УДК 612.36

И.В. Шишкин, С.А. Лобанов, З.Р. Хисматуллина

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ НА СТРУКТУРУ МОЗЖЕЧКА ПРИ ГИПОКСИИ**Ключевые слова:** *мозжечок; гипоксия; гликозаминогликаны; нейроны; межклеточный матрикс; митохондрии.*

Введение. Организм человека находится под постоянным воздействием разных факторов среды [1, 2, 3, 9, 11]. Все изменения в организме под действием этих факторов находятся под постоянным нейрогуморальным контролем, отвечающих за включение компенсаторно-адаптивных механизмов [4, 5]. Они способствуют перестройке деятельности всех клеток организма в зависимости от длительности и интенсивности действия факторов среды.

Одним из таких часто встречающихся факторов является гипоксия. При ее действии происходят изменения реактивности, гомеостаза клеток, тесно связанные с обменными процессами [1, 3, 6, 8, 11].

Гипоксия оказывает влияние на процессы биосинтеза в клетках, на обновление и восстановление целостности мембранных элементов клеток и состояние межклеточного матрикса. В мембранах клеток изменяется состав, содержание и соотношение белков и липидов, которые участвуют в их формировании. На поверхности клеточных мембран наблюдаются также изменения и в составе гликокаликса. Длительная гипоксия ведет к развитию патологических состояний или заболеваний. Происходящие перестройки в нервной системе сохраняются в течение длительного времени после прекращения действия негативного фактора. Функционирование клеток осуществляется в «необычных» для нее условиях и старается приблизиться к первоначальному состоянию. Одним из актуальных аспектов возвращения деятельности клеток близко к первоначальной является использование рациональных методов коррекции [2, 7, 10]. Эти подходы должны быть направлены на функционирование в пределах границ физиологической нормы не только клеток и тканей, но и всего организма.

Целью нашего исследования является выявление ультраструктурных особенно-

стей мозжечка крыс при гипоксии и при коррекции гликозаминогликанами.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились на крысах-самцах породы VISTAR, которые содержались в обычных условиях вивария в клетках по 7–8 особей. Животные в группе контроля и участвующие в эксперименте имели массу тела $215 \pm 10,5$ г.

Крысы, формирующие первую экспериментальную группу, в количестве 18 особей помещались в барокамеру для моделирования гипоксии при понижении атмосферного давления до 100 мм рт.ст. Эксперименты проводились в дневное время суток в течение 15 минут. Гипоксия осуществлялась однократно в течение 15 минут до полного «отключения» животного с последующим проведением реанимационных мероприятий. Наблюдения осуществлялись в течение 7 суток через фиксированные промежутки времени. Животных из эксперимента выводили через час, шесть часов, двенадцать часов, двадцать четыре часа, третьи сутки, седьмые сутки.

Во вторую экспериментальную группу вошли 20 крыс. Моделирование гипоксии проводилось по схеме первой экспериментальной группы. Крысам после выхода из гипоксии проводилась коррекция с помощью гликозаминогликанами путем введения внутривенно в виде 12,5 % раствора в объеме 0,7 мл.

Крысы, входившие в группу контроля (15 крыс) и эксперимента, находились в обычных условиях вивария с одинаковой температурой, влажностью, освещенностью. Все животные имели неограниченный доступ к воде и пище. (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009, Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 № 267).

Для электронной микроскопии забирались кусочки мозжечка размером 1×1 мм.

Их помещали в раствор 2,5 % глутарового альдегида на фосфатном буфере при pH 7,2–7,6 с последующей дофиксацией в 1 % растворе четырехокси осмия (OsO_4) в течение часа. Затем эти кусочки мозжечка переносили в спирт с концентрацией от 50 % до 100 % и чистый ацетон. Кусочки такни мозжечка после обезвоживания заливали смолой ЭПОН-812. Готовились полутонкие срезы на ультратоме LKB-III толщиной 0,1–0,5 микрон с последующим окрашиванием толуидиновым синим или метиленовой синью. Этот предварительный этап необходим для определения нужного участка и правильной его ориентации. Затем на ультратоме LKB-III изготавливали ультратонкие срезы толщиной около 700

ангстрем с последующим контрастированием уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Все срезы помещали на специальные сетки и проводили исследования на электронном микроскопе JEM-100S при ускоряющем напряжении 75 кВ или 90 кВ.

Результаты проведенных исследований подвергались статистической и графической обработкам в операционной системе Windows 7 с помощью пакета офисных приложений Microsoft Office 2013.

Результаты исследований. Ультраструктурные исследования с использованием электронной микроскопии позволяют выявить изменения, происходящие в клетках мозжечка и межклеточном матриксе (рисунок 1).

Рисунок 1

Нейрон мозжечка. Эксперимент – 1 час после гипоксии. Клетка Пуркинье.
Ядро – а, ядрышко осмиофильное – б, ядерные поры – в, митохондрии – г. ЭМФ $\times 45000$

Нейроны мозжечка имеют клеточную мембрану со слегка размытыми контурами. На некоторых участках клеточной мембраны выявляется нежный хлопьевидный материал. Ядра этих нейронов имеют неровные контуры, на их поверхности прослеживаются инвагинации, у части клеток ядра имеют овальную или бобовидную форму. Ядерная мембрана на некоторых участках имеет легкую разрыхленность и относительно меньшую осмиофильность. На ядерной мембране выявляются ядерные поры. В перенуклеарном пространстве располагается нежный хлопьевидный и мелко-

зернистый материал со слабой осмиофильностью.

Нуклеоплазма, находящаяся в ядре, представлена неоднородным составом. Хроматин, содержащийся в ней, неравномерно распределен и выявляется в виде групп или глыбок по периферии ядра. В основном гетерохроматин выявляется между ядерными порами. В некоторых нейронах ядерные мембраны содержат инвагинации разных размеров и глубины. Это является показателем их функциональной активности. В цитоплазме этих нейронов наблюдаются единичные первичные лизо-

сомы с высокой электронной плотностью. Эти лизосомы располагаются или около митохондрий, или рядом с комплексом Гольджи.

Комплекс Гольджи представлен всеми основными элементами, располагается около инвагинации ядра. В его просвете находится мелкозернистый и тонкофибриллярный материал низкой электронной плотности. Рядом располагаются везикулы, имеющие гладкостенную структуру и такую же электронную плотность.

Эндоплазматический ретикулум представлен в виде его гладких и шероховатых элементов. В просвете располагается нежный хлопьевидный и тонкофибриллярный материал средней электронной плотности. Фрагменты шероховатого эндоплазматического ретикулума на своих мембранах имеют неравномерное расположение рибосом. Рядом с этими структурами располагаются везикулы опушенные и гладкоконтурные разной электронной плотности.

Рибосомы в цитоплазме клетки представлены в виде полисом разных размеров. Часть рибосом фиксирована на мембранах эндоплазматического ретикулума.

Митохондрии в основном представлены округлыми или овальными формами. Их наружная мембрана имеет относительно четкие контуры. У большинства митохондрий в это период внутренняя мембрана имеет множество разрывов. У части митохондрий выявляются относительно четкие кристы. Митохондриальный матрикс у разных митохондрий имеет неравномерную осмиофильность. Встречаются митохондрии как крупные, так и мелкие. Митохондрии гетерогенны по строению, структуре, форме.

К концу шестого часа после действия гликозаминогликанов в условиях моделирования гипоксии в ткани мозжечка прослеживались явления изменений тинкториальных свойств клеток.

Данные электронно-микроскопических исследований показывают изменения со стороны кровеносных сосудов микроциркуляторного русла. Эндотелиальные клетки, выстилающие просвет сосудов капиллярного звена, имеют «набухший», «сочный» вид. В цитоплазме эндотелиоцитов

располагаются в большом количестве пиноцитозные пузырьки.

Морфометрический анализ позволил проследить существенные изменения в объеме внутриклеточных структур изучаемых нейронов (таблица 1, рисунок 2).

Электронно-микроскопически прослеживаются изменения в структуре клеточных элементов мозжечка. Мембрана нейронов мозжечка сохраняет легкую размытость, местами даже имеет нечеткие контуры. Ядро нейрона содержит ядерную мембрану с порами. Содержимое ядра имеет гетерогенный состав, гетерохроматин в большей степени располагается на периферии. В цитоплазме располагаются митохондрии. Мембраны имеют слегка размытые контуры. Многие митохондрии набухшие, с трудно различимыми кристами, в некоторых появляются деструктивные изменения (рисунок 3).

В цитоплазме исследуемых нейронов выявляются единичные лизосомы, имеющие разную электронную плотность.

Комплекс Гольджи сохраняет свои основные структурные элементы, около него возрастает содержание гладкоконтурных везикул с содержимым с низкой электронной плотностью. В просвете структурных элементов Комплекса Гольджи располагается нежный хлопьевидный материал.

Эндоплазматический ретикулум в этот период характеризуется относительно хорошей сохранностью своих структурных элементов. Встречаются участки плавного перехода шероховатого в гладкоконтурный эндоплазматический ретикулум. Рядом располагаются везикулы, различающиеся по размерам, форме, электронной плотности. Среди везикул в этот период преобладают гладкоконтурные формы.

Рибосомы располагаются в виде небольших полисом между элементами эндоплазматического ретикулума. Часть рибосом фиксируется на стенках эндоплазматического ретикулума и формирует его шероховатую часть.

В течение первых двенадцати часов в ткани мозжечка электронно-микроскопически определяются относительно четкие контуры клеточной мембраны нейронов, вокруг которых располагается неоднородный по составу и разной электронной плотности материал.

Таблица 1 Соотношение внутриклеточных структур нейронов мозжечка у крыс при коррекции (%)

Наименование	К	Часы / сутки					
		1 час	6 часов	12 часов	24 часа (1 сутки)	72 часа (3 суток)	168 часов (7 суток)
Митохондрии	10,6	7,5	9	9,5	10,7	11,9	13,4
Комплекс Гольджи	20,1	5,9	6,5	7,3	8,5	9,8	11,1
Эндоплазматический ретикулум	23,8	9,7	11,7	10,5	12,8	13,4	14,2

Рисунок 2
Соотношение внутриклеточных структур нейронов мозжечка у крыс при коррекции (%) Рисунок 3
Нейрон мозжечка. Эксперимент – 6 час после гипоксии.
Ядро – а, расширение перинуклеарных пространств – б, митохондрии – в, шероховатый эндоплазматический ретикулум – г, вакуолизация – д. ЭМФ × 35000

Более детальный анализ позволяет отметить, что этот материал представлен в виде мелких зерен, нежного хлопьевидного компонента или отдельных тонко фибрил-

лярных структур. В цитоплазме этих клеток в большом количестве выявляются везикулярные образования разной электронной плотности, структуры и размеров. Размеры

этих везикул, среди которых наблюдаются как гладкоконтурные, так и «опушенные», различаются приблизительно в полтора-три раза. В некоторых участках клеточной мембраны везикулы располагаются очень близко или даже контактируют с ней. В цитоплазме нейронов располагаются комплекс Гольджи и эндоплазматический ретикулум, рядом с ними выявляются везикулярные структуры, не однородные по составу и различающиеся по электронной плотности. Мембраны этих везикул имеют относительно четкий контур. В комплексе Гольджи располагается нежный хлопьевидный материал средней электронной плотности. В просвете эндоплазматического ретикулума выявляется неоднородный по составу мелкозернистый хлопьевидный или тонко фибриллярный материал. Мелкозернистый хлопьевидный материал в большей степени наблюдается в структурах гладкоконтурного эндоплазматического ретикулума. В участках шероховатого эндоплазматического ретикулума прослеживается содержание тонкофибриллярного материала с небольшим содержанием хлопьевидного.

Митохондрии располагаются в цитоплазме как по отдельности, так и в виде групп. Эти митохондрии различаются по размерам: от мелких до крупных, по форме: круглые, овальные, продолговатые, раз-

ветвленные, разной электронной плотностью. Среди них начинает увеличиваться количество мелких митохондрий с высокой электронной плотностью и трудно различимыми кристами.

Рибосомы в весьма большом количестве располагаются в цитоплазме, находятся в свободном виде или фиксированы на мембранах эндоплазматического ретикулума. Свободные рибосомы в большей степени объединены в группы разных размеров.

Ядра в нейронах, как правило, располагаются в центре. Они окружены ядерной мембраной, содержащей большое количество ядерных пор. В перинуклеарном пространстве выявляется неоднородный по составу мелкий или нежный хлопьевидный материал. В нуклеоплазме располагаются 1 или 2 ядрышка, гетерогенные по структуре и размерам, а также содержится гетерохроматин, в большей степени расположенный по периферии ядра.

Электронно-микроскопические исследования, проведенные нами в первые – третьи сутки после применения гликозаминогликанов на фоне моделирования гипоксии, показывают изменения в структуре клеток и окружающем межклеточном матриксе.

Электронно-микроскопически в эндотелиальных клетках капилляров сохраняются пиноцитозные пузырьки, однако их количество становится меньше.

Рисунок 4

Нейрон мозжечка. Эксперимент – 7 сутки после гипоксии. Лизосомы – а, участок дегенерации – б, эндоплазматический ретикулум – в, рибосомы – г. ЭМФ × 45000

Ядра эндотелиоцитов имеют вытянутую или овальную форму, сочные на вид, с явлениями легкого набухания.

В нейронах мозжечка, по данным ультраструктурного анализа, выявляются лизосомы. Они располагаются в разных отделах цитоплазмы в виде единичных структур. На некоторых участках вокруг этих лизосом наблюдается очаг деструкции в виде локального образования. Рядом располагаются элементы эндоплазматического ретикулума, в просвете которого содержится разный по характеру материал. В некоторых клетках лизосомы располагались около митохондрий, что приводило к изменению их структуры.

Расположение лизосом рядом с функционально-активными внутриклеточными структурами и появление локальных очагов деструкции в этих местах нами рассматривается как проявление декомпенсации.

К седьмым суткам эксперимента в нейронах мозжечка видны процессы пере-

стройки и формирования новых внутриклеточных структур. В этих клетках параллельно прослеживаются явления процессов аутолиза, что проявляется в виде гомогенизации отдельных участков цитоплазмы. В клетке возрастает количество лизосом разной электронной плотности (рисунок 4).

Выводы. Анализ электронно-микроскопических исследований позволяет отметить наличие в нейронах мозжечка фазных процессов, связанных с чередованием физиологической регенерации и деструктивных процессов. Эти изменения проявляются в виде включения компенсаторно-адаптивных механизмов и процессов дезадаптации. Введение гликозаминогликанов для коррекции изменений при гипоксии способствовало увеличению содержания хлопьевидного и мелкозернистого материала в просвете эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи. Внутренняя мембрана митохондрий приобретала относительно четкие контуры.

Библиографический список

1. Накусов, Т.Т. Влияние антиоксидантов на морфологическую структуру органов крыс при острой гипоксии [Текст] / Т.Т. Накусов, Т.Х. Шортанова, И.Я. Конь и др. // Вопросы питания. 2005. Т. 74. № 5. С. 22–24.
2. Семенов, Х.Х. Влияние острой гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей [Текст] / Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко, Е.Л. Матвеев, Г.Д. Капаназе // Биомедицина. 2012. № 3. С. 73–78.
3. Лобанов, С.А. Мозжечок и внешние факторы [Текст] / С.А. Лобанов, Т.Ф. Емельява, А.В. Данилов [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. 2006. № 1. С. 75–77.
4. Лукьянова, Л.Д. Сигнальная роль митохондрий при адаптации к гипоксии [Текст] / Л.Д. Лукьянова // Физиол. журн. 2013. Т. 59. № 6. С. 141–154.
5. Солкин, А.А. Основные механизмы формирования защиты головного мозга при адаптации к гипоксии [Текст] / А.А. Солкин, Н.Н. Белявский, В.И. Кузнецов, А.Г. Николаева // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2012. Т. 11. № 1. С. 6–14.
6. Отеллин, В.А. Отдаленные последствия воздействия гипоксии в перинатальный период развития на структурно-функциональные характеристики мозга крыс [Текст] / В.А. Отеллин, Л.И. Хожай, Л.А. Ватаева, Т.Т. Шишко // Российский физиологический журнал. 2011. № 10. С. 1092–1100.
7. Соколова, Н.А. Пренатальный гипоксический стресс: физиологические и биохимические последствия, коррекция регуляторными пептидами [Текст] / Н.А. Соколова, М.В. Маслова, А.С. Маклакова, И.П. Ашмарин // Успехи физиологических наук. 2002. Т. 33. № 2. С. 56–57.
8. Donkelaar, H.J. Development and developmental disorders of the human cerebellum [Text] / H.J. Donkelaar, M. Lammens, P. Wesseling [et al.] // J. Neurol. 2003. Vol. 250 (9). P. 1025–1036.
9. Kaur, C. Periventricular white matter damage in the hypoxic neonatal brain: role of microglial cells [Text] / C. Kaur, E.A. Ling // Prog. Neurobiol. 2009. Vol. 87. № 4. P. 264–280.
10. Rousset, C.I. Mitochondria and perinatal brain injury / C.I. Rousset, A.A. Baburamani, C. Thornton et al. // J. Matern. Fetal. Neonatal. Med. 2012. Suppl. 1. P. 35–38.

11. Thykadavil, V.G. Биохимические, морфологические и ультраструктурные изменения в мозге крыс под влиянием гипоксии [Текст] / V.G. Thykadavil, K. Rameshkumar, T. Venkatesh // Нур. Мед. Ж. 2002. Т. 10. № 1-2. Р. 1517.

ксии [Текст] / V.G. Thykadavil, K. Rameshkumar, T. Venkatesh // Нур. Мед. Ж. 2002. Т. 10. № 1-2. Р. 1517.

Сведения об авторах

1. **Шишкин Игорь Валерьевич**, аспирант первого года обучения кафедры охраны здоровья и БЖД, ФГБОУ ВО «БГПУ им. М. Акмуллы». 450000, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3-а. Тел.: 8-919-613-79-98, e-mail: shi86@bk.ru.

2. **Лобанов Сергей Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, кафедра охраны здоровья и БЖД, ФГБОУ ВО «БГПУ им. М. Акмуллы». 450000, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3-а. Тел.: 8-961-051-71-05, e-mail: lobanovprof@yandex.ru.

3. **Хисматуллина Зухра Рашидовна**, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии человека и зоологии, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет». 450076, Российская Федерация, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32. Тел.: 8-917-34-85-403, e-mail: hismatullinazr@mail.ru.

В работе приведены данные исследования изменений внутриклеточных структур нейронов мозжечка при действии гипоксии. Предложен оригинальный подход коррекции изменений, возникающих при гипоксии.

Прослежены особенности динамики внутриклеточных структур и выявлено влияние на них вводимых гликозаминогликанов.

I. Shishkin, S. Lobanov, Z. Hismatullina

GLYCOSAMINOGLYCAN EFFECT ON THE CEREBELLUM STRUCTURE AT HYPOXIA

Key words: *cerebellum; hypoxia; glycosaminoglycans; neurons; extracellular matrix; mitochondria.*

Authors' personal details

1. **Shishkin Igor**, first-year post-graduate student of the health protection and life safety chair. Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Pedagogical University named after M. Akmulla». 450000, Ufa, Otyabrskaya revolytsia St., 3-a. Phone: 8-919-613-79-98, e-mail: shi86@bk.ru.

2. **Lobanov Sergey**, Doctor medical sciences, professor the health protection and life safety chair. Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Pedagogical University named after M. Akmulla». 450000, Ufa, Otyabrskaya revolytsia St., 3-a. Phone: 8-961-051-71-05, e-mail: lobanovprof@yandex.ru.

3. **Hismatullina Zuhra**, Doctor of biological sciences, professor, head of the human physiology and zoology chair. Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State University». 450076, Ufa, Zaki Validy St., 32. Phone: 8-917-34-85-403, e-mail: hismatullinazr@mail.ru.

The paper presents data on investigation of changes in cerebellum neuron intracellular structure under hypoxia. There is an original approach to correct changes resulted from hypoxia.

Intracellular structure dynamics features are observed and effect of introduced glycosaminoglycans on them is defined.

© Шишкин И.В., Лобанов С.А., Хисматуллина З.Р.