УДК 612.36

С.А. Лобанов, Е.В. Насырова, А.А. Роженцев

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА КРЫС ПРИ ГИПОКСИИ

Ключевые слова: мозжечок; гипоксия; нейрон; ультраструктура; комплекс Гольджи; эндоплазматический ретикулум; митохондрии.

Введение. Состояние гипоксии в зависимости от длительности и характера проявления являются мощными факторами стресса [1, 3, 4, 7, 11]. В этих условиях в организме происходят структурно-функциональные изменения [2, 5, 6, 8, 9]. В клетках мозжечка нарастают анаэробные процессы, ведущие к нарушению процессов энергетического обмена [10, 13]. Гипоксия влияет на процессы физиологической регенерации в клетках [4, 5, 13]. Длительная гипоксия приводит к развитию дезадаптивных процессов [6, 12, 13].

Целью исследования является выявление ультраструктурных изменений нейронов мозжечка крыс при гипоксии.

Материал и методы исследования. Группу контроля составляли 15 крыс. В экспериментальную группу входило 18 крыс. Гипоксия моделировалась в барокамере при понижении атмосферного давления до 100 мм рт.ст. Все эксперименты проводились в дневное время суток. Гипоксия длилась 15 минут. Животные наблюдались в динамике в течение 7 суток и выводились из эксперимента через 1, 6, 12, 24, 72, 168 час. Все крысы (самцы) породы VISTAR были половозрелыми и имели массу тела $215 \pm 10,5$ г, находились в обычных условиях вивария с оди-

наковыми 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 г. № 267).

Ультраструктура мозжечка изучалась на электронном микроскопе JEM-100S при ускоряющем напряжении 90 кВ. Для этого брали материал размером 1×1 мм и помещали в раствор 2,5 % глутарового альдегида на фосфатном буфере при pH 7,2–7,6 с последующей дофиксацией в 1 % растворе четырехоксида осмия (OsO_4) в течение часа, обезжировали в спиртах от 50 % до 100 % и чистом ацетоне, заливали смолой ЭПОН-812. На ультратоме LKB-III готовились срезы толщиной 0,1–0,5 микрон и окрашивались толуидиновым синим, затем готовились ультратонкие срезы толщиной около 700 ангстрем, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу, помещали на специальные сетки. Проводили статистическую и графическую обработку полученных результатов с использованием операционной системы Windows 7 с помощью пакета офисных приложений Microsoft Office 2013.

Рисунок 1

Нейрон мозжечка. Гипоксия. Эксперимент – 1 час. Изменения КГ. Участки гипертрофии КГ – а и деструкции – б, пролиферация пузырьков – в. ЭМФ $\times 40000$

Результаты исследований. Экспериментальные данные, полученные при использовании электронной микроскопии, позволяют проследить структурные изменения клеточных элементов мозжечка, их внутриклеточных структур и межклеточного матрикса. Было выявлено, что нейроны зернистого слоя мозжечка имеют разные размеры и форму. Эти клетки характеризуются светлыми и темными формами, разной осмиофильностью, что как раз и говорит об их неодинаковой функциональной активности. В зернистом слое, по данным электронно-микроскопических исследований, в основном выявляются нейроны, имеющие полигональную форму. Эти клетки располагаются относительно плотно друг к другу. На их поверхности и отростках прослеживаются многочисленные цитоплазматические выросты и выявляются межклеточные контакты (рисунок 1).

Нейроны, расположенные в ганглиозном слое, представлены крупными клетками – клетками Пуркинье. Эти нейроны имеют разное осмиофильное окрашивание и представлены относительно светлыми и темными формами, характеризующими их функциональное состояние. Нейроны мозжечка, по данным ультраструктурных исследований, имеют относительно четкие контуры. Их клеточная мембрана и мембраны внутриклеточных структур в некоторых участках теряют четкость и приобретают легкую размытость. Более выраженные явления размытости наблюдаются среди внутриклеточных мембранных структур. Электронно-микроскопические данные позволяют проследить изменение четкости и нарушение контурности среди ультраструктурных элементов клетки. Нейроны мозжечка под действием гипоксии приобретают выраженный полиморфизм ядер. Это проявляется неодинаковым размером, особенностями контуров и разной осмиофильностью нуклеоплазмы, что показывает неоднородность функционального состояния. На электронограммах изучаемых нами нейронов в этот период прослеживается неодинаковая насыщенность их хроматина. В ходе исследований было выявлено, что ядра нейронов мозжечка по-разному взаимодействуют с солями тяжелых металлов. В этих условиях присутствуют нейроны, у которых наблюдаются ядра с плохо окрашенным, или расположенным по периферии нуклеоплазмы хроматином, или с равномерным его распределением.

Нейроны мозжечка в своей цитоплазме содержат ядра, имеющие инвагинации в нуклеолемме. Ядра этих клеток в своем составе имеют один или два ядрышка высокой осмиофильно-

сти по сравнению с нуклеоплазмой. Ядерная мембрана сохраняет свою двухконтурность. В некоторых участках выявляются зоны в виде расширений и сужений. В нуклеолемме выявляются нарушения целостности наружного листка ядерной оболочки. Ядерная мембрана на своей поверхности имеет участки с углублениями и выпячиваниями, придающими ей своеобразный вид.

В цитоплазме нейронов и клеток глии мозжечка выявляются лизосомы разной осмиофильности. Эти лизосомы располагаются рядом с митохондриями, что приводит к расплавлению их мембран в виде локального участка и нарушению целостности митохондриального матрикса. Среди митохондрий наблюдается увеличение количества имеющих средние размеры. В митохондриях возрастает количество крист, контуры которых не везде одинаковы. Среди митохондрий наблюдаются формы, теряющие двухконтурность, связанную с разрушением внутренней мембраны. Митохондрии в этот период различаются по размерам, интенсивности окрашивания матрикса. Они располагаются неравномерно в разных участках цитоплазмы. Эти энергообразующие структуры выявляются в околоядерной зоне, в местах инвагинации как по отдельности, так и группами. Кристы в этих митохондриях имеют параллельное расположение. Среди митохондрий встречаются формы овальные, округлые или неправильные.

Эндоплазматический ретикулум представлен умеренно-расширенными канальцами. В этот период встречаются участки, где гладкий эндоплазматический ретикулум плавно переходит в гранулярный. Фибриллярные структуры наблюдаются в виде небольших групп. Рядом с ними располагаются отдельные микротрубочки.

При действии гипоксии изменяется реакция внутриклеточных элементов нейронов и клеток глии. Эти изменения выявляются при проведении морфометрических исследований клеточных элементов мозжечка (таблица 1). Результаты, полученные в ходе морфометрического исследования, позволяют отметить существенные изменения среди митохондрий. Они различаются по форме, объему, составу митохондриального матрикса и состоянию внутренней мембраны. Гипоксия влияет на функциональное перенапряжение митохондрий, как энергообразующих структур, что проявляется просветлением митохондриального матрикса, нечеткостью структуры ее внутренней мембраны. Электронно-микроскопически выявляется, что явление набухания среди клеток глии слабо выражено по сравнению с рядом расположенными

нейронами. Эти нейроны имеют овальную или продолговатую форму и увеличенный объем по сравнению с объемом на более ранних сроках эксперимента (рисунок 2). На электронных микрофотографиях выявляются нейроны, имеющие ядра с достаточно хорошей осмиофильностью.

В ядрах некоторых клеток прослеживаются ядрышки интенсивно окрашенные, по сравнению с нуклеоплазмой, т. е. с высокой осмиофильностью. Нуклеоплазма содержит гетерохроматин, представленный в виде глыбок, расположенных по периферии ядра.

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

Наименование	К	Часы / сутки					
		1 час	6 часов	12 часов	24 часа (1 сутки)	72 часа (3 суток)	168 часов (7 суток)
Митохондрии	13,4	16,8	14,6	12,9	11,8	10,4	9,1
Комплекс Гольджи	19,3	25,1	29,4	23,8	20,1	18,9	16,8
Эндоплазматический ретикулум	24,1	28,9	32,5	29,1	24,2	21,1	19,6

Ядерные поры раскрыты. В перинуклиарном пространстве выявляется нежный, мелкозерни-

стый и тонко фибриллярный материал неодинаковой электронной плотности.

Рисунок 2

Нейрон мозжечка. Активность внутриклеточных элементов. Эксперимент – 12 часов. Проплиферация комплекса Гольджи – а, увеличение окаймленных пузырьков – б, набухание и деструкция митохондрий – в. ЭМФ × 45000

В этих клетках хорошо выражены внутриклеточные мембранные структуры. Четкие контуры имеют такие цитоплазматические элементы, как комплекс Гольджи, эндоплазматический ретикулум, митохондрии. В просвете комплекса Гольджи и эндоплазматического ретикулума располагается мелкозернистый и тонкофибриллярный материал. Митохондрии в этот период имеют достаточно крупные размеры и разрушенную внутреннюю мембрану, которая представлена в виде фрагментов. Ядерная мембрана имеет большое количество инвагинаций в виде углублений и выпячиваний. Среди нейронов мозжечка преобладают в этот период клетки, имеющие ядра овальной или бобовидной формы. К концу первых суток после моделирования экспериментальной гипоксии уль-

траструктурно в эндотелиальных клетках наблюдается большое содержание пиноцитозных пузырьков. Цитоплазматический матрикс этих клеток имеет более светлый характер и низкую осмиофильность. Кровеносные капилляры имеют неравномерный просвет. Внутри их располагаются форменные элементы крови, имеющие деформированный вид.

Электронно-микроскопические исследования позволяют проследить морфофункциональные изменения нейронов и клеток глии. Гипоксия, действующая на ткань мозжечка, способствует активации компенсаторно-адаптивных процессов. Они проявляются образованием большого количества везикул, расположенных рядом с комплексом Гольджи. Внутри этих структур выявляется осмиофильный материал,

имеющий вид мелких зерен или хлопьев. Комплекс Гольджи относительно гипертрофирован и представлен основными элементами, участвующими в его формировании.

Гранулярный эндоплазматический ретикулум выявляется в виде фрагментов, имеющих продолговатую или овальную форму с большим расположением на его мембране фиксированных рибосом. Канальцы гранулярного эндоплазматического ретикула имеют более высокую электронную плотность по сравнению с окружающим эндоплазматическим матриксом, рядом располагаются опущенные везикулы высокой электронной плотности. В цитоплазме как нейронов, так и клеток глии в большом количестве выявляются рибосомы, располагающиеся и по отдельности, и в виде групп (полисом) разных размеров. Рибосомы располагаются либо свободно в цитоплазме, либо фиксированно на мембранах эндоплазматического ретикула. В клетках Пуркиньи в этот период выявляются фрагменты гранулярного и агранулярного эндоплазматического ретикула. В некоторых участках прослеживается переход канальцев эндоплазматического ретикула – гранулярного в агранулярный или наоборот. В просвете этих канальцев располагается мелкозернистый материал повышенной электронной плотности. Гиалоплазма нейронов имеет более интенсивное окрашивание по сравнению с нуклеоплазмой. Эти явления преобладают также в клетках глии. В клетках мозжечка, представленных нейронами и глией, выявляются везикулы, расположенные в их цитоплазме и представленные как гладкоконтурными, так и окаймленными формами. Эти везикулы были неоднородны по составу, размеру и форме.

Митохондрии в этот период имели удлиненную форму и неодинаковую протяженность. Матрикс этих энергообразующих структур имел высокую электронную плотность, внутренняя мембрана – четкий контур с хорошо выраженными кристами, митохондрии располагались в цитоплазме этих клеток неравномерно в виде групп у основания отростков, в зоне шипикового аппарата. Часть митохондрий встречается около канальцев эндоплазматического ретикула, как гранулярного, так и агранулярного. Микротрубочки и микрофиламенты в нейронах выявляются в небольшом количестве, в основном они наблюдаются в отростках и на периферии клеток. В этот период в цитоплазме клеток наблюдаются единичные лизосомы, которые в основном встречаются около комплекса Гольджи. Клетки глии, представленные астроци-

тами, имеют в своем ядре гетерохроматин в виде глыбок.

Результаты морфологических исследований в первые-третьи сутки показывают изменение активности клеток зерен, которые в этот период выявляются между клетками Пуркиньи, а в единичных случаях даже в молекулярном слое. Нейроны, формирующие ганглиозный слой, имеют неоднородное окрашивание и приобретают мозаичный вид.

Сосуды микроциркуляторного русла бурно реагируют на явление гипоксии процессами гиперемии, медленным током крови и явлениями дилатации со стороны их сосудистой стенки. Эндотелиальные клетки, выстилающие просвет капилляров, располагаются на базальной мембране, имеющей фестончатый вид. В цитоплазме этих эндотелиоцитов наблюдается содержание достаточно большого количества пиноцитозных пузырьков.

В условиях действия гипоксии происходит перестройка функциональных возможностей всех клеточных элементов мозжечка. При этом включаются как компенсаторные, так и адаптивные механизмы, способствующие деятельности клеток в новых измененных условиях. Электронно-микроскопические исследования показывают, что даже на фоне действия такого стрессового и экстремального фактора, как гипоксия, мозжечок, как высокоорганизованная, специализированная структура, включает комплекс защитных механизмов, направленных на сохранение ее специализированных функций.

Нейроны и клетки глии мозжечка к 7 суткам эксперимента сохраняют свои морфофункциональные особенности. Мембраны этих клеток имеют четкие контуры, тесно взаимосвязаны между собой. В большинстве случаев выявляются межклеточные контакты в виде синапсов. Среди этих клеток практически не встречаются явления отека.

В цитоплазме клеток как нейронов, так и глии прослеживается уменьшение содержания тигроидного вещества. Это проявляется в снижении осмиофильности эндоплазматического ретикула, комплекса Гольджи, различных везикул. В цитоплазме уменьшается содержание цитогранул, которые приобретают относительно слабое окрашивание. Ядра клеток содержат гетерохроматин, который довольно равномерно распределен в нуклеоплазме. Ядерная мембрана хорошо контурируется, в ней наблюдаются ядерные поры. Ядро содержит инвагинации и выпячивания, имеет чаще овальную или бобовидную форму. Рядом с ядрами располага-

ются элементы комплекса Гольджи, содержащие большое количество пузырьков разной электронной плотности. В цитоплазме нейронов около эндоплазматического ретикулума располагаются митохондрии и лизосомы. Лизосомы имеют первичный и вторичный характер.

В клетках-зернах и клетках Пуркинье присутствуют лизосомы, различающиеся по величине, форме и характеру их матрикса. Количество этих структурных элементов в клетках существенно варьирует. Среди этих лизосом встречаются структуры типа аутофагических вакуолей, внутри которых содержатся фрагменты митохондриальных крист и миелоноподобные фигуры. Лизосомы располагаются в разных участках цитоплазмы, могут находиться около митохондрий, комплекса Гольджи и т. д. В этих участках наблюдается явление снижения осмиофильности. В цитоплазме нейронов выявляются нейрофибриллы в виде тонких протофибрилл. Среди них наблюдаются участки гомогенизации. Митохондрии, находящиеся в цитоплазме нейронов, различаются по форме, величине и состоянию матрикса. Среди этих митохондрий сохраняются формы с умеренным набуханием матрикса, что проявляется размытостью контуров и снижением окрашивания. Для нейронов мозжечка характерно увеличение содержания крупных, разветвленных митохондрий. Эти изменения в нейронах мозжечка встречались практически у 22 % крыс. Вокруг клеток Пуркинье

располагались клетки глии, клетки-зерна и корзинчатые клетки.

Вывод. Анализ электронно-микроскопических исследований позволяет отметить морфологические и функциональные изменения в нейронах мозжечка. Эти изменения проявляются в виде структурных перестроек внутриклеточных элементов. Прослеживается активация белоксинтезирующих структур, энергообразующих элементов. Проведенные исследования позволяют отметить морфофункциональные особенности мозжечка крыс, выявляемые при действии гипоксии, в ранние сроки характеризуются изменениями, которые проявляются в достоверном увеличении объема внутриклеточных структур (митохондрии – на 13,4 %, комплекс Гольджи – на 19,3 %, эндоплазматический ретикулум – 24,1 %, $p < 0,05$). Длительная гипоксия (7 суток) приводила к уменьшению объема внутриклеточных структур (митохондрии – на 9,1 %, комплекс Гольджи – на 16,8 %, эндоплазматический ретикулум – на 19,6 %, $p < 0,05$). В ранние сроки в нейронах мозжечка прослеживаются явления физиологической регенерации, рассматриваемой нами как компенсаторный процесс. В дальнейшем происходит нарастание изменений, которые ведут к формированию пограничных состояний, переходящих в деструктивные изменения. Все эти компенсаторно-приспособительные процессы носили фазный характер.

Библиографический список

1. Гундарова, О.П. Возрастная структурно-функциональная перестройка коры мозжечка лабораторных крыс [Текст] / О.П. Гундарова, Н.В. Маслов // Журнал анатомии и гистопатологии. 2013. Т. 2. № 3 (7). С. 32–36.
2. Гусев, Д.В. Морфометрическая характеристика мозжечка и его отделов в раннем плодовом периоде онтогенеза человека [Текст] / Д.В. Гусев // Вестник новых медицинских технологий. 2013. Т. 20. № 2. С. 44–47.
3. Лобанов, С.А. Мозжечок и стресс (экспериментальное исследование) [Текст]: монография / С.А. Лобанов, Т.Ф. Емелева. Уфа: Вагант, 2005. 112 с.
4. Лобанов, С.А. Мозжечок и внешние факторы [Текст] / С.А. Лобанов, Т.Ф. Емелёва, А.В. Данилов [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. 2006. № 1. С. 75–77.
5. Основные механизмы формирования защиты головного мозга при адаптации к гипоксии [Текст] / А.А. Солкин, Н.Н. Белявский, В.И. Кузнецов, А.Г. Николаева // Вестник Ви-

тебского государственного медицинского университета. 2012. Т. 11, № 1. С. 6–14.

6. 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. Sazontova T.G., Bolotova A.V., Bedareva I.V. et al. Adaptation to intermittent hypoxia/hyperoxia enhances efficiency of exercise training [Text]. Intermittent Hypoxia and Human Diseases. Springer, UK. 2012. Chapter 16. P. 191–205.

8. Armstrong C., Hawkes R. Pattern formation in the cerebellum [Text]: colloquium series on the developing brain, lecture 11. Series editor M. McCaughy. Morgan and Claypool life sciences. 2014. P. 85.

9. Barmack N.H., Yakhnitsa V. Functions of interneurons in mouse cerebellum [Text]. Neurosci. 2008. Vol. 28 (5). P. 1140–1152.

10. Kim J., Sekerkova G., Mugnaini E. [et al.] Electrophysiological, morphological, and topological properties of two histochemically distinct subpopulations of cerebellar unipolar brush cells [Text]. *Cerebellum*. 2012. Vol. 11 (4). P. 1012–1025.

11. Ramezani A., Goudarzi I. Tagh Role of Oxidative Stress in Ethanol-induced Neurotoxicity in the Developing Cerebellum [Text]. *Basic Med. Sci.* 2012. Vol. 15 (4). P. 965–974.

12. Rasser P.E., Wilson L.B., Schall U. [et al.] Cerebellar grey matter deficits in first-episode schizophrenia mapped using cortical pattern matching [Text]. *Neuroimage*. 2010. Vol. 53 (4). P. 1175–1180.

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

Сведения об авторах

1. **Лобанов Сергей Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, кафедра охраны здоровья и БЖД, ФГБОУ ВО «БГПУ им. М. Акмуллы», 450008, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3А, e-mail: lobanovprof@yandex.ru.

2. **Насырова Елена Валерьевна**, аспирант первого года обучения кафедры физиологии человека и зоологии, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», 450076, Российская Федерация, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32, e-mail: enasyrova2014@yandex.ru.

3. **Роженцев Алексей Алексеевич**, аспирант первого года обучения кафедры охраны здоровья и БЖД, ФГБОУ ВО «БГПУ им. М. Акмуллы», 450008, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3А, e-mail: leha-handboll@mail.ru.

Приведены результаты экспериментальных исследований ультраструктурных особенностей клеток мозжечка при гипоксии. Выявлены выраженные изменения в энергообразующих струк-

турах и синтезирующем аппарате клеток. Приведены данные ультраструктурных и морфометрических исследований внутриклеточных структур и показана их динамика.

S. Lobanov, E. Nasyrova, A. Rozhentsev.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF NEURONS OF THE RAT BRAIN IN HYPOXIA

Key words: *cerebellum; hypoxia; neuron; ultrastructure; Golgi complex; endoplasmic reticulum; mitochondria.*

Authors' personal details

1. **Lobanov Sergey**, Doctor of medical sciences, professor of the Health protections and Life Safety chair, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Pedagogical University named after M. Aknulla», 450008, Ufa, Oktiabrskoi revoliutsii st., 3A, e-mail: lobanovprof@yandex.ru.

2. **Nasyrova Elena**, first-year Post-graduate student of the Human Physiology and Zoology chair, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State University», 450076, Ufa, Zaki Validi st., 32, e-mail: enasyrova2014@yandex.ru.

3. **Rozhentsev Alexey**, first-year Post-graduate student of the Health protections and Life Safety chair, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Pedagogical University named after M. Aknulla», 450008, Ufa, Oktiabrskoi revoliutsii st., 3A, e-mail: leha-handboll@mail.ru.

The given paper provides the results of experimental studies of ultrastructural features of cerebellum cells during hypoxia. There are changes in energy-producing structures and the cells synthesizing

apparatus. The data of ultrastructural and morphometric studies of intracellular structures are given and their dynamics is shown.

© Лобанов С.А., Насырова Е.В., Роженцев А.А.