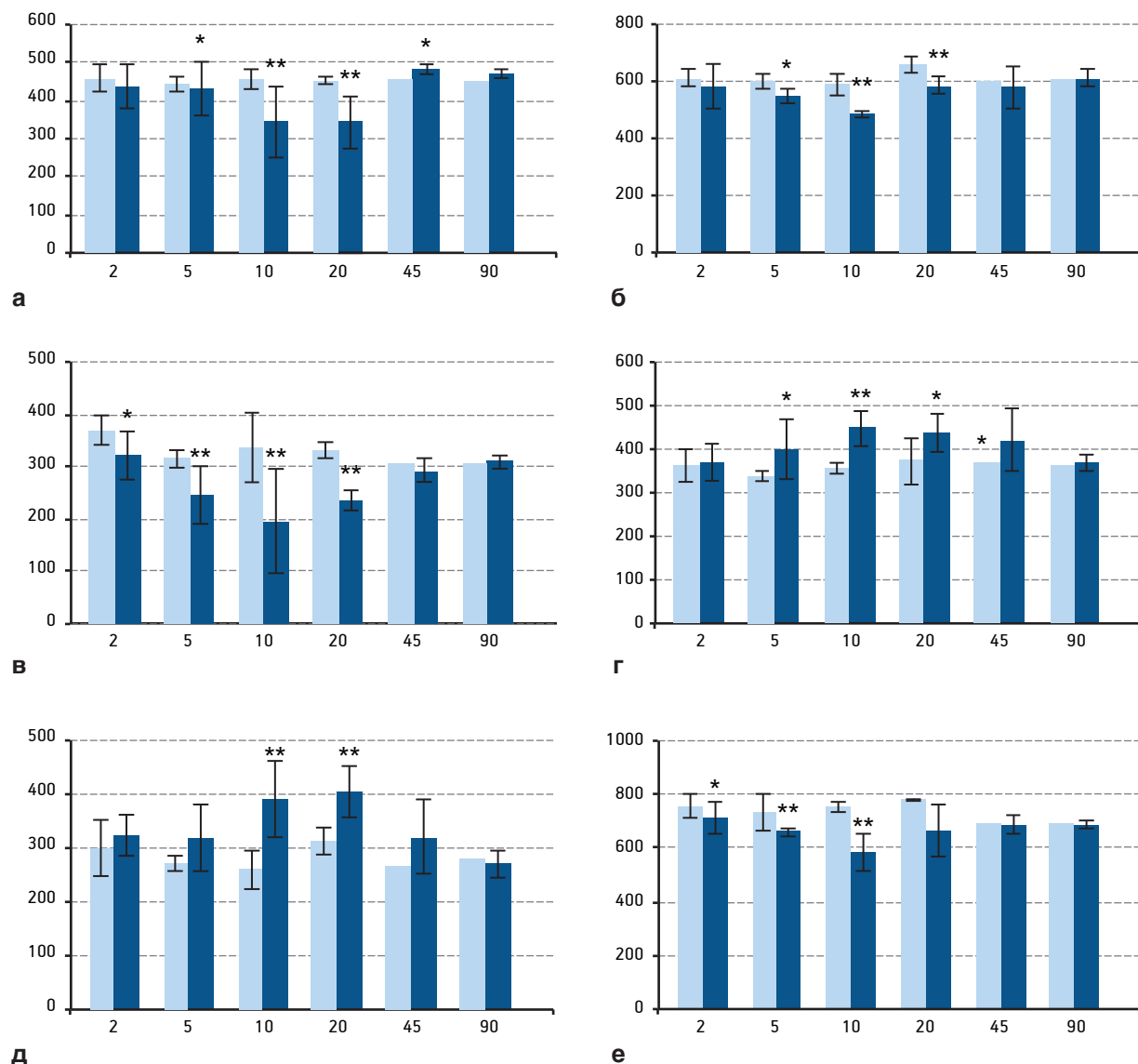


Рис. 1. Активность ферментов и содержания РНК в перикарионах клеток Пуркинье мозжечка у крыс в контроле (светлые столбики) и в динамике подпечёночного холестаза (темные столбики).

а — сукцинатдегидрогеназа; б — NADH-дегидрогеназа; в — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; г — кислая фосфатаза; д — лактат-дегидрогеназа; е — РНК. По оси абсцисс — продолжительность холестаза (сут); по оси ординат — исследованные показатели (ед. оптической плотности $\times 1000$); вертикальные отрезки — интерквартильный размах по результатам непараметрической статистики;

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с контролем

тельца. Гранулярная эндоплазматическая сеть теряет рибосомы, при этом возрастает количество свободных рибосом и полисом. Иногда встречаются сморщенные КП с сильно вытянутым ядром, в котором преобладает гетерохроматин.

Результаты морфометрии показали, что через 10 сут холестаза происходит уменьшение средней площади сечения КП на 23%, площади поверхности мембран гранулярной эндоплазматической сети — на 36%, ширина её цистерн увеличивается на 29%. Общее число рибосом уменьшается на 42%, из них количество связанных — снижается в 3,5 раза, а свободных — увеличивается на 33%. Площадь поверхности мембран гладкой эндоплазматической сети уменьшается на 53%.

Количество митохондрий уменьшается на 32%, их средняя площадь уменьшается на 44%, а степень набухания увеличивается на 29%, коэффициент фрагментации крист возрастает на 31%. Площадь поверхности мембран комплекса Гольджи возрастает в 2,3 раза, ширина его цистерн увеличивается на 60%. Количество лизосом возрастает в 2 раза, а их средняя площадь — в 3,8 раза (таблица).

Обсуждение полученных данных. После перевязки общего жёлчного протока у крыс развиваются закономерные структурные и метаболические нарушения КП мозжечка. Эти изменения имеют динамический, волнообразный характер: они появляются на 2–5-е сутки холе-

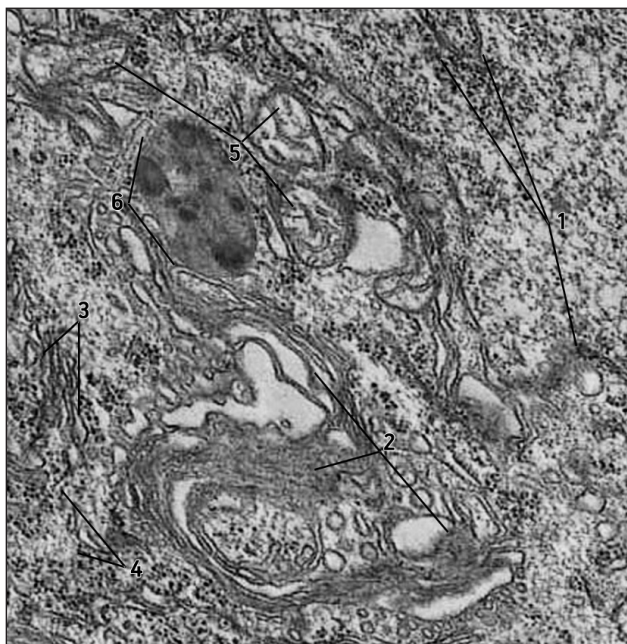


Рис. 2. Часть клетки Пуркинье мозжечка крысы после 10 сут холестаза.

1 — складки ядерной оболочки; 2 — гипертрофированный комплекс Гольджи; 3 — гранулярная эндоплазматическая сеть; 4 — свободные рибосомы; 5 — митохондрии с разрушенными кристами; 6 — фаголизосома. Ув. 14 500

стаза, через 10–20 сут достигают максимума (тяжёлые изменения [1] и массовая гибель нейронов), через 45 сут у выживших животных они постепенно уменьшаются, а через 90 сут сохраняются лишь некоторые остаточные изменения. При

этом размеры, форма нейронов и показатели их метаболизма полностью нормализуются. Такую динамику можно объяснить самопроизвольным разрешением холестаза в результате разрастания обходных желчевыводящих протоков и восстановления тока желчи в двенадцатиперстную кишку. Мы полагаем, что выживают только те экспериментальные животные, у которых успевает восстановиться отток желчи до развития полиорганной недостаточности и необратимых нарушений в организме. Изменения в нейронах мозжечка в отдалённые сроки после операции в настоящей работе описаны именно у них.

При холестазе происходит изменение размеров и формы КП: их сморщивание (уменьшение площади сечения и объема), потеря сферичности и вытягивание, что возможно связано с повышением осмолярности межклеточной жидкости [10, 12]. Это сопровождается угнетением активности ключевых цитоплазматических ферментов: системы транспорта электронов (NADH-ДГ), пентозофосфатного пути (Г-6-ФДГ), митохондриальных энергетических процессов (СДГ), но при этом имеет место компенсаторная активация гликолиза (ЛДГ). Активность маркерного фермента лизосом — КФ — значительно возрастает. Уменьшается количество РНК в цитоплазме. Такие гистохимические изменения хорошо согласуются с установленными в этих нейронах ультраструктурными нарушениями: деструкцией

Характеристика ультраструктуры клеток Пуркинье мозжечка крыс после 10 сут холестаза (Me±IQR)

Объект исследования	Показатель	Контроль (n=2)	Опыт (n=3)	P
Клетки Пуркинье	Средняя площадь сечения 1 клетки, мкм ²	202,5±12,5	156,5±19,0**	0,005
ГрЭС	Площадь поверхности мембран, на 1 мкм ²	4,04±0,24	2,58±0,34**	0,005
	Степень расширения цистерн, усл. ед.	1,0±0,06	1,29±0,30*	0,013
Рибосомы	Количество на 1 мкм ² :			
	связанных	99,5±5,5	58,0±5,0**	0,005
	свободных	70,0±2,5	20,0±5,0**	0,005
ГлЭС	Площадь поверхности мембран, на 1 мкм ²	30,0±3,0	40,0±10,0*	0,016
	Степень расширения цистерн, усл. ед.	2,96±0,377	1,39±0,33**	0,005
Митохондрии	Площадь поверхности мембран, на 1 мкм ²	1,08±0,25	1,50±0,50	0,157
	Степень расширения цистерн, усл. ед.	0,07±0,014	0,05±0,007*	0,011
	Количество на 1 мкм ²	5,73±0,590	3,226±0,492**	0,005
	Площадь 1 органеллы, мкм ²	1,083±0,038	1,40±0,20**	0,005
	Степень набухания, усл. ед.	0,78±0,081	0,86±0,50	0,322
Комплекс Гольджи	Площадь поверхности крист, усл. ед.	0,71±0,117	0,94±0,125*	0,013
	Коэффициент фрагментации крист, усл. ед.	1,43±0,330	3,23±0,977**	0,005
Лизосомы	Площадь поверхности мембран, на 1 мкм ²	1,0±0,16	1,60±0,39*	0,011
	Степень расширения цистерн, усл. ед.	4,50±1,50	9,0±0,0**	0,005
Лизосомы	Количество на 1 мкм ²	1,41±0,30	5,41±1,32**	0,005
	Площадь 1 органеллы, мкм ²			

* P<0,05; ** P<0,01 по сравнению с контролем.

Примечание. n — количество исследованных животных; ГрЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть (ЭС); ГлЭС — гладкая ЭС.

митохондрий, гранулярной эндоплазматической сети, уменьшением числа связанных рибосом, увеличением числа и размеров лизосом. Увеличение числа лизосом и фагосом может отражать усиление аутофагии повреждённых мембран и органелл в КП в условиях холестаза.

Следует отметить некоторую особенность строения ядерной оболочки КП мозжечка: нами не обнаружено увеличение числа и размеров ядерных пор, но в определенных местах ядерная оболочка имеет размытый вид или не определяется вовсе. Именно в таких участках видны скопления субъединения рибосом и их выход за пределы ядра, а также прилежащие гипертрофированные митохондрии. Усиленный выход субъединиц рибосом, как и увеличение числа свободных полирибосом в цитоплазме, свидетельствуют об усилении белкового синтеза для собственных нужд клеток и адаптационных процессов в нейронах на субклеточном уровне, что согласуется с мнением других исследователей [1].

Гипертрофия комплекса Гольджи, нарастание числа лизосом и фаголизосом в сочетании с увеличением числа свободных рибосом указывает на синхронизацию процессов повреждения и восстановления в КП. Подобные изменения в нейронах наблюдали и при других экспериментальных воздействиях [1, 2].

Таким образом, КП мозжечка очень чувствительны к холестазу, но имеют высокую пластичность. При этом процессы повреждения и восстановления идут параллельно. В целом, выявленные изменения в нейронах неспецифичны и отличаются от реактивных изменений при других патологических воздействиях только скоростью появления, степенью выраженности и последовательностью наблюдаемых структурных и метаболических изменений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Манина А. А. Ультраструктурные изменения и репаративные процессы в центральной нервной системе при различных воздействиях. Л., Медицина, 1971.
2. Манина А. А. Ультраструктура и цитохимия нервной системы. М., Медицина, 1978.
3. Морозов И. А. Топографические особенности ультраструктуры обкладочных клеток слизистой оболочки желудка (морфометрическое исследование). Бюл. exper. биол., 1976, т. 82, № 11, с. 1390–1394.
4. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М., Изд-во иностр. лит., 1962.
5. Чепур С. В. Морфофункциональная характеристика структур нервной системы в норме и закономерности их изменений при печёночной энцефалопатии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2003.

6. Шерлок Ш. и Дули. Дж. Заболевания печени и желчных путей. М., ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999.
7. Furukawa Y. Histological changes in the brain due to experimental obstructive jaundice. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 1991, v. 92, № 1, p. 37–45.
8. Konikoff F. M. Gallstones — approach to medical management. Med. Gen. Med., 2003, v. 5, № 4, p. 8.
9. Lammert F. and Sauerbruch T. Pathogenesis of gallstone formation. Falk Symposium 161 Future perspectives in gastroenterology. Dresden (Germany), Publisher Falk Foundation, 2007, p. 43.
10. Lang F., Busch G. L. and Volkl H. The diversity of volume regulatory mechanisms. Cell. Physiol. Biochem., 1998, v. 8, p. 1–45.
11. Rioux K. P., Le T. and Swain M. G. Decreased orexigenic response to neuropeptide Y in rats with obstructive cholestasis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol., 2001, v. 280, № 3, G449–456.
12. 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.
13. Swain M. G. and Maric M. Impaired stress and interleukin-1 β -induced hypothalamic expression of the neuronal activation marker FOS in cholestatic rats. Hepatology, 1996, v. 24, № 4, p. 914–918.
14. Victorov I. V., Prass K. and Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. Brain Res. Brain Res. Protoc., 2000, v. 5, № 5, p. 135–139.

Поступила в редакцию 29.09.2012

STRUCTURAL AND HISTOCHEMICAL CHANGES IN THE RAT CEREBELLUM PURKINJE CELLS AFTER CHOLESTASIS

S. V. Yemelyanchik and S. M. Zimatkin

The aim of the study was the estimation of structural and metabolic changes in the rat cerebellum Purkinje cells (PC) in the dynamics of subhepatic cholestasis. Histological, histochemical and electron microscopic methods were used. It was found that the cholestasis induced the progressive intensification of the structural and metabolic disturbances in the cerebellar PC reaching their maximum on days 10–20 and resulting in PC death and PC number reduction. In the cytoplasm of these cells the reduction of the activities of succinate dehydrogenase, NADH-diaphorase, glucose-6-dehydrogenase was recorded together with the decrease of RNA content and the activation of lactate dehydrogenase and acid phosphatase. The disturbances of PC at the ultrastructural level included the destruction of the nucleus and organelles (especially, of the mitochondria), associated with the increase of phagosome size and number, augmentation of relative free ribosome number, appearance of close contacts between mitochondria and cell nucleus and organelles. After 45–90 days in survived animals gradual normalization of PC structure and metabolism took place apparently as a result of spontaneous cholestasis elimination due to the development of new bile ducts.

Key words: *cerebellum, Purkinje cells, structure, metabolism, cholestasis*

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