УДК 612.827

DOI: 10.31563/1684-7628-2019-49-1-81-87

А.А. Роженцев, М.А. Роженцев, С.А. Лобанов

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЗЖЕЧКА КРЫС ПРИ КРОВОПОТЕРЕ

Ключевые слова: мозжечок; кровопотеря; гликозаминогликаны; нейрон; криостатные срезы; клетка Пуркинье.

Введение. В нашей стране травмы являются четвертой по значимости причиной смертности среди всех возрастных категорий (в процентном выражении это составляет примерно 6 % от общего числа смертей) и наиболее распространенной причиной смерти детей старше одного года, подростков и взрослых в возрасте до 44 лет. Вследствие травм, а именно ударов, ушибов, порезов, переломов и т. д. чаще всего наступает кровотечение. Необходимо отметить, что в 50 % смертельных случаев пациенты умирают в пределах нескольких минут с момента получения травмы, что происходит либо непосредственно на месте происшествия, либо по дороге в больницу. Причиной такой смерти, как правило, являются большая потеря крови или тяжелые неврологические повреждения [6, 10]. Кровопотеря вызывает значительное изменение в центральной нервной системе. Это сказывается на функционировании мозжечка, который отвечает за высококоординированные движения, а также участвует в реализации адаптивных механизмов в мышечной и нервной тканях. Явления кровопотери различают по длительности и характеру. Длительная или обильная кровопотеря приводит к развитию патологических состояний и заболеваний. Даже после прекращения действия негативного фактора произошедшие перестройки в нервной системе сохраняются в течение длительного времени [1, 3–5, 9].

Целью исследования является выявление морфофункциональных изменений мозжечка крыс при кровопотере.

Материалы и методы исследования. При изучении моделируемой кровопотери на крысах использовались семьдесят пять половозрелых животных. Крысы, отобранные в эксперименте, объединялись в группы по 13–15 животных (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики). Моделирование острой кровопотери проводили на крысах породы Вистар массой 220–230 грамм, выращенных и содержавшихся в виварии с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях

(1986). 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).

Острая кровопотеря воспроизведена на 60 крысах, в каждой серии опытов использовано по 15 крыс (самцов – 45, самок – 15) по методике, разработанной И.П. Западнюк и соавторами [2, 8]. Группа контроля состояла из пятнадцати животных, находившихся в обычных условиях содержания.

Животных оперировали в стерильных условиях под общей анестезией этиловым эфиром для наркоза; рассекали кожу в области внутренней поверхности бедра, выделяли бедренные сосуды, которые пунктировали иглой, извлекая кровь в объеме 5–7 мл. Величина кровопотери составила $36,5 \pm 1,1$ % от объема циркулирующей крови (ОЦК), что приравнивается к кровопотере тяжелой степени. Образцы тканей у всех исследованных животных забирали для исследований. Животные выводились из эксперимента после моделирования кровопотери через 1 час, 3 часа, 6 часов и 12 часов. Выведение животных из эксперимента проводилось путем передозировки наркоза. Затем осуществлялось декапитация всех исследуемых животных. Далее вскрывалась полость черепа крыс и забирался головной мозг целиком. Проводили измерения и взвешивание головного мозга. Затем отделяли мозжечок, помещали в формалин для фиксации и последующего проведения гистологических исследований. Для гистохимических исследований, направленных на выявление гликозаминогликанов, использовались криостатные срезы по методикам, описанным Г.А. Меркуловым [7, 8]. Все проводимые нами экспериментальные исследования на крысах породы Вистар осуществлялись в динамике. При этом уделялось внимание состоянию животного, двигательной активности, поведению, особенностям их реакции на различные внешние раздражители (другие крысы, вода и пища, световые и шумовые раздражители). Изучение микропрепаратов, фоторегистрацию и морфометрические исследования проводили с использованием светооптиче-

ских микроскопов «Leica DMLA» и «JENAMED-2», цифровой фотокамеры «Leica DC-500», системы интерактивного изображения «Видеотест» (Россия, вариант 3). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью операционной системы Windows 7 с использованием программ Microsoft Office 2010.

Результаты исследований. Изучение ткани мозжечка в условиях моделирования острой кровопотери позволяет проследить морфологические изменения уже в течение первого часа. В этих условиях наблюдаются структурно-функциональные изменения, затрагивающие разные клеточные элементы мозжечка и окружающий их межклеточный матрикс. Анализ морфоструктурных данных показывает относительную неоднородность структуры нейронов мозжечка. В некоторых участках нейроны имеют размытость контуров с нарушением их четкости, с явлениями легкого набухания. В других участках мозжечка располагаются нейроны, имеющие относительно четкие контуры, практически не отличающиеся от нейронов, входящих в группу контроля. У части нейронов мозжечка прослеживаются явления гетерогенности окрашивания их цитоплазмы и ядра. Это является показателем особенности реагирования нейронов на экстремальный фактор и их функциональными особенностями.

Нейроны мозжечка, расположенные в молекулярном слое, ганглиозном слое и в слое клеток-зерен, характеризуются неоднородным клеточным составом и отношению к восприятию красителей. Среди этих клеток выявляются относительно светлые нейроны, часть клеток имеет более выраженное окрашивание, среди них выявляются промежуточные формы. На гистологических препаратах ткани мозжечка выявляется неоднородность восприятия нейронами красителей и характеризуется выраженным мозаичным рисунком. Гистохимические исследования мозжечка крыс в условиях острой кровопотери позволяют выявить особенности реактивности клеточных элементов в зависимости от интенсивности их окрашивания. Анализ полученных результатов позволяет отразить некоторые особенности динамики разных классов гликозаминогликанов, находящихся в межклеточных пространствах разных слоев мозжечка. На криостатных срезах одинаковой толщины в ткани мозжечка прослеживаются разные нейроны, расположенные по его слоям. На срезах мозжечка, окрашенных толуидиновым синим или метиленовой синью, в течение первого часа после острой кровопотери выявляются нейроны с относительно четкими контурами, расположенные по слоям. При изучении срезов

мозжечка на препаратах достаточно четко выявляются крупные нейроны, расположенные в виде групп в ганглиозном слое. Эти клетки представлены нейронами Пуркинье, различающимися по форме. Нейроны данной группы имеют четко выраженный гликокаликс, расположенный на поверхности клеточной мембраны. Цитоплазма этих нейронов представлена в виде гетерогенной структуры, различающейся размерами, занимаемой площадью и интенсивностью окрашивания. Это структурно-функциональное образование нейронов представляет собой вещество Ниссля (тигроидное вещество). Изучаемое нами вещество Ниссля имеет неодинаковую интенсивность окрашивания в разных нейронах. Эти структурные особенности рассматриваются нами как различия в функциональном состоянии исследуемых нейронов.

В нейронах Пуркинье, практически в его центральных отделах, располагается ядро. Оно имеет относительно бледное окрашивание по сравнению с окружающей цитоплазмой. Ядра этих клеток имеют округлую или слегка овальную форму. Внутри ядер содержится относительно гомогенная структура, равномерно распределенная. Внутри ядра располагается ядрышко, имеющее интенсивное окрашивание по сравнению с нуклеоплазмой. Ядрышки, как правило, располагаются в центральных отделах ядра. На криостатных срезах довольно четко прослеживаются отростки нейронов, расположенные в разных его слоях на значительном расстоянии. Аксоны клеток Пуркинье располагаются практически во всех отделах молекулярного слоя и тесно контактируют с другими нейронами. Отростки клеток Пуркинье, расположенные в зернистом слое, трудно различимы. Характерной особенностью молекулярного слоя является небольшое содержание нейронов и преобладание отростков и межклеточного матрикса. Все это способствует слабому восприятию красителей.

В этот период нейроны, расположенные в зернистом слое, представлены клетками округлой, а в некоторых случаях и овальной формы. Отростки у этих клеток были трудно различимы. Цитоплазма нейронов зернистого слоя имела очень интенсивное окрашивание. Клетки зерна тесно располагались по отношению друг к другу.

Кровеносные сосуды, расположенные в ткани мозжечка, были распределены в разных его слоях неравномерно. Относительно высокое содержание сосудов микроциркуляторного русла наблюдалось в зернистом и ганглиозном слоях. Различия в содержании кровеносных сосудов составляли приблизительно 150–300 %.

Вокруг этих кровеносных сосудов наблюдались участки просветлений. Эти периваскулярные зоны имели неравномерный характер на своем протяжении, в них наблюдались участки сужений и расширений. Сосуды микроциркуляторного русла на некоторых участках приобретали извитой характер.

Анализ криостатных срезов при окрашивании альциановым синим при разных рН и молярностях позволил дифференцировать гликозаминогликаны на сульфатированные и несulfатированные. Среди несulfатированных гликозаминогликанов определялись гиалуроновая кислота и хондроитин, которые различались между собой по степени метилирования и действия на них фермента гиалуронидазы. Процентный состав гиалуроновой кислоты был около 22,7 %. По сравнению с группой контроля данное соединение возросло практически на 6,5 %.

Сульфатированные гликозаминогликаны были представлены разными соединениями, различающимися по своей структуре и степени сульфатации. Среди них нам удалось дифференцировать следующие сульфатированные формы: хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, гепарин, гепарансульфат. Содержание хондроитин-4-сульфата составляло 19,5 % (в группе контроля это соединение содержалось в количестве 14,3 %), в то же время хондроитин-6-сульфат – 17,8 % (в группе контроля данное соединение составило 11,7 %). Группа высокосulfатированных гликозаминогликанов в виде гепарина и гепарансульфата составляли 7,4 % (в контроле содержание соединений этой группы составило 6,3 %).

К концу третьего часа в ткани мозжечка наблюдались слабовыраженные явления отека. Кровеносные сосуды микроциркуляторного русла характеризовались явлениями периваскулярного отека, практически не отличающегося от первого часа после острой кровопотери. Все звенья кровеносных сосудов микроциркуляторного русла были четко контурированы. На гистологических срезах можно было различить разные фрагменты сосудов микроциркуляторного русла, участвующих в его формировании. Эти кровеносные сосуды имели извитой вид и неравномерный просвет на своем протяжении. Вокруг них прослеживались явления периваскулярного отека. Этот феномен был представлен участками просветлений, расположенных вокруг кровеносных сосудов и окружающих ткань мозжечка.

Достаточно четко фрагменты кровеносных сосудов микроциркуляторного русла выявлялись в молекулярном и ганглиозном слоях.

Фрагменты кровеносных сосудов не одинаково окрашивались красителями. Нами это объясняется неравномерностью распределения разных классов гликозаминогликанов сульфатированных и несulfатированных форм в ткани мозжечка.

Нейроны, расположенные в ганглиозном слое, имели разную чувствительность к красителям и характеризовались неодинаковой степенью окраски. Нейроны Пуркинье, расположенные около фрагментов кровеносных сосудов микроциркуляторного русла, имели менее интенсивное окрашивание по сравнению с отделенно расположенными клетками. Нейроны, находящиеся вблизи кровеносных капилляров, на своей поверхности имели гликокаликс бледно-голубоватого оттенка, плохо воспринимавший красители. Цитоплазма этих нейронов в своем составе содержала тигроидное вещество, намного слабее воспринимающая красители по сравнению с предыдущим периодом. В цитоплазме выявлялась неоднородная структура, различающаяся по составу, интенсивности окрашивания, занимаемому объему.

Практически в центре нейрона располагалось ядро округлой формы. Границы ядра имели относительно четкие контуры. Голубоватая окраска нуклеоплазмы была менее интенсивной по сравнению с цитоплазмой, а состав нуклеоплазмы – относительно однородный. Внутри ядра прослеживались ядрышки в количестве от одного до трех, различающиеся между собой по плотности, размерам, чувствительности к красителям.

Нейроны, расположенные в зернистом слое, имели достаточно хорошую чувствительность к красителям. Поверхность этих клеток хорошо окрашивалась метиленовой синью и придавала клеткам сочный вид. Клетки зерна, расположенные в зернистом слое, располагались на небольшом расстоянии друг от друга, местами тесно контактируя между собой и с нейронами, расположенными в других слоях. Количество нейронов, расположенных в зернистом слое, практически не изменялось по сравнению с ранее исследованным периодом.

В молекулярном слое коры мозжечка выявлялось небольшое количество нейронов, расположенных между отростками нейронов зернистого и молекулярного слоев. Межклеточный матрикс имел тенденцию к слабому восприятию окрашивания (рисунок 1). Некоторые фрагменты отростков клеток сохраняли на своей поверхности белково-полисахаридный материал, входящий в состав гликокаликса.

Комплексное изучение состава и содержания несulfатированных и сульфатированных

форм гликозаминогликанов позволило проследить особенности их динамики. Содержание несulfатированных гликозаминогликанов к третьему часу эксперимента составило 24,7 %, среди соединений этой группы в основном преобладала гиалуроновая кислота.

Среди sulfатированных форм гликозаминогликанов преобладали хондроэтин-4-сульфаты, которые составили 25,6 %. При дифференцированном анализе было выявлено достаточно вы-

сокое содержание другой группы sulfатированных гликозаминогликанов в виде хондроэтин-6-сульфатов, содержание которых в этот период составило 22,5 %. Среди всех гликозаминогликанов содержание его высокосulfатированных форм гепарансульфата и гепарина составило 9,1 %. К шестому часу эксперимента в ткани мозжечка сохранялись явления изменения тинкториальных свойств коры мозжечка (рисунок 2).

Рисунок 1
Фрагмент ткани мозжечка крысы. Слои мозжечка.
Гранулярный слой – А, ганглиозный слой – Б, молекулярный слой – В (через 3 часа после кровопотери).
Окраска толуидиновым синим. Об. 20. Ок. 10

Рисунок 2
Фрагмент ткани мозжечка крысы. Слои мозжечка.
Гранулярный слой – А, ганглиозный слой – Б, молекулярный слой – В (через 6 часов после кровопотери).
Окраска толуидиновым синим. Об. 20. Ок. 10

Динамика гликозаминогликанов в этот период имела тенденцию к увеличению содержания sulfатированных форм. Среди этих соединений преобладали хондроэтин-4-сульфаты. Со-

держание гиалуроновой кислоты возрастало незначительно и составляло 26,1 %. Эти несulfатированные формы гликозаминогликанов имели склонность к более выраженному лизису со сто-

роны тестикулярной гиалуронидазы по сравнению с более ранними периодами. Среди сульфатированных форм гликозаминогликанов хондроэтин-4-сульфаты составляли 33,8 %. Дифференцированное применение тестикулярной и бактериальной гиалуронидаз позволяет отметить изменение скорости их влияния на эту сульфатированную форму гликозаминогликанов. Использование тестикулярной гиалуронидазы показало незначительное увеличение скорости лизиса хондроэтин-4-сульфата. В то же время применение бактериальной гиалуронидазы показало возрастание скорости лизиса в 1,85 раза по сравнению с более ранним периодом.

Исследования состава гликозаминогликанов и выявление среди них хондроэтин-6-сульфатов позволяет отметить, что содержание этих форм составляло 27,3 %. Использование метилирования для контроля сульфатированных форм гликозаминогликанов выявляет изменение интенсивности окрашивания в растворах с толуидиновым синим при низких молярностях – 0,2–0,4 MgCl_2 .

Выявление содержания высокосульфатированных форм гликозаминогликанов в коре моз-

жечка показывает их незначительное увеличение до 11,8 %. Для дифференцированного контроля этих гликозаминогликанов проводилось метилирование. При этом было обнаружено снижение интенсивности окрашивания срезов, полученных из коры мозжечка. К концу двенадцатого часа в коре мозжечка наблюдались изменения в сосудах микроциркуляторного русла. Анализ гистохимических препаратов показывает, что в этот период в ткани мозжечка прослеживается неравномерное распределение гликозаминогликанов, различное их соотношение по составу и классам. Определение содержания несulfатированных гликозаминогликанов в коре мозжечка позволяет отметить существенное возрастание этих форм по сравнению с предыдущим сроком практически на пятьдесят процентов. При этом можно отметить, что содержание гиалуроновой кислоты возросло почти до 39,5 %. Результаты гистохимического анализа показывают существенное возрастание несulfатированных гликозаминогликанов к 12 часу эксперимента, а максимальное увеличение сульфатированных прослеживалось к 6 часу эксперимента с последующим их снижением (таблица 1).

Таблица 1 Соотношение классов ГАГ в мозжечке крыс при кровопотере, %

Наименование	Контрольная группа	Часы			
		1	3	6	12
Гиалуроносовая кислота	16,1	22,7	24,7	26,1	39,5
Хондроэтин-4-сульфат	14,3	19,5	25,6	33,8	33,2
Хондроэтин-6-сульфат	11,7	17,8	22,5	27,3	21,2
Гепарансульфат	6,3	7,4	9,1	11,8	7,9

Рисунок 3
Процентное соотношение классов гликозаминогликанов в мозжечке крыс при кровопотере

Анализ сульфатированных форм гликозаминогликанов позволяет отметить, что содержание хондроэтин-4-сульфата в этот период практически не изменилось и составило 33,2 %. Более детальный анализ сульфатированных гликозаминогликанов показывает, что хондроэтин-6-сульфаты имели тенденцию к снижению содержания до 21,2 %. Исследование содержания гепарансульфата и гепарина позволило проследить их уменьшение практически на треть, что составило 7,9 %.

Сопоставление основных классов гликозаминогликанов при моделировании острой кровопотери представлено на рисунке 3.

Вывод. Экспериментальная кровопотеря вызывала в мозжечке изменения со стороны сосудов микроциркуляторного русла. Они проявлялись явлениями дилатации, замедлением кровотока, периваскулярными отеками. В ткани моз-

жечка наблюдались явления изменения структуры нейронов. Для нейронов были характерны явления перичеселлюлярного отека, набухания клеток. В более поздние сроки прослеживалась миграция нейронов из одного слоя в другой.

Данные гистохимических исследований показывают изменения тинкториальных свойств клеток. В нейронах прослеживались явления нарушения обмена веществ. Результаты гистохимического анализа разных классов гликозаминогликанов показывают существенное возращание несulfатированных гликозаминогликанов к 12 часу эксперимента, а максимальное увеличение сульфатированных прослеживалось к 6 часу эксперимента с последующим их снижением. Данные морфофункциональные изменения нами рассматриваются как компенсаторные процессы.

Библиографический список

1. Аврущенко, М.Ш. Изменения популяции клеток Пуркинье мозжечка в динамике постреанимационного периода, после остановки системного кровообращения [Текст] / М.Ш. Аврущенко, А.В. Афанасьева // Современные методы диагностики и лечения в реаниматологии. 2009. С. 5–7.
2. Западнюк, И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте [Текст] / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк. Киев: Вища школа, 1983. 383 с.
3. Влияние гипоксии на организм [Текст] / С.А. Лобанов, И.В. Шишкин, Н.О. Кузнецова, А.А. Малагина, З.Р. Хисматуллина, Е.В. Насырова, М.А. Роженцев, А.А. Роженцев, З.Р. Мансурова // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы. 2017. № 2 (42). С. 12–27.
4. Влияние гликозаминогликанов на структуру мозжечка при гипоксии [Текст] / И.В. Шишкин, С.А. Лобанов, З.Р. Хисматуллина // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2016. № 4 (40). С. 77–83.
5. Кондратюк, К.Л. Нейрорадиологические предикторы исхода внутримозговых кровоизлияний в мозжечок в остром периоде [Текст] / К.Л. Кондратюк // Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа. 2015. № 2 (26). С. 15–24.
6. Острая кровопотеря: регионарный кровоток и микроциркуляция (обзор, часть I) [Текст] / В.В. Мороз, И.А. Рыжков // Общая реаниматология. 2016. Т. 12. № 2. С. 66–89.
7. Меркулов, Г.А. Курс патогистологической техники [Текст] / Г.А. Меркулов. 4-е изд. Л.: Медицина, 1969. С. 156–165, 171–172.
8. Семченко, В.В. Гистологическая техника [Текст]: учебное пособие / В.В. Семченко, С.А. Барашкова, В.Н. Ноздрин, В.Н. Артемьев. 3-е изд., доп. и перераб. Омск – Орел: Омская областная типография, 2006. 290 с.
9. Ультроструктурные изменения нейронов мозжечка крыс при гипоксии [Текст] / С.А. Лобанов, Е.В. Насырова, А.А. Роженцев // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2017. № 3 (43). С. 31–36.
10. Armstrong C., Hawkes R. Pattern formation in the cerebellum: colloquium series on the developing brain, lecture 11. Series editor M. McCarthy. Morgan and Claypool life sciences. 2014. P. 85.

Сведения об авторах

1. **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: ufa.darts@yandex.ru.
2. **Роженцев Михаил 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: handboll-misha@mail.ru.

3. **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.

Статья раскрывает некоторые особенности, происходящие в мозжечке крыс при кровопотере. В результате экспериментальных исследований уже в первые часы после острой кровопотери

выявлены изменения со стороны микроциркуляторного русла. Приведены данные изменения содержания разных классов гликозаминогликанов.

A. Rozhentsev, M. Rozhentsev, S. Lobanov

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF RAT CEREBELLUM AT BLOOD LOSS

Key words: *cerebellum; blood loss; glycosaminoglycans; neuron; cryostatic sections; Purkinje cell.*

Authors' personal details

1. **Rozhentsev Alexey**, first year Post-graduate student of the Health protection and life safety department, Bashkir State Pedagogical University named after M. Akmulla, 450008, Republic of Bashkortostan, Ufa, Oktyabrskaya Revolutsia st., 3A, e-mail: ufa.darts@yandex.ru.

2. **Rozhentsev Mikhail**, first year Post-graduate student of the Health protection and life safety department, Bashkir State Pedagogical University named after M. Akmulla, 450008, Republic of Bashkortostan, Ufa, Oktyabrskaya Revolutsia st., 3A, e-mail: handboll-misha@mail.ru.

3. **Lobanov Sergey**, Doctor of medical sciences, professor of the Health protection and life safety department, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Bashkir State Pedagogical University named after M. Akmulla», 450008, Republic of Bashkortostan, Ufa, Oktyabrskaya Revolutsia st., 3A, e-mail: lobanovprof@yandex.ru.

The paper reveals some features that occur in the cerebellum of rats at blood loss. As the result of experimental studies in the first hours after acute

blood loss there are changes in the microcirculatory bloodstream. There are changes in the content of different classes of glycosaminoglycans.

© Роженцев А.А., Роженцев М.А., Лобанов С.А.