

УДК 612.83+616-092.4/9

Морфогистохимическое изучение изменений в структурах мозга у паратиреопривных крыс

К.А. Аветисян

*Кафедра физиологии ЕГМУ им.М. Гераци
0025, Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: паратиреоидэктомия, активность кислой фосфатазы, кора мозга, гиппокамп, амигдала, ядро Мейнерта

Как известно, Ca^{2+} выступает в роли универсального сигнала, ответственного за контроль и регуляцию широкого спектра функций нейрона, включая рост отростков, синаптогенез, синаптическую передачу, пластичность и выживаемость, а их дисрегуляция приводит к развитию синаптической дисфункции, нарушению пластичности, развитию нейропатологий и дегенеративных заболеваний. Известно далее, что нейрональная активность сопровождается повышением концентрации цитозольного Ca^{2+} , связываемого с кальмодулином в качестве вторичного мессенджера, опосредующего физиологические реакции нейронов, в ответ на химическую и электрическую стимуляцию [7]. Открытие способности Ca^{2+} работать в качестве и внешнего лиганда продемонстрировало, что Ca^{2+} является и важным экстраклеточным первичным мессенджером [3]. Хотя взаимосвязь между входом Ca^{2+} и выбросом медиатора сложная и комплексная, тем не менее понижение входа Ca^{2+} приводит к нарушению выброса медиатора, следовательно и нормального функционирования нейронов. В свою очередь, на примере гиппокампа показано, что низкий уровень Ca^{2+} в сочетании с высоким K^+ содействует генерации стойкой, длительной эпилептиформной спайковой активности [5].

Паратиреоидный гормон (ПТГ), основной специфический регулятор кальций-фосфорного метаболизма в организме, поддерживает стабильный уровень экстраклеточного Ca^{2+} , путем стимуляции его реабсорбции в почках, всасывания в кишечнике, высвобождения из костей. Следовательно, ПТГ балансирует уровень экстраклеточного Ca^{2+} , через отрицательную обратную связь [3]. Кроме того, известно модулирующее действие ПТГ на функции нейронов, посредством регуляции уровня внутриклеточного Ca^{2+} , cAMP, cGMP. ПТГ прямо или опосредованно принимает участие в активировании аденилат циклазы и синтезе cAMP, проницаемости клеточных мембран, электрогенезе нервной, мышечной и железистой тканей, синаптической передаче, механизме мышечного сокращения [6].

Еще в 1984 г. исследованиями проф. Д.Н. Худавердяна [2] было установлено, что причиной паратиреопривных двигательных расстройств являются нарушения, возникающие в деятельности различных отделов ЦНС, имеющих отношение к контролю и запуску моторных реакций, причем решающим звеном являются патологические процессы на уровне спинного мозга (СМ), где наряду с повышением возбудимости имеет место ослабление фактически всех видов сегментарного торможения.

Таким образом, следует признать крайне важным, дальнейшее исследование роли нарушенного Ca^{2+} гомеостаза, а также ПТГ в клеточных механизмах формирования выявленных системных нарушений при тетании. В настоящей работе предпринято изучение влияния отсутствия околотитовидных желез на морфогистохимические изменения в структурах мозга в условиях паратиреоидэктомии у крыс.

Материал и методы

Эксперименты проводили на интактных ($n=5$) и подвергнутых хирургическому удалению паращитовидной железы (ПЩЖ) ($n=12$) крысах-самцах Альбино ($250\pm 30\text{г}$) под контролем уровня Ca^{2+} и Р в крови. Все процедуры совершали согласно “Правилам по уходу за лабораторными животными” (НИН публикация за № 85-23, пересмотренная в 1985 г.). Использовали метод выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы (КФ). Указанный метод, разработанный [1] на базе метода Гомори, позволяет в определенной степени и в рамках поставленных задач и возможностей судить о морфогистохимических изменениях в мозгу. Кусочки мозга фиксировались в 5% нейтральном формалине, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере pH 7.4 в соотношении 1:9 и содержащей 0.3% CaCl_2 и 15% сахарозы. Для лучшей стабилизации фосфора и в целях предотвращения аутолиза фиксация производилась при 4°C в течение 48 часов. Из кусочков мозга готовились замороженные срезы толщиной 40–50 мкм, промывались в дистиллированной воде и переносились в инкубационную смесь для избирательного выявления нервных клеток: 20 мл 0,38% раствора уксуснокислого свинца, 5 мл 1М ацетатного буфера pH 5.6, 5 мл 2% раствора β -глицерофосфата натрия. Инкубацию проводили в термостате при 37°C от 1 до 3 часов. Затем следовали промывка срезов в дистиллированной воде, проявка в растворе сульфата натрия и, после повторной промывки, заключение в бальзам с последующим описанием препаратов.

Результаты и обсуждение

По сравнению с нормой в пирамидном слое коры больших полушарий мозга (рис. 1 А) у паратиреоидэктомизированных крыс выявляется

набухание ядер клеток, отсутствует реакция отростков (рис.1 Б), а в полиморфном слое коры мозга – изменение формы и размеров клеток (рис. 1 В).

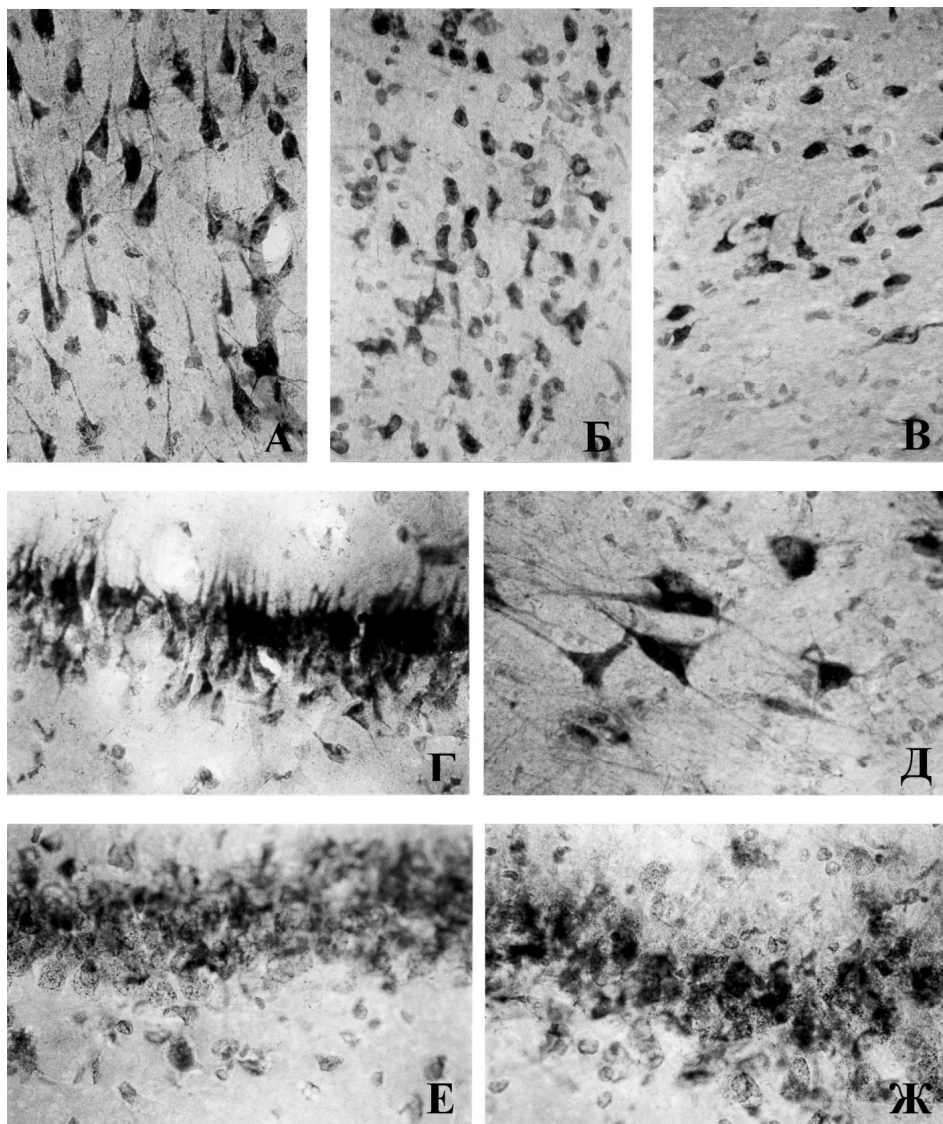


Рис. 1. А – пирамидный слой коры больших полушарий мозга интактной крысы; Б – пирамидный (набухание ядер клеток, отсутствие реакции отростков) и В – полиморфный слой коры мозга крыс в условиях удаления парашитовидных желез (изменение формы и размеров клеток); Г – нейроны СА1 слоя и Д – крупные пирамидные клетки гиппокампа интактной крысы (нейроны выявляются с длинными отростками); Е – СА3 и Ж – СА1 слой гиппокампа крыс в условиях удаления парашитовидных желез (округление тел нейронов с явлениями центрального хроматолиза). Гистохимический метод выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы. Увеличение: ок.10; об. 60 (Г); 400 (А-Б, Д-Ж)

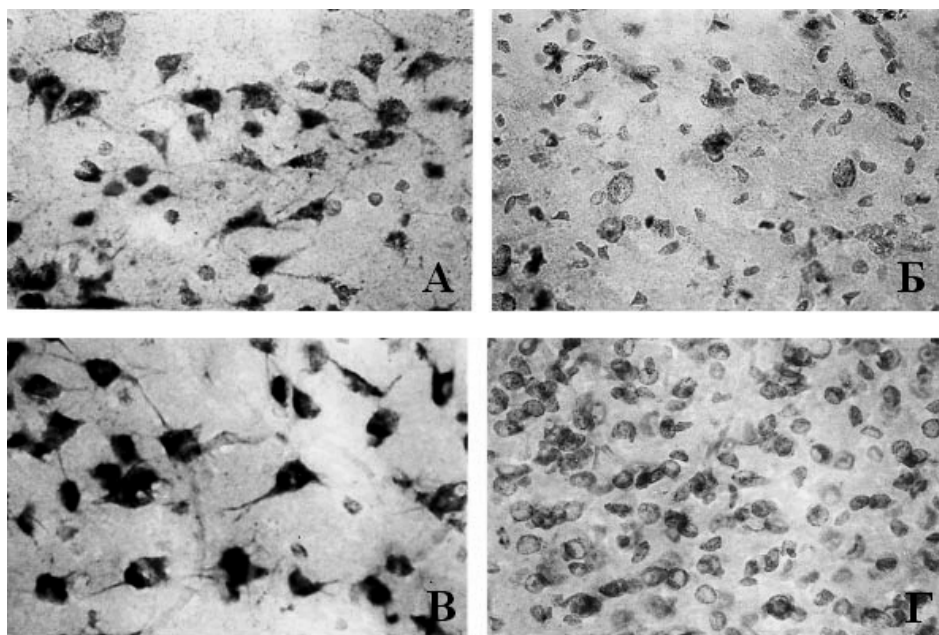


Рис. 2. А – ядро Мейнерта мозга интактной крысы и Б – в условиях удаления паращитовидных желез (центральный хроматолиз); В – нейроны миндалевидного тела мозга интактной крысы и Г – в условиях удаления паращитовидных желез (центральный хроматолиз). Гистохимический метод выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы. Увеличение: 160 (Г); 400 (А-В)

Нейроны СА1 слоя (рис. 1 Г) и крупные пирамидные клетки гиппокампа интактной крысы выявляются с длинными отростками (рис. 1 Д). В СА3 (рис. 1 Е) и СА1 (рис. 1 Ж) слоях гиппокампа в условиях удаления ПЩЖ наблюдается округление тел нейронов с явлениями центрального хроматолиза.

По сравнению с нормой (рис. 2 А), в условиях паратиреоидэктомии (ПТЭ) показан центральный хроматолиз в ядре Мейнерта (рис. 2 Б), а также в амигдале, по сравнению с нормой (рис. 2 В и Г соответственно).

В горизонтальных срезах поясничного отдела спинного мозга в норме (рис. 3 А, Б) мотонейроны выявляются с длинными отростками, а осадок фосфата свинца в виде гранул распределен в цитоплазме и отростках, причем наиболее интенсивно окрашивается цитоплазма вокруг ядра. В условиях ПТЭ обнаружены отсутствие реакции отростков (рис. 3 В-Е), наличие мотонейронов, схожих с таковыми интактных крыс (рис. 3 В, Д), и пикноморфные нейроны (рис. 3 Г, Е). К тому же в данном отделе СМ встречаются как нейроны, схожие с таковыми интактных крыс, хотя без выявления отростков (рис. 3 В, Д; рис. 4 Г), так и пикноморфные клетки, что присуще тяжелой форме поражения (рис. 3 Г, Е; рис. 4 В).

На фронтальных срезах вблизи конского хвоста в условиях ПТЭ наблюдается активация микроглии, проявляющаяся в фагоцитарном поведении с целью удаления нейронального мусора от погибших нейронов, и обнаружено скопление ядер глиальных клеток (формированные микроглиальные узелки – нодули) вокруг дегенерированных мотонейронов, состоящее из микроглиальных фагоцитов (рис. 4 А-Б, стрелки). Микроглия трансформируется в макрофаги мозга, которые способны разрушить повреждённые клетки, патогены, клеточный мусор и присутствующие антигены, чтобы активировать Т-клетки, путешествующие через нервную систему [8]. Вероятно, реактивные глиоциты, меняя клеточную морфологию, предохраняют интактную ткань от инфекции. На фронтальных срезах поясничного отдела спинного мозга (рис. 4 В-Е) – дегенерированные интернейроны (рис. 4 В), интернейроны, схожие с таковыми интактных крыс (рис. 4 Г), и группы мотонейронов, у которых наблюдается тенденция к контактированию друг с другом посредством отростков (рис. 4 Д, стрелки).

На рис. 4 Е показан фрагмент Д. На фронтальных срезах поясничного отдела СМ после ПТЭ показана реакция расширенных сосудов микроциркуляторного русла, в белом веществе видны мигрирующие деформированные нервные клетки (стрелки) (рис. 5 А-В, с). Вокруг центрального канала (к) показано скопление пикноморфных дегенерированных клеток (рис. 5 Г, прямоугольник).

Представляют интерес результаты исследований последних лет в области гипопаратиреоза и связанных с ним патологических сдвигов в нервной, мышечной и костной системах. Как было отмечено выше, термин гипопаратиреоз отражает группу заболеваний, в которых уровни экстраклеточного Ca^{2+} не могут быть поддержаны в пределах нормы из-за относительного или абсолютного дефицита ПТГ, что ведет к гипокальцемии и гиперфосфатемии, результирующего преимущественно в нервно-мышечную дисфункцию. Представляют интерес последние данные по изучению роли идиопатического гипопаратиреоидизма в миопатии и ее патогенеза гистологическим методом. В целом, пациенты с идиопатической гипокальцемией имели некоторые неспецифические гистологические изменения в скелетных мышцах, обратные взаимоотношения между сниженным уровнем плазменного Ca^{2+} и повышенным уровнем плазменных мышечных ферментов, которые были отнесены к гипокальцемии. К тому же тяжесть изменений в мышцах относили не только к ее степени, но и длительности гипокальцемии [4]. Далее было обнаружено, что хроническая гипокальцемия может причинить ЭЭГ изменения и имитировать миокардиальный инфаркт. Вокруг центрального канала (к) показано скопление пикноморфных дегенерированных клеток (рис. 5 Г, прямоугольник).

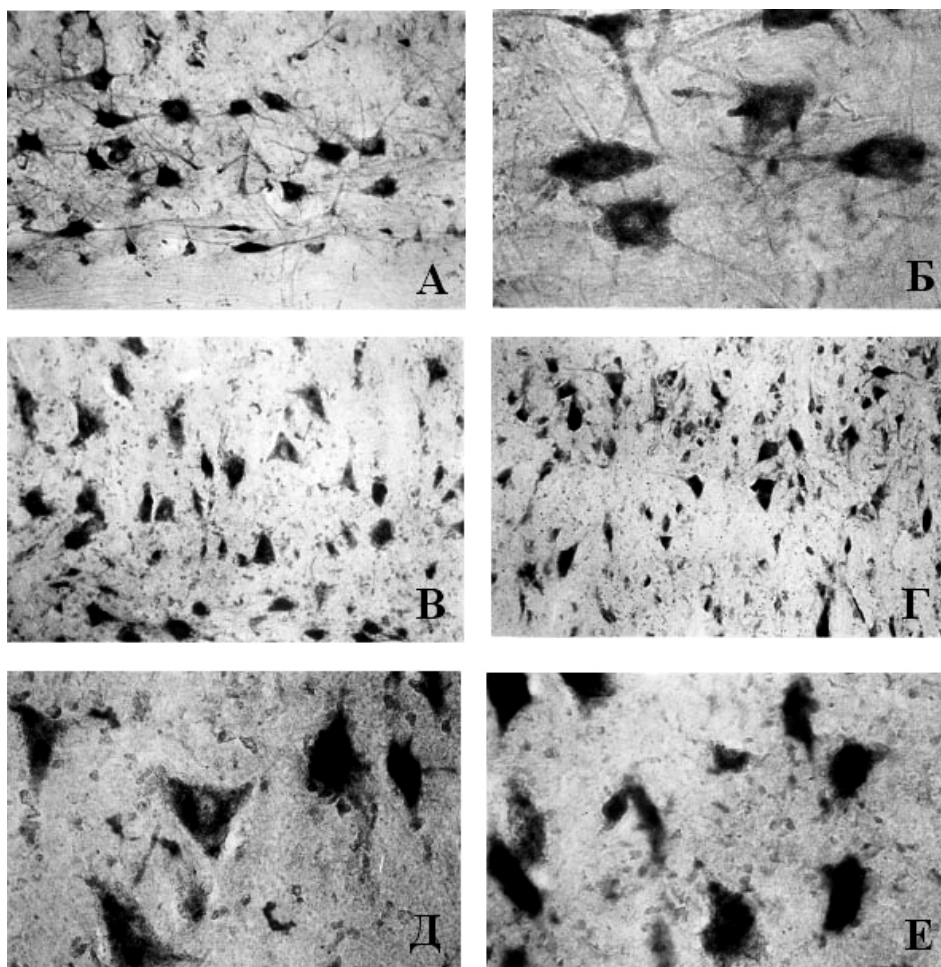


Рис. 3. Горизонтальные срезы поясничного отдела спинного мозга. А, Б – intactной крысы (мотонейроны выявляются с длинными отростками, а осадок фосфата свинца в виде гранул распределен в цитоплазме и отростках, причем наиболее интенсивно окрашивается цитоплазма вокруг ядра) и В-Е – в условиях удаления паращитовидных желез (отсутствие реакции отростков, В, Д – мотонейроны, схожие с таковыми intactных крыс; Г, Е – пикноморфные нейроны). Гистохимический метод выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы. Увеличение: 160 (А, В, Г); 400 (Б, Д, Е)

Ранее в морфогистохимических и электронномикроскопических исследованиях Д.Н. Худавердяна [2] были получены аналогичные изменения в межпозвоночных узлах и переднем роге СМ у кошек. Согласно морфогистохимическому анализу, в больших и средних нейронах межпозвоночных узлов были выявлены явления центрального хроматолиза, периферическое распределение ядра, набухание, сморщивание и сателлитоз. Было показано преобладание нейронов с тотальным и краевым

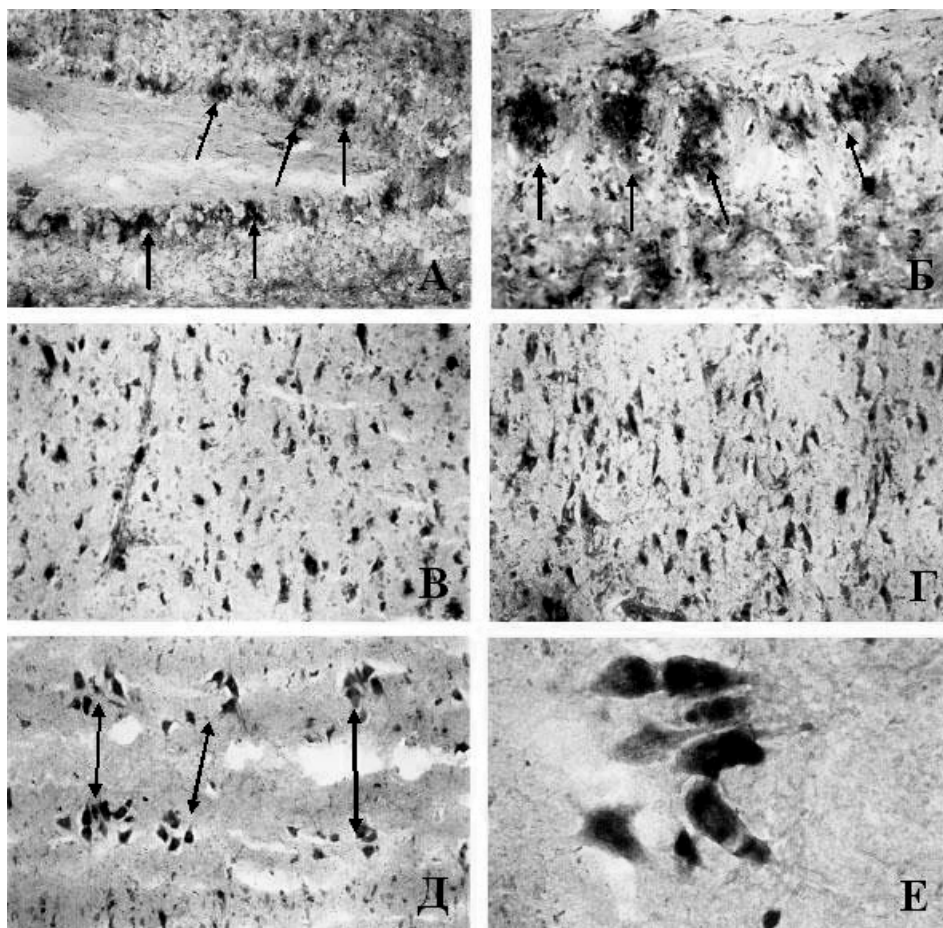


Рис. 4. Фронтальные срезы спинного мозга крыс вблизи конского хвоста в условиях удаления паращитовидной железы. А-Б – скопление ядер глиальных клеток (нодули) вокруг дегенерированных мотонейронов (стрелки); В-Е – фронтальные срезы поясничного отдела спинного мозга; В – дегенерированные интернейроны; Г – интернейроны, схожие с таковыми интактных крыс; Д – группы мотонейронов, у которых наблюдается тенденция к контактированию друг с другом посредством отростков (стрелки); Е – фрагмент Д. Гистохимический метод выявления активности Ca^{2+} - зависимой кислой фосфатазы. Увеличение: 63 (А); 100 (Д); 160 (Б, В, Г); 400 (Е)

хроматолизом, эктопией ядра и ядрышка. Причем набухание, краевой хроматолиз, сморщивание и сателлитоз чаще проявлялись в больших нейронах, а в средних – центральный хроматолиз, периферическое расположение ядра и гиперхроматоз. Далее, при легкой степени тетании в межпозвоночных узлах имели место преобладание центрального хроматолиза и периферическое распределение ядра, при тяжелой степени тетании – нарастание дистрофических и деструктивных процессов – увеличение

количества клеток с тотальным и краевым хроматолизом, сморщиванием и сателлитозом. В мото- и интернейронах передних рогов СМ при легкой тетании выявлялись единичные гипертрофированные мотонейроны с крупным овальным ядром и цитоплазмой, богатой РНК и аминокислотами, свидетельствующие о повышенном функциональном состоянии. При тяжелой тетании в крупных и мелких нейронах передних рогов СМ преобладали гипертрофированные, гиперимпрегнированные клеточные элементы с высоким содержанием рибонуклеотидов в цитоплазме и ядрышках.

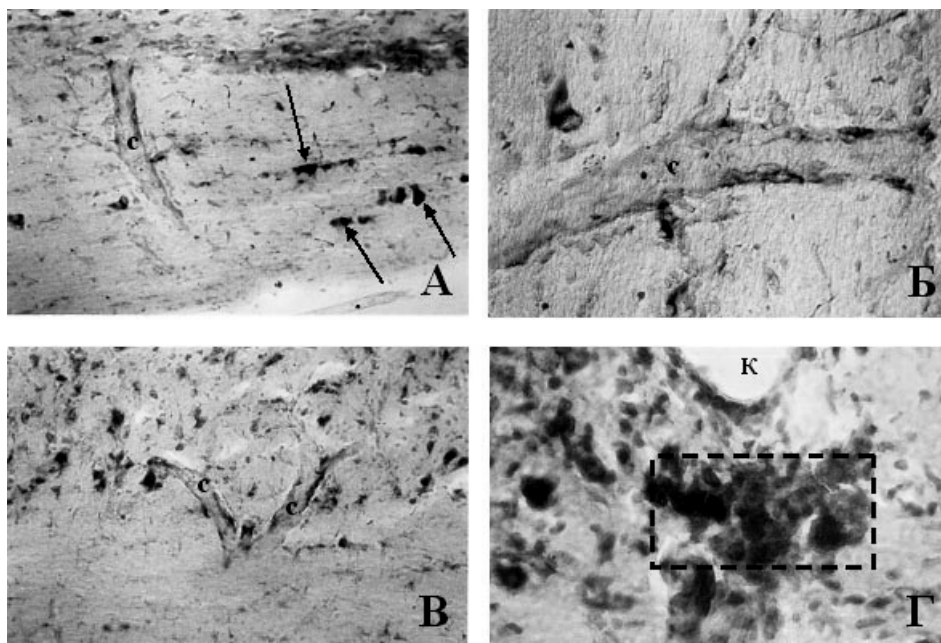


Рис. 5. А-В – фронтальные срезы поясничного отдела спинного мозга крыс в условиях удаления паращитовидных желез. Показана реакция расширенных сосудов микроциркуляторного русла (с), в белом веществе видны мигрирующие деформированные нервные клетки (стрелки); Г – фронтальные срезы спинного мозга. Вокруг центрального канала (к) показано скопление пикноморфных дегенерированных клеток (прямоугольник). Гистохимический метод выявления активности Ca^{2+} - зависимой кислой фосфатазы. Увеличение: 160 (А, В); 400 (Б, Г)

К тому же, в крупных клетках чаще выявлялись набухание, сморщивание и нейрофагия, а также явления дистрофии и деструкции в отростках в виде четко видных утолщений, фрагментов распада и исчезновения шиповидных выростов. Интернейроны оказались более устойчивыми. Наконец, в электронномикроскопическом изучении в гипертрофированных нейронах обнаруживались активация ядерного аппарата и цитоплазматических органелл, повышенная плотность и осmioфилия ядра с ядрышком, боль-

шое количество рибосом в цитоплазме и увеличение количества митохондрий вблизи эндоплазматического ретикулума.

В заключение хочется отметить, что результаты настоящего исследования согласуются с предыдущими на кошках [2] и свидетельствуют о вовлечении сегментарного аппарата спинного мозга в патогенез паратиреопривной тетании.

Поступила 06.06.13

Պարաթիրեոպրիվ առնետների ուղեղի կառույցների փոփոխությունների մորֆոհիստոքիմիական ուսումնասիրությունը

Կ.Ա. Ավետիսյան

Պարաթիրեոպրիվ առնետների ուղեղի կառուցվածքներում Ca^{2+} - կախյալ թթու ֆոսֆատազի ակտիվության հայտնաբերման մեթոդով կատարվել է ձևաբանական և հիստոքիմիական ուսումնասիրություն:

Ընդհանուր առմամբ պարզվել է, որ ուղեղի կեղևում, հիպոկամպում, ամիգդալայում և Մեյներթի կորիզում ձևաբանական պատկերը հանդիսանում է տարբեր էկզո- և էնդոգեն ծագման ախտաբանական ազդեցությունների պատասխան ռեակցիա և վերաբերվում է ոչ մենահատուկ /սպեցիֆիկ/ նեյրոնային վնասվածքներին: Ուղեղի կեղևի բրգաձև շերտում նկատվում է բջիջների միջուկների փքվածություն, չկա ելուստների փոխազդեցություն և պոլիմորֆ շերտում բջիջների ձևի և չափերի փոփոխություն: CA1 և CA3 -ում նեյրոններում հայտնաբերվել է մարմինների կլորացում: Ամիգդալայի և Մեյներթի կորիզի նեյրոնների վնասվածքները հիմնականում ընթանում են կենտրոնական քրոմատոլիզի տեսքով: Ողնուղեղի գոտկային հատվածում բացահայտվել է ելուստների ռեակցիայի բացակայություն, պիկնոմորֆ նեյրոններ, որոնք բնորոշ են ծանր տեսակի վնասվածքներին և միկրոշրջանառության լայնացած անոթների ռեակցիային: Մենահատուկ է ողնուղեղի՝ ձիու պոչի /cauda equina / հատվածից դուրս եկող նեյրոնների ռեակցիան, որը պայմանավորված է միկրոգլիայի ակտիվացմամբ:

Morphohistochemical study of changes in brain structures of parathyreoprived rats

K.A. Avetisyan

In parathyreoprived rat brain structures there were conducted morphological and histochemical studies by method of detecting the activity of Ca^{2+} - dependent acidic phosphatase. In general, it was found that in the cerebral cortex, hippocampus, amygdala and Meynert's nucleus the morphological pattern is the expression of response reaction to various pathological effects of exogenous and endogenous origin and inherent to non-specific neuronal lesions. In the pyramidal layer of the cerebral cortex swelling of the cell's nuclei, absence of processes reaction in the polymorphic layer – a change of the shapes and sizes of cells is observed. In the CA1 and CA3, neurons with round bodies were found. The affection of the neurons of amygdala and Meynert's nucleus takes place mainly by the type of central chromatolysis. In the lumbar spinal cord there was revealed a lack of response in processes, picnomorph neurons inherent to severe damage and the reactions of widened vessels of microvascular channel. Specific is the reaction of neurons in the spinal cord on the output of the cauda equina, which is due to the activation of microglia.

Литература

1. Меликсетян И.Б. Выявление активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы в клеточных структурах мозга крыс. Морфология, СПб., 2007, т. 131(2), с. 77-80.
2. Худавердян, Д.Н. Механизмы паратиреопривных двигательных расстройств. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Ереван, 1984.
3. Bouschet T., Henley J.M. Calcium as an extracellular signaling molecule: perspectives on the Calcium Sensing Receptor in the brain. C. R. Biol., 2005, vol. 328, p. 691-700.
4. Dai C., Sun Z., Zhang X., Qiu M. Elevated muscle enzymes and muscle biopsy in idiopathic hypoparathyroidism patients. J. Endocrinol. Invest., 2012, vol. 35(3), p. 286-289.
5. Feng Z., Durand D.M. Effects of potassium concentration on firing patterns of low-calcium epileptiform activity in anesthetized rat hippocampus: inducing of persistent spike activity. Epilepsia, 2006; 47(4): 727-736.
6. Khudaverdyan D.N., Ter-Markosyan A.S. Parathyroid hormone as a modulator of the functional activity of neuron. Biochemistry (Moscow), 2000, vol. 65(2), p. 171-175.
7. Mattson M.P. Calcium and neurodegeneration. Aging Cell., 2007, vol. 6(3), p. 337-50.
8. Raff M.C., Barres B.A., Burne J.F., Coles H.S., Ishizaki Y., Jacobson M.D. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system [Review]. Science, 1993, vol. 262, p. 695-700.