

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК: 612.82:616.367-008.811.5/6

ЕМЕЛЬЯНЧИК
Сергей Владимирович

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
НЕЙРОНОВ МОЗГА КРЫСЫ
ПРИ НАРУШЕНИЯХ ЦИРКУЛЯЦИИ ЖЕЛЧИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Минск 2021

Научная работа выполнена в учреждении образования «Гродненский государственный медицинский университет» и учреждении образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы»

Научный

консультант:

Зиматкин Сергей Михайлович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет».

Официальные оппоненты:

Арчакова Людмила Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Центра электронной и световой микроскопии государственного научного учреждения «Институт физиологии НАН Беларуси»,

Сидоров Александр Викторович, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры физиологии человека и животных Белорусского государственного университета,

Мяделец Олег Данилович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Оппонирующая организация:

учреждение образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»

Защита состоится 21 мая 2021 года в 13.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.03 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, тел. 277-16-21; e-mail: uchsovet@bsmu.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «__» апреля 2021 года.

Ученый секретарь совета Д 03.18.03,
кандидат медицинских наук, доцент

Т.А.Летковская

ВВЕДЕНИЕ

Установление закономерностей адаптации клеток организма животных и человека к патологическим воздействиям является одной из важных проблем экспериментальной биологии и медицины. Учитывая важнейшую роль головного мозга в регуляции всего организма, исследование его нейронов в норме и при различных патологических состояниях представляет особый интерес.

В последние десятилетия имеет место неуклонный рост заболеваемости гепатобилиарной системы; существенный вклад в эту патологию вносит желчнокаменная болезнь: 10–15 % людей в промышленно развитых странах, 20 % европейцев и около 50 % американских индейцев страдают этим заболеванием [Konikoff F. M., 2003; Lammert F. et al., 2007; Lammert F., 2016; Li X. et al., 2017; Shabanzadeh D. M. et al., 2018]. Возникающее при этой патологии нарушение оттока желчи, приводит к ее застою (холестазу), прекращению поступления желчи в 12-перстную кишку и накоплению ее компонентов в крови. При этом уменьшается масса тела и всасывание в кишечнике жиров, витаминов А, Д, Е, К, а также кальция; в органах усиливаются процессы перекисного окисления липидов, изменяется текучесть мембран и активность Na^+/K^+ -АТФ-азы [Феофилов Г. Л. и др., 1992; Шерлок Ш. и Дули Дж., 1999]. В условиях холестаза отмечаются функциональные и морфологические изменения в ЦНС [Чепура С. В., 2003; Furukawa Y., 1991; Swain M. G. et al., Maric M., 1996; Rioux K. P. et al., 2001]. Однако целенаправленные комплексные морфологические работы по структурам мозга в динамике подпеченочного холестаза в литературе отсутствуют.

Для профилактики и лечения болезней печени и желчевыводящих путей, успешно применяют естественную желчную кислоту организма – урсодехоксихолевую. Однако она не использовалась ранее для коррекции негативных последствий холестаза для нейронов головного мозга, что представляет значительный интерес.

Отведение желчи широко используется в хирургической практике для декомпрессии желчевыводящих путей и облегчения состояния больных при холестазе. Однако реакция нейронов мозга при таком воздействии ранее не изучалась, также как и последствия для нейронов мозга самой потери желчи организмом. Поэтому экспериментальное исследование нейронов мозга при подпеченочном холестазе и потере желчи организмом представляется весьма интересным и значимым не только для фундаментальной, но и прикладной биологии и медицины. Это поможет выяснить роль желчи в регуляции структурно-метаболического состояния нейронов мозга, что может представлять интерес для установления последствий холестаза и потери желчи организмом, для разработки способов коррекции нарушений нейронов мозга при холестазе. Наша работа призвана восполнить пробел в этой области знаний.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Работа соответствует приоритетному направлению научных исследований Республики Беларусь № 04201 «Закономерности течения патологического процесса». Автор руководил выполнением темы № Ф00-1 «Динамика структурно-метаболических изменений в некоторых внутренних органах при моделировании нарушений деятельности гепатобилиарной системы» (2000–2002 гг., № гос. регистрации 20003555). Работа выполнялась также в рамках Государственной научной программы фундаментальных исследований «Изучение этиопатогенеза наиболее распространенных и вновь возникающих заболеваний человека и разработка на их основе новых медицинских технологий» по теме: «Изучение патогенетических механизмов хронизации воспалительных процессов печени, формирования холестаза и разработка способов их профилактики и лечения» (2002–2005 гг., № гос. регистрации 20021640) и «Современные клеточные и молекулярно-генетические технологии в медицине; новые подходы к регуляции коррекции (реабилитации) и профилактике патологических состояний человека» по теме: «Разработка критериев оценки степени патофизиологических и патоморфологических нарушений при заболеваниях внутренних органов на основе анализа метаболитов белкового и аминокислотного обменов и создание новых методов диагностики, профилактики, лечения и реабилитации больных» (2006–2009 гг., № гос. регистрации 20065772).

Цель и задачи исследования

Цель исследования – установить динамику и закономерности адаптационных и деструктивных перестроек нейронов головного мозга крысы при нарушениях циркуляции желчи и оценить возможности их медикаментозной и хирургической коррекции.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить структурные и гистохимические изменения в нейронах головного мозга крысы в ранний период подпеченочного холестаза (на 2–5 сутки после перевязки/перерезки общего желчного протока).
2. Выяснить морфофункциональное состояние нейронов мозга крысы в подострый период подпеченочного холестаза (на 10–20 сутки после перевязки/перерезки общего желчного протока).
3. Установить морфофункциональное состояние нейронов мозга в отдаленные сроки после перевязки/перерезки общего желчного протока (на 45 и 90 сутки).
4. Оценить эффективность урсодезоксихолевой кислоты для коррекции холестатических нарушений в нейронах мозга.

5. Выяснить причины естественного устранения холестаза после перевязки общего желчного протока у крыс.

6. Установить морфофункциональные изменения в нейронах головного мозга крысы в различные сроки (1, 3 и 5 суток) полного наружного отведения желчи из организма.

7. Оценить возможности хирургической коррекции нарушений нейронов мозга крысы при холестазах.

Объектом исследования служили нейроны разных слоев лобной и теменной доли коры головного мозга и коры мозжечка и гистаминергические нейроны гипоталамуса белых крыс.

Предметом исследования явились микро- и ультрамикроскопическая структура, гистохимические и иммуногистохимические свойства этих нейронов в условиях экспериментального нарушения тока желчи (подпеченочный холестаз и холестаз с коррекцией урсодезоксихолевой кислотой, полное наружное отведение желчи из организма, холестаз в течение 10 суток с последующим 3-суточным отведением желчи).

Научная новизна

Впервые проведено сравнительное комплексное количественное гистологическое, гистохимическое, иммуногистохимическое и электронномикроскопическое исследование разных типов нейронов головного мозга при нарушениях циркуляции желчи.

Впервые установлено, что как холестаз, так и отведение желчи, закономерно изменяют размеры, форму, внутреннюю структуру и метаболизм нейронов мозга, состояние их функциональных аппаратов: энергетического, синтетического, аппарата переваривания и защиты, вызывают повреждение клеточных мембран и органелл, сморщивание и гибель части нейронов. Показана динамика специфических молекулярных маркеров нейронов мозга при холестазах.

Установлены биологические причины естественного устранения холестаза у крыс в отдаленные сроки после перевязки/перерезки общего желчного протока, способствующие выживанию животных и нормализации структуры и метаболизма сохранившихся нейронов мозга.

Выявлены общие закономерности и особенности динамики деструктивных и адаптационных изменений нейронов разных отделов головного мозга при холестазах и потере желчи организмом.

Впервые показано корригирующее действие урсодезоксихолевой кислоты и кратковременного отведения желчи на нейроны мозга, нарушенные при холестазах.

В целом, проведенное исследование представляет собой новое научное направление в биологии – морфофункциональные перестройки нейронов мозга при нарушениях циркуляции желчи.

Положения, выносимые на защиту

1. При подпеченочном холестазае у крыс развиваются закономерные изменения микроскопического строения (размеров, формы, хроматофилии цитоплазмы), ультраструктуры и метаболизма (активности ключевых ферментов и содержания молекулярных маркеров) нейронов мозга, особенно коры мозжечка. Эти изменения появляются через 2–5 суток холестаза, через 10–20 суток достигают максимума, а затем постепенно исчезают.

2. Урсодезоксихолевая кислота оказывает защитное действие, предупреждая и корригируя холестатические нарушения в нейронах мозга.

3. Биологической причиной нормализации морфофункционального состояния сохранившихся нейронов мозга у выживших крыс в отдаленные сроки после перевязки/перерезки общего желчного протока является разрастание обходных желчевыводящих путей и восстановление оттока желчи.

4. Полная потеря желчи организмом крысы вызывает глубокие структурные и гистохимические нарушения во всех изученных типах нейронов мозга, особенно коры мозжечка. Они появляются через 1 сутки, через 3 суток нарастают и достигают максимума через 5 суток отведения желчи.

5. Трехсуточное отведение желчи у животных с 10-суточным холестазом частично нормализует морфофункциональные нарушения в нейронах мозга.

Личный вклад соискателя ученой степени

Патентно-информационный поиск, экспериментальная (включая хирургическое моделирование холестаза, наружного отведения желчи и холестаза с последующим отведением желчи) и методическая части работы выполнены диссертантом самостоятельно. Гистологическое, гистохимическое, морфометрическое, цитофотометрическое, электронно-микроскопическое, морфометрическое и статистическое исследования выполнены лично соискателем. Выбор темы, постановка задач, планирование экспериментов, обсуждение результатов исследования, написание статей и монографий осуществляли совместно с научным консультантом, соавторам (О. В. Барабан, О. А. Карнюшко, Е. Л. Красницкой, В. Б. Кузнецовой, С. А. Крупскому) совместных статей принадлежат от 10 до 35 %.

Основные научные результаты, представленные в диссертации, изложены в монографиях, статьях и тезисах докладов.

Влияние холестаза на нейроны коры мозга и мозжечка изучены совместно с С. М. Зиматкиным и отражены в монографии [1], статьях [5; 16; 17; 21; 31; 33], в материалах конференций [41] и тезисах докладов [65] – вклад диссертанта – 90 %, а так же в материалах конференций [37; 46; 47; 51], написаны без соавторов.

Влияние отведения желчи на нейроны коры мозга и мозжечка изучены совместно с С. М. Зиматкиным и отражены в монографии [2], статьях [10; 12; 13; 14; 15], в материалах конференций [40; 43; 48] – вклад диссертанта – 90 %, а

также в статьях [18; 19], материалах конференций [45; 49; 50; 52; 53], написаны без соавторов.

Влияние десятисуточного холестаза с последующим трехсуточным отведением желчи на нейроны коры мозга и мозжечка проведены совместно с С. М. Зиматкиным и отражены в монографии [3] и статье [11] – вклад диссертанта – 95 %.

Структурные и метаболические изменения гистаминергических нейронов мозга крыс при холестазе изучены совместно с С. М. Зиматкиным и О. В. Барабан и отражены в монографии [1] – вклад диссертанта – 90 %, в статьях [6; 8], в материалах конференции [36] и тезисах докладов [59; 61; 64] – вклад диссертанта – 70 %.

Изменения в гистаминергических нейронах гипоталамуса при потере желчи организмом исследованы совместно с С. М. Зиматкиным и отражены в монографии [2] – вклад диссертанта – 90 %, с С. М. Зиматкиным и О. В. Барабан и отражены в статьях [7; 9] – вклад диссертанта – 65 %, в материалах конференций [44] и тезисах докладов [58] – вклад диссертанта – 70 %.

Функциональная морфология гистаминергических нейронов мозга отражена в материалах конференции совместно с С. М. Зиматкиным, В. Б. Кузнецовой, О. В. Барабан [38; 39], в материалах конференций совместно с С. М. Зиматкиным и О. В. Барабан [42], вклад диссертанта – 65 %.

Иммуногистохимические исследования нейронов коры мозга и мозжечка при холестазе проведены совместно с С. М. Зиматкиным и О. А. Карнюшко: результаты опубликованы в статьях [20; 23; 25; 26; 27; 29; 30; 34], в материалах конференции и тезисы докладов [56; 57] – вклад диссертанта – 80 %, а так же в статьях [24; 28], материалах конференций и тезисах докладов [55; 66], написаны без соавторов.

Общие вопросы патогенеза реактивных изменений и гомеостаза нейронов мозга при холестазе и потере желчи исследованы совместно с С. М. Зиматкиным и отражены в монографиях [1; 2] и тезисах докладов совместно с С. М. Зиматкиным и О. В. Барабан [60; 63] – вклад диссертанта – 90 %, а так же в материалах конференций [54], написаны без соавторов.

Вопросы моделирования подпеченочного холестаза решены совместно с С. М. Зиматкиным и отражены в монографии [1] и в статье [22] – вклад диссертанта – 90 %.

Биохимические показатели крови при холестазе и желчи и крови при отведении желчи опубликованы совместно с С. М. Зиматкиным в статье [32] – вклад диссертанта – 90 %, совместно с Е. Л. Красницкой, С. М. Зиматкиным, О. В. Барабан в статье [4] – вклад диссертанта – 85 %, в материалах конференции совместно с С. М. Зиматкиным, Е. Л. Красницкой, О. В. Барабан, Л. С. Ольшевской [35] – вклад диссертанта – 65 %, и С. М. Зиматкиным

О. В. Барабан, С. А. Крупским в тезисах докладов [62] – вклад диссертанта – 85 %.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты диссертации доложены и обсуждены на: XI съезде Белорусского общества физиологов (Минск, 2006); Future Perspectives in Gastroenterology – Falk Symposium 161 (Dresden Germany, 2007); научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты физиологии» посвященная 50-летию кафедры нормальной физиологии ГГМУ (Гродно, 2009); республиканской конференции с международным участием «Актуальные теоретические и прикладные аспекты патофизиологии» (Гродно, 2010); VI международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Гродненского государственного университета имени Янки Купалы (Гродно, 2010); VIII международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии» (Гродно, 2012); Республиканской научно-практической конференции посвященной 250-летию профессора С. Б. Юндзиллы «Зоологические чтения–2012» (Гродно, 2012); Международной научно-практической конференции «Зоологические чтения–2017», посвященной памяти профессора К. М. Ельского (Гродно, 2017); IX, XI, XII и XIII международных научно-практических конференция «Актуальные проблемы экологии» (Гродно, 2014, 2016, 2017, 2018); XIV съезде Белорусского общества физиологов и III международной научной конференции к 95-летию со дня основания кафедры физиологии человека и животных БГУ и нормальной физиологии БГМУ: к 110-летию со дня рождения академика И. А. Булыгина (Минск, 2017); научно-практической конференции, посвященной 60-летию организации кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГрГМУ «Актуальные проблемы гистологии, цитологии и эмбриологии» (Гродно, 2018); Республиканской с международным участием научно-практической конференции, посвященной 60-летию ГрГМУ (Гродно, 2018); научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2018); научных семинарах кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГрГМУ (2015–2019).

Результаты исследований и выводы, сделанные на их основе, внедрены в учебный процесс учреждения образования «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», учреждения образования «Витебский государственный медицинский университет», учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» и учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» (получено 7 актов о внедрении).

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 66 печатных работ (из них единолично – 14): 3 монографии, 27 статей в журналах, включенных в перечень научных

изданий Республики Беларусь и Российской Федерации для опубликования результатов диссертационного исследования (38 авторских листов), 4 статьи в научных журналах (2 авторских листа), 22 материала и 10 тезисов докладов научных конференций. Общий объем опубликованных работ – 45 авторских листов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, пяти глав (обзор литературы, материал и методы исследования, три главы собственных исследований), заключения, библиографического списка и приложения. Работа изложена на 326 страницах: основной текст занимает 326 страниц, 310 рисунков, 206 таблиц и 4 приложения изложены на 142 страницах. Библиографический список состоит из 426 источников (из них 249 зарубежных), включая 66 авторских публикаций.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

В работе использовано 390 беспородных белых крыс самцов массой 225 ± 25 грамм. Контрольных и опытных животных содержали в стандартных условиях вивария, в индивидуальных клетках со свободным доступом к воде и полноценной пище. Материал взят от 228 выживших после операций животных (115 опытных и 112 контрольных) и использован для дальнейшего исследования. При проведении опытов соблюдали принципы гуманного обращения с животными. В соответствии с целью и задачами работы, были выполнены четыре серии экспериментов.

В первой серии оценивали эффективность различных вариантов моделирования холестаза. Для этого одной группе крыс на общий желчный проток (ОЖП) накладывали одну лигатуру, другой – две лигатуры, а животным третьей группы – две лигатуры между которыми ОЖП пересекали, как описано ниже. Далее, в разные сроки после операции выживших и погибших животных вскрывали и оценивали состояние ОЖП выше уровня перевязки (или его культю), а также состояние внутренних органов, а затем в культю ОЖП вводили черную тушь и оценивали ее прохождение по новообразованным желчным протокам в двенадцатиперстную кишку.

Во второй серии изучали нейроны головного мозга крыс в различные сроки (2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток) после перевязки/перерезки ОЖП [Кизюкевич Л. С., 2005]. Контрольным животным производили все те же манипуляции, только ОЖП не перевязывали и не пересекали, то есть сохранялся физиологический ток желчи. Дополнительным крысам с перевязкой/перерезкой ОЖП в течение 20 суток ежедневно, однократно, в утренние часы давали вместе с пищей

урсодезоксихолевую кислоту (УДХК) (Falk Pharma, Freiburg, Германия) из расчета 10 мг/кг массы животного [Rost D., et al., 2004] для исследования возможности коррекции последствий холестаза. Контролем служили крысы только с перевязкой/перерезкой ОЖП и ложно оперированные животные того же срока после операции.

В третьей серии изучали влияние полного наружного отведения всей желчи (1, 3 и 5 суток) на морфофункциональное состояние нейронов мозга крыс. Для этого опытным животным накладывали фистулу ОЖП по методике Л. С. Василевской [Василевская Л. С., 1965] с некоторыми изменениями и дополнениями [Емельянчик С. В., Зиматкин С. М., 2018]. Крысам контрольной группы производили ложную операцию: им делали все те же манипуляции, что и в опытной группе, только ОЖП не вскрывали, а катетер подшивали к брыжейке двенадцатиперстной кишки в том месте, где опытным животным проводили введение его в проток, то есть, сохраняли физиологическое течение желчи.

В четвертой серии изучали влияние последствий десятисуточного холестаза и последующего трехсуточного отведения желчи из организма на нейроны мозга крыс [Кизюкевич Л. С., 2005; Василевская Л. С., 1965]. Контролем служили животные через 13 суток после ложной операции, а также крысы через 13 суток после одной перерезки/перевязки ОЖП.

По истечении указанных сроков эксперимента животных выводили из эксперимента путем быстрой декапитации, в утренние часы (для синхронизации по времени). Тотчас извлекали головной мозг, вырезали лезвиями стандартные образцы лобной, теменной коры, коры мозжечка, гипоталамуса [Rachinos G., 2007].

Для **гистологического исследования** их фиксировали в жидкости Карнуа, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилолах и заливали в парафин. Серийные парафиновые срезы толщиной 5–10 мкм готовили с помощью микротомы LeicaRM 2125 RTS (Германия). Срезы окрашивали 0,1 % толуидиновым синим по методу Ниссля, гематоксилином и эозином. Для выявления погибших нейронов использовали метод Викторова [Victorov I. V., et al., 2000]. Материал для гистологического и гистохимического исследования от контрольных и опытных животных монтировали одним блоком. Это позволяло всегда делать срезы одинаковой толщины и проводить их обработку в идентичных условиях (за исключением гипоталамуса – здесь кусочки от каждого животного обрабатывали отдельно).

Для **гистохимического исследования** другие образцы тех же отделов мозга, предварительно заморозив парами азота, помещали для хранения в жидкий азот, а затем в криостате Leica CM 1840 (Leica Microsystems GmbH, Германия) (-15 °С) из них готовили срезы толщиной 10 мкм. Их обрабатывали для выявления оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса – сукцинатдегидрогеназы (СДГ; КФ 1.3.99.1); с пентозофосфатным путем – дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата (Г-6-

ФДГ; КФ 1.1.1.49); с транспортом электронов – дегидрогеназы восстановленного НАД (НАДН-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 G. Gomoi (1950). Содержание РНК выявляли по методу Эйнарсона с соответствующим контролем. Для идентификации и изучения специфического метаболизма гистаминергических нейронов мозга, криостатные срезы заднего гипоталамуса обрабатывали на выявление активности их маркерного фермента моноаминоксидазы типа Б (МАО Б; КФ 1.4.3.4) [Зиматкин С. М., Цыдик В. Ф., 1994; Зиматкин, С. М. и др., 2005]. Затем окрашенные срезы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилолах и заключали в полистирол.

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ). Образцы мозга животных фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде при +4 °С (на ночь), а затем заключали в парафин [Коржевский Д. Э. и др., 2016]. Стандартные парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы (Leica RM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Поскольку используемый метод фиксации не блокировал антигенны, их демаскировка не проводилась. В предварительных исследованиях из серии разведений первичных антител (от 1:100 до 1:3000) выбирали оптимальное (разведение с наибольшим соотношением сигнал/фон). Для всех антител оптимальным временем и температурой экспозиции выбрано 20 часов при +4 °С, во влажной камере.

Так, для иммуногистохимического выявления белка гена быстрого реагирования – *c-fos*, применяли первичные поликлональные кроличьи антитела против *c-fos* фирмы Abcam (Великобритания, ab. 209794) в разведении 1:1000. Для иммуногистохимического выявления белка депонирующего и транспортирующего кислород – *нейроглобина*, применяли первичные моноклональные мышинные антитела фирмы Abcam (Великобритания, ab. 37258) в разведении 1:600. Для иммуногистохимического выявления маркера крист митохондрий – *АТФ-синтазы*, применяли первичные моноклональные мышинные антитела фирмы Abcam (Великобритания, ab. 14748) в разведении 1:2400. Для иммуногистохимического выявления кальций-депонирующего белка – *кальбиндина-D28K*, применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Abcam (Великобритания, ab. 11426) в разведении 1:1200. Для выявления ГАМК-синтезирующего фермента – *глутаматдекарбоксилазы*, применяли первичные мышинные моноклональные антитела GAD-67 Abcam (Великобритания, ab. 26116) в разведении 1:2000. Для выявления всех вышеуказанных связавшихся первичных антител использовали Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit фирмы Abcam (Великобритания, ab. 80437).

Для выявления белка-активатора аутофагии – *AMBRA1*, применяли первичные кроличьи поликлональные антитела фирмы Bioassay Technology Laboratory (Китай, AP00299) в разведении 1:150. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System Elabscience (Китай, E-IR-R213).

Гистамин в гистаминергических нейронах мозга выявляли методом P. Panula et al. (1984).

При проведении ИГХ окрашивания в качестве положительного контроля для каждого из маркеров использовали структуры с известным высоким содержанием исследуемого белка, рекомендованные производителем антител. В качестве отрицательного контроля использовали срезы, которые вместо первичных антител обрабатывали нормальной кроличьей или мышьиной сывороткой (иммунопозитивная окраска в них отсутствовала). Дополнительным внутренним отрицательным контролем служили мозговые оболочки (иммунопозитивная окраска в них отсутствовала).

Визуальную оценку, микрофотографирование и морфометрию гистологических и гистохимических препаратов проводили при помощи светового микроскопа «Axioscop 2 plus» с цифровой видеокамерой «Axio Cam MR c5» (Carl Zeiss, Германия) и программы анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). В препаратах окрашенных по методу Ниссля, используя метод случайной выборки 10 полей зрения на площади в 1 мм^2 , подсчитывали общее количество нейронов, среди них: нормохромных, гипохромных, гиперхромных несморщенных, гиперхромных сморщенных, клеток-теней; а так же количество клеток нейроглии. Для оценки размеров и формы тел нейронов и их ядер на препаратах, окрашенных по Ниссля, 20–30 их изображений на мониторе компьютера обводили курсором, а компьютерная программа автоматически определяла и выдавала цифровые значения размеров (в мкм): минимальный и максимальный радиусы; периметр; площадь; объем и формы – фактор элонгации (отношение максимального и минимального диаметров) и форм-фактор (отношение 4-х площадей к периметру в квадрате). Количественную оценку активности изучаемых ферментов и иммунореактивности изучаемых молекулярных маркеров проводили цитометрически на максимуме поглощения окрашенного продукта реакции. В каждой экспериментальной группе оценивалось 150–200 нейронов (по 20–30 нейронов у каждого животного).

Электронно-микроскопическое исследование. Кусочки изучаемых отделов головного мозга контрольных и опытных животных фиксировали в течение 2 часов при $+4^\circ\text{C}$ в двух порциях 1 % раствора четырехоксида осмия (OsO_4), промывали в растворе буфера Миллонига (20 мл) + сахароза (900 мг), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (50 % и 70 %), смеси спирта и ацетона, ацетоне, проводили через смесь смол (аралдит М + аралдит Н +

дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона и заливали в эту смесь смол. Для уточнения локализации исследуемых структур мозга изготавливали полутонкие срезы толщиной около 350 нм на ультрамикротоме MT-7000 (RMC, США) с последующей окраской метиленовым синим. Ультратонкие срезы толщиной около 35 нм монтировали на опорные сеточки, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Полученные препараты изучали и фотографировали при помощи электронного микроскопа JEM 100CX II (JEOL, Япония) в Центре электронной микроскопии Института физиологии НАН Беларуси. Для более полного и объективного анализа ультраструктурных изменений происходящих в нейронах была произведена электронно-микроскопическая морфометрия по методу И. А. Морозова [Морозов И. А., 1976].

Биохимические исследования крови. Для контроля выраженности холестаза и состояния при этом печени, в конце эксперимента (через 2, 5, 10, 20, 45 и 90 суток – в серии с холестазом; через 1, 3 и 5 суток после операции – в серии с отведением желчи; через 13 суток в серии с 3-суточным отведением желчи после 10-суточного холестаза) в момент декапитации общепринятым методом производили забор смешанной крови. В плазме крови определяли количество и/или активность: холестерина (ммоль/л) энзиматическим колориметрическим методом; билирубина (мкмоль/л) (общего, прямого и непрямого) фотометрически; активность аспартатамино-трансферазы (АсАТ; КФ 2.6.1.1) и активность аланинаминотрансферазы (АлАТ; КФ 2.6.1.2) определяли оптимизированным энзиматическим кинетическим методом; активность щелочной фосфатазы (ЩФ; КФ 3.1.3.1) и активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ; L-лактат; НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27) определяли кинетическим методом [Камышников, В. С., 2002]. Активность всех ферментов выражали в U/L и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – в E/L. Расчет, произведенный в международных единицах соответствовал для 1 U/L – 16,67 нмоль/(с·л), а для 1 E/L – 16,67 нмоль/л (с·л). Биохимические исследования проводили в лабораториях учреждениях здравоохранения «Гродненская областная детская клиническая больница» и «Гродненская клиническая больница № 1» используя биохимический микроанализатор Architect С 8000 (Abbott Laboratories, США) и Biological alkali micro-analyzer, type: OP-266/1 (Radelkis, США).

В сериях с отведением желчи изучали некоторые **биохимические показатели желчи**. Так в двухчасовых порциях желчи, собранных через 0, 12, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после операции, определяли кинетическими методами количество желчных кислот (мг %), холестерина (ммоль/л), билирубина (общего, прямого и непрямого – в мкмоль/л), применяя стандартные наборы реактивов с использованием спектрофотометра Solar на базе лаборатории учреждения здравоохранения «Гродненская областная детская клиническая больница». Кроме того, определяли количество желчи за один час на 100 грамм массы животного

(мл/час/100 г). С целью исключения систематической ошибки измерений, обработку и анализ материала от контрольных и опытных крыс всегда проводили в идентичных условиях.

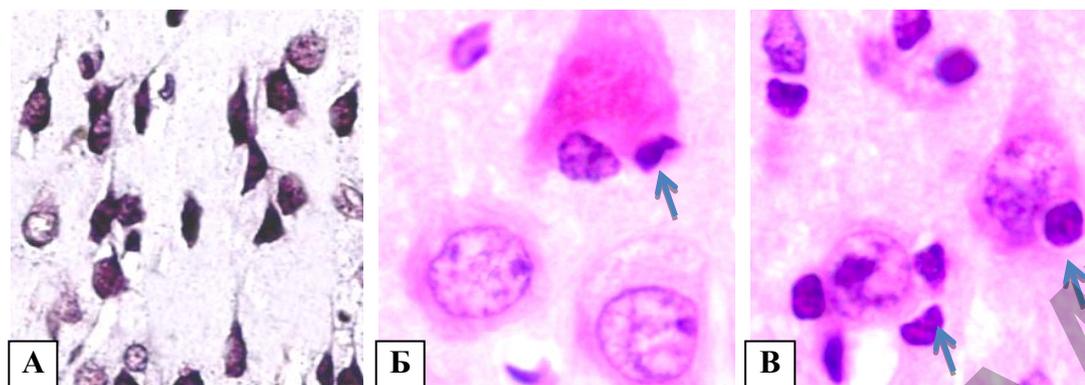
Статистическая обработка. Все полученные количественные данные подвергали статистическому анализу на персональном компьютере с помощью программы «Statistica for Windows» 6.0 с применением методов описательной статистики [Лакин Г. Ф., 1980]. Поскольку в данном исследовании использовали малые объемы выборки (крыс), которые не всегда имели нормальное распределение, для выявления различий между центральными параметрами (медиана) и интерквартильного диапазона (IQR) использовали непараметрический критерий U test Манна-Уитли (Mann-Whitney) для независимых выборок. При исследовании изменений в зависимых выборках биохимических показателей желчи, применяли непараметрический метод для сравнения двух зависимых групп с помощью критерия Вилкоксона. Для анализа влияния фактора времени на перевязку общего желчного протока или наружного отведения желчи применялся дисперсионный анализ. Использовали однофакторный ранговый метод Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis ANOVA test) [Реброва О. Ю., 2003]. Определяли достигнутый уровень значимости (p), причем критическое значение (вероятность ошибочной оценки) не превышало 5 % ($p < 0,05$).

Результаты собственных исследований

Нейроны мозга крысы после перевязки/перерезки общего желчного протока; коррекция урсодезоксихолевой кислотой

Лобная кора

Гистологические изменения. Через 2 и 5 суток после перевязки/перерезки ОЖП визуально значительные гистологические изменения в нейронах лобной коры не выявляются. Они обнаруживаются через 10 суток после операции. При этом в цитоплазме одних нейронов наблюдается частичный лизис хроматофильного вещества, а в других – гиперхроматоз. Во всех слоях коры определяются сморщенные нейроны: они выглядят темными, гиперхромными, иногда их апикальный дендрит расширен, приобретает штопорообразный вид. При этом ядра некоторых нейронов деформированы и сморщены. В некоторых нейронах выявляется вакуолизация цитоплазмы, встречаются и клетки-тени с бледной цитоплазмой и пузырьковидными ядрами. Во всех слоях коры наблюдаются сателлитоз и нейронофагия, погибшие нейроны. Применение УДХК несколько уменьшает количество поврежденных и погибших нейронов (рисунок 1).



Окраска по Нислю (А) и гематоксилин, эозином. Цифровая микрофотография.
Увелич. А – 200, Б, В – 1000

Рисунок 1. – Нейроны теменной коры мозга крысы через 10 суток холестаза:

А – сморщивание нейронов; Б, В – сателлитоз и нейронофагия (показаны стрелками)

Во 2 слое лобной коры холестаза в течение 10 суток приводит к значительному уменьшению числа нормохромных нейронов, но возрастанию числа гипохромных, гиперхромных несморщенных (в 2,1 раза), гиперхромных сморщенных (в 6,1 раза) нейронов и числа клеток-теней (в 10,6 раза). При этом количество погибших нейронов возрастает в 5,4 раза, а сумма нейронов уменьшается на 17,6 % ($p < 0,05$). Аналогичные, но более выраженные нарушения хроматофилии цитоплазмы развиваются в нейронах 3 и 5-го слоев коры. Через 45–90 суток после перевязки ОЖП гистологические изменения в нейронах лобной коры постепенно нормализуются. Однако количество нейронов на единицу площади среза лобной коры через 90 суток остается значительно сниженным, а глиальных клеток – повышенным (рисунок 2).

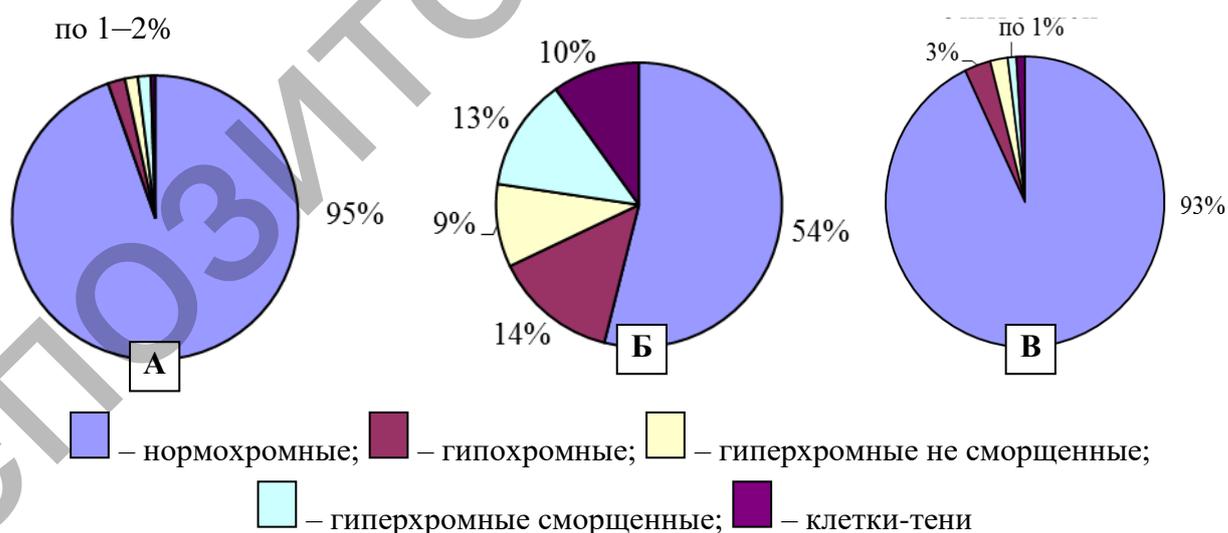


Рисунок 2. – Процентное содержание разных форм нейронов в 5-го слоя теменной коры в контроле (А, через 10 (Б) и 90 (В) суток после перевязки ОЖП

Через 2 и 5 суток холестаза в нейронах 5 слоя увеличивается площадь перикарионов и объем ядер на 5–6 % ($p < 0,05$). 10-суточный холестаза приводит к глубоким изменениям размеров и формы нейронов во всех слоях коры: так во 2 слое площадь перикарионов и ядер нейронов уменьшается на 21 % ($p < 0,01$);

аналогичные нарушения сохраняются и через 20 суток холестаза. Применение УДХК приводит к частичной нормализации размеров и формы нейронов. Через 45 и 90 суток после перерезки/перерезки ОЖП изученные морфометрические параметры в сохранившихся нейронах у выживших животных нормализуются.

Гистохимические изменения. Холестаз уже на 2-е сутки вызывает в нейронах 5 слоя коры снижение активности НАДН-ДГ на 16 %, содержания РНК на 8 % и усиление активности КФ на 17 % и ЛДГ на 24 %. 10–20-суточный холестаз вызывает более глубокие изменения активности ферментов и содержания РНК в нейронах, а УДХК частично нормализует эти показатели. Через 45 суток гистохимические изменения в сохранившихся нейронах уменьшаются, а через 90 суток полностью нормализуются.

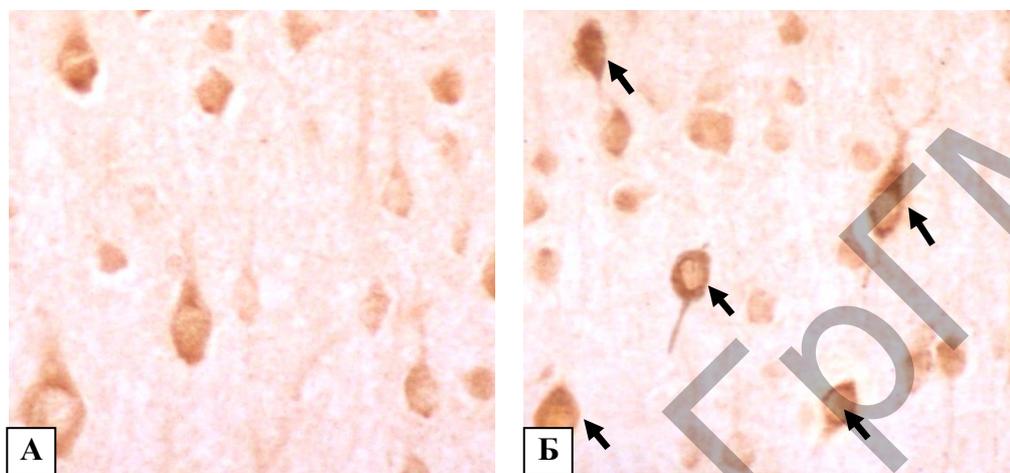
Иммуногистохимия. Уже через 2 суток холестаза во всех слоях лобной коры в 1,8–2,2 раза увеличивается количества нейронов с высокой иммунореактивностью белка гена быстрого реагирования *c-fos* ($p < 0,05$). Через 5 суток холестаза происходит дальнейшее увеличение числа таких нейронов (в 2,3–2,9 раза) ($p < 0,05$), при 10-суточном холестазае – в 1,8–2,7 раза, через 20 суток после перерезки ОЖП – в 1,5–3,2 раза ($p < 0,05$). Через 45 и 90 суток после перерезки ОЖП число *c-fos*-позитивных нейронов нормализуется (рисунки 3, 4).

Иммунореактивность маркерного белка митохондрий АТФ-синтазы через двое суток холестаза увеличена в цитоплазме нейронов 2, 3, 5 слоев коры на 12–14 % ($p < 0,05$), через 5 суток она увеличена в них на 20–27 % ($p < 0,001$), спустя 10 суток она, напротив, уменьшается на 15–23 % ($p < 0,01$), а через 20 суток – на 8–19 % ($p < 0,01$). Через 45 и 90 суток после перерезки ОЖП содержание АТФ-синтазы в нейронах нормализуется.

Содержание нейроглобина после перерезки ОЖП меняется волнообразно: через двое суток в нейронах 2, 3, 5 слоев коры снижается на 5–7 % ($p < 0,05$), после 5 суток – увеличивается на 12–13 % ($p < 0,05$), 10 суток – снижается на 5–12 % ($p < 0,05$), 20 суток – повторно возрастает на 7–10 % ($p < 0,01$), а через 45 суток – опять снижается на 7 % ($p < 0,05$). Через 90 суток во всех слоях коры в опыте и контроле различий в содержании нейроглобина не определено.

Содержание кальций депонирующего белка кальбиндина в исследуемых нейронах варьирует от слабой до высокой. Продукты иммуногистохимической реакции в виде темно-коричневых мелких и мельчайших гранул расположены по всему перикариону и видимых участках отростков. Иногда такие отростки напоминают «бусы», т. к. в них чередуются участки высокой и низкой иммунореактивности. На 2-е и 5-е сутки холестаза происходит увеличение количества кальбиндин-иммунопозитивных нейронов в слоях коры в 1,2–1,4 раза ($p < 0,05$), при 10-суточном холестазае – в 1,4–1,6 раза ($p < 0,05$), сопровождающееся увеличением содержания в них кальбиндина на 7–11 % ($p < 0,01$). 20-суточный холестаз приводит к увеличению количества клеток с высокой

иммунореактивностью кальбиндина в нейронах коры в 1,7–2 раза ($p < 0,05$), сопровождающихся увеличением содержания в них кальбиндина, особенно во 2 слое (на 26 %; $p < 0,001$). Через 45 и 90 суток в нейронах всех слоев коры в опыте происходит нормализация иммунореактивности кальбиндина.



Иммуногистохимическая реакция на c-fos. Увелич. 200. Цифровая микрофотография
Рисунок 3. – Иммунореактивность c-fos в нейронах лобной коры мозга крыс в контроле (А) и через 5 суток холестаза (Б)

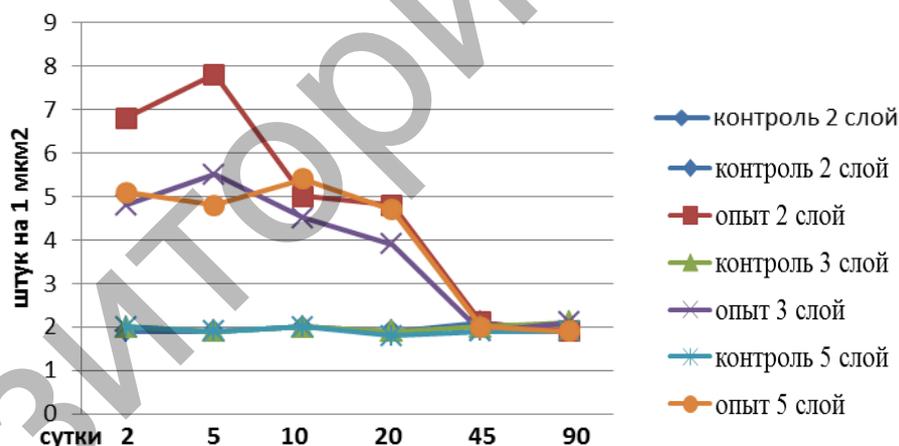


Рисунок 4. – C-fos в нейронах теменной коры крыс после перевязки/перерезки ОЖП

Содержание белка-активатора аутофагии AMBRA1 после 2-суточного холестаза возросло в нейронах 5 слоя на 8 % ($p = 0,017$), через 5 суток – в нейронах 2, 3 и 5 слоев – на 11–13 %, спустя 10 суток – на 13–18 %, а через 20 суток – на 5–16 % ($p < 0,05$). На 45 и 90 суток в нейронах 2, 3 и 5 слоев лобной коры изменений в иммунореактивности AMBRA1 не определено.

Электронномикроскопические изменения. При 10-суточном холестазае ядрышки нейронов смещены на периферию, видны скопления гранул РНП у кариолеммы перед выходом из ядра, более отчетливо становятся видны ядерные поры. В цитоплазме всех нейронов видны митохондрии с разрушенными

кристами и просветленным матриксом. Например в нейронах 3 слоя количество митохондрий снижается на 35 %, а средняя их площадь уменьшается на 45 % ($p < 0,001$). При этом степень их набухания увеличивается на 27 %, площадь поверхности крист снижается на 31 %, а коэффициент фрагментации крист возрастает на 46 % ($p < 0,01$). Площадь поверхности мембран гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС) уменьшается на 48 %, степень расширения ее цистерн увеличивается на 76 % ($p < 0,01$), количество связанных рибосом уменьшается на 68 % ($p < 0,01$). Площадь поверхности мембран гладкой эндоплазматической сети (ГлЭС) уменьшается на 58 % ($p = 0,004$), площадь поверхности мембран комплекса Гольджи возрастает на 46 %, а степень расширения его цистерн увеличивается на 70 % ($p < 0,01$). Количество лизосом возрастает на 44 %, а средняя площадь их увеличивается в 3,1 раза ($p < 0,01$). Подобные изменения определены и в других слоях коры.

Теменная кора

После перевязки/перезрезки общего желчного протока у крыс в теменной коре мозга развиваются аналогичные, но несколько более глубокие структурные/ультраструктурные и гистохимические/иммуногистохимические изменения, чем в лобной коре. Они также развиваются постепенно и максимального уровня достигают через 10–20 суток. После 45 суток (у выживших животных) они также частично, а через 90 суток в сохранившихся нейронах – полностью нормализуются. В отдаленные сроки в теменной коре также выявляются очаги «выпадения» нейронов во всех слоях, уменьшение в них общего числа нейронов, но увеличение числа глиальных клеток. УДХК также частично нормализует холестатические нарушения в нейронах теменной коры.

Мозжечок

Гистологические изменения. Холестаз в течение 2 и 5 суток не приводит к видимым изменениям в мозжечке на светооптическом уровне. На 10 сутки они выражены значительно. Так, в клетках Пуркинье (КП) выявляются деформированные (гантелиевидной формы) и увеличенные ядра с эксцентрично расположенными ядрышками. В цитоплазме одних КП происходит хроматолиз, в других – гиперхроматоз. Часто встречаются сморщенные КП. Аналогичная картина наблюдается и среди зернистых нейронов. УДХК снижает количество измененных и погибших нейронов коры мозжечка.

При подсчете клеток Пуркинье с разной хроматофилией цитоплазмы выявлено, что 10-суточный холестаз приводит к уменьшению числа нормохромных нейронов в 3 раза, число гиперхромных несморщенных нейронов увеличено в 3,8 раза ($p < 0,01$). Значительный процент составляют гипохромные, гиперхромные сморщенные и клетки-тени, которые в контроле не выявляются

совсем. Количество погибших КП, определяемых по методу Викторова, возрастает в 9,6 раза ($p < 0,05$), количество погибших зернистых нейронов при этом возрастает в 19 раз ($p < 0,01$). При подсчете числа КП через 90 суток обнаружено уменьшение их числа на 14 % ($p < 0,05$).

Через 2 суток холестаза уменьшаются размеры перикарионов и ядер КП и зернистых нейронов примерно на 5–7 % ($p < 0,05$). При 5-суточном холестаза в изученных клетках изменения нарастают. 10-суточный холестаза приводит к дальнейшему нарушению размеров и формы нейронов и их ядер: например, площадь КП уменьшается на 17 % ($p < 0,01$). Через 20 суток после перерезки ОЖП площадь клеток Пуркинье уменьшена на 10 %, а площадь зернистых нейронов – на 21 % ($p < 0,01$), а при холестаза с применением УДХК она не отличается от контроля. Подобная картина с показателями ядер зернистых нейронов. Таким образом, применение УДХК предупреждает и корригирует нарушения размеров и формы нейронов мозжечка, вызываемые холестаза.

Через 45 суток после перевязки/перерезки ОЖП в перикарионах и ядрах клеток Пуркинье и зернистых нейронах сохраняются небольшие изменения морфометрических показателей, а через 90 суток после перевязки/перерезки ОЖП они не отличаются от контроля.

Гистохимические изменения. Гистохимическое исследование показало, что холестаза в течение 2 суток приводит к уменьшению в клетках Пуркинье активности Г-6-ФДГ на 13 % и содержания РНК на 6,2 % ($p < 0,05$). При 5 и 10-суточном холестаза в изученных клетках гистохимические изменения нарастают еще больше.

20-суточный холестаза вызывает в нейропиле молекулярного слоя коры мозжечка снижение активности СДГ на 17 % ($p = 0,028$), в клетках Пуркинье – на 24 % ($p = 0,001$), а при холестаза с коррекцией УДХК они не отличаются от контроля. В зернистых нейронах тенденция сходная: здесь при холестаза падение активности СДГ составляет 25 % ($p = 0,001$), при применении УДХК – только 19 % ($p = 0,046$). Подобная картина с активностью НАДН-ДГ, Г-6-ФДГ, ЛДГ и содержанием РНК. УДХК также корригирует эти показатели.

Через 45 суток активность СДГ повышена в клетках Пуркинье на 5,7 % ($p = 0,048$), а через 90 суток после перевязки/перерезки ОЖП в изученных структурах коры мозжечка статистически достоверных различий не определено.

Имуногистохимические изменения. КП в норме имеют разную иммунореактивность с-fos: очень сильную, среднюю и слабую. Отростки их также иммунопозитивны – их можно проследить на видимом протяжении, а ядра – иммунонегативны. После двух суток холестаза в перикарионах КП происходит увеличение содержания с-fos на 13 % ($p = 0,002$), число зернистых нейронов с высокой иммунореактивностью с-fos увеличивается с 17 до 24 %. На 5 сутки холестаза содержание с-fos в клетках Пуркинье увеличено на 17 % ($p = 0,001$), а

число c-fos положительных зернистых нейронов возрастает до 27 %. На 10 сутки холестаза в КП содержание c-fos максимально возрастает (на 20 %; $p=0,003$), а число иммунопозитивных нейронов возрастает до 30 % от их общего числа. Через 20 суток холестаза содержание c-fos остается повышенным, а в последующем постепенно нормализуется.

После двух суток холестаза происходит увеличение иммунореактивности АТФ-синтазы в КП на 4,5 % ($p=0,01$), а после 5–10–20 суток холестаза происходит уменьшение ее на 17, 27 и 9,6 % ($p<0,001$), соответственно. В последующие сроки различий между контролем и опытом в изучаемых структурах мозжечка не определено. Иммунореактивность нейроглобина спустя двух суток холестаза в КП снижается на 15 %, через 5 суток – на 23 %, на 10–20 сутки – на 25 % и на 8,9 %, соответственно ($p<0,001$). Однако, спустя 45 суток отмечено увеличение его на 18 %, а через 90 суток – на 8 % ($p<0,001$). Содержание кальбиндина через двое суток холестаза в КП снижается на 17 % ($p=0,001$), через 5 суток холестаза она не отличается от контроля, а спустя 10 и 20 суток увеличивается на 27 % и 21 %, через 45 суток – на 13 %, а через 90 суток – на 12 % ($p<0,001$).

Содержание глутаматдекарбоксилазы (GAD-67), маркера ГАМК-ергических нейронов, после 2 суток холестаза в КП снижается на 10 % ($p=0,005$). 5, 10 и 20-суточный холестаз приводит, наоборот, к ее увеличению на 28, 41 и 33 % ($p<0,01$), соответственно. В дальнейшие сроки после перерезки ОЖП различий GAD-67 между опытом и контролем не выявлено. Содержание AMBRA1 в перикарионах КП через 2 суток холестаза повышено на 30 % ($p=0,000$), после 10 и 20 суток – на 40 и 7 %, соответственно ($p<0,001$). Через 45 и 90 суток после перевязки/перерезки ОЖП содержание AMBRA1 нормализуется.

Ультроструктурные изменения. После 10 суток холестаза в сохранившихся КП ядра несколько вытянуты, кариолема имеет сильно извитой ход и образует многочисленные складки. Наблюдается усиленный выход гранул РНП из ядра. Ядрышко в некоторых клетках может занимать маргинальное положение и увеличено в размерах.

Результаты морфометрии показали уменьшение площади поверхности мембран ГрЭС на 36 % ($p=0,005$) и расширение ее цистерн на 30 % ($p=0,013$). Сумма рибосом уменьшается на 42 % ($p=0,005$), из них связанные формы уменьшаются в 3,5 раза ($p=0,005$), а свободные увеличиваются на 33 % ($p=0,016$). Площадь поверхности мембран ГлЭС уменьшается на 53 % ($p=0,005$). Количество митохондрий снижается на 32 % ($p=0,011$), их средняя площадь уменьшается на 44 % ($p=0,005$), степень набухания увеличивается на 29 % ($p=0,005$), коэффициент фрагментации крист возрастает на 31 % ($p=0,013$). Площадь поверхности мембран комплекса Гольджи возрастает в 2,3 раза ($p=0,005$), степень расширения его цистерн увеличивается на 60 % ($p=0,011$). Количество лизосом возрастает в 2 раза

($p=0,005$), а средняя их площадь увеличивается в 3,8 раза ($p=0,005$). Подобные изменения происходят и в зернистых нейронах коры мозжечка.

Аналогичные изменения наблюдались и в клетках нейроглии (олигодендроциты и астроциты), а также в клетках эндотелия кровеносных капилляров, что может приводить к нарушениям гематоэнцефалического барьера.

Гистаминергические нейроны гипоталамуса

Изменения размеров и формы гистаминергических нейронов после перевязки ОЖП незначительны. Гистохимически через 5 суток холестаза в цитоплазме этих нейронов установлено увеличение активности ЛДГ на 14 % ($p=0,003$), НАДФН-ДГ – на 9,5 % ($p=0,004$), КФ – на 6,3 % ($p=0,042$), снижение активности СДГ на 8,3 % ($p=0,003$). Активность гистаминметаболизирующего фермента – МАО Б, а также НАДН-ДГ, Г-6-ФДГ остается на уровне контроля. После 10 суток холестаза активность МАО Б снижается на 23 %, СДГ – на 9,5 % ($p<0,05$). Активность остальных ферментов повышается: НАДН-ДГ – на 8,2 %, НАДФН-ДГ – на 20 %, Г-6-ФДГ – на 12 %, КФ – на 19 % и ЛДГ – на 15 % ($p<0,05$). Иммуногистохимически содержание гистамина в этих нейронах повышается. Через 20 суток после перевязки/перерезки ОЖП активность МАО Б и СДГ остается сниженной на 22 % и 12 %, соответственно ($p<0,05$). Активность остальных ферментов повышена: Г-6-ФДГ, НАДФН-ДГ, НАДН-ДГ и КФ на 6–21 % ($p<0,05$). Использование УДХК частично нормализует все гистохимические показатели.

Электронно-микроскопическое исследование после 10-суточного холестаза выявило признаки отека ядра в виде прозрачных зон, дисперсию хроматина. Кариолемма образует складки, иногда наружная мембрана образует выросты; складчатость плазмолеммы также увеличена. В цитоплазме определяются участки отека, с резким уменьшением количества органелл. Многие митохондрии набухшие с раздутым просветленным матриксом, имеют разрушенные кристы, хотя рядом могут быть внешне неизмененные органеллы. ГрЭС фрагментирована с редуцированным числом рибосом, расположенных неравномерно. Цистерны ее расширены, образуют везикулы различных размеров. Крайне редко встречаются элементы гладкой эндоплазматической сети. Комплекс Гольджи имеет расширенные цистерны. Отмечено появление фаголизосом с гетерогенной зернистостью внутри.

Биохимический контроль холестаза

С целью контроля наличия холестаза у экспериментальных животных после перевязки/перерезки ОЖП у крыс в сыворотке крови определяли некоторые биохимические маркеры-показатели холестаза [Камышников В. С., 2002]. Они полностью подтверждают эффективность моделирования подпеченочного

холестаза – наблюдается гипербилирубинемия, гиперхолестеринемия и гиперферментемия. По этим показателям после перевязки/перерезки ОЖП первые признаки холестаза появляются уже на 2 сутки после операции, нарастают на 5 и достигают максимума на 10–20 сутки. УДХК, получаемое опытными крысами в течение 20 дней после операции, частично нормализовало биохимические нарушения в крови. Затем, после разрастания обходных желчевыводящих путей у выживших животных, по биохимическим показателям крови происходит устранение холестаза. Остаточные биохимические изменения в крови сохраняются еще на 45 сутки, а на 90 сутки они полностью исчезают, что может быть критерием выздоровления [Камышников В. С., 2002]. Все эти биохимические изменения в крови хорошо коррелирует с установленными нами морфофункциональными изменениями у этих же животных в нейронах мозга.

Сравнение разных способов моделирования подпеченочного холестаза у крыс; выявление новообразованных желчевыводящих путей

Результаты исследования показали, что перевязка ОЖП одной лигатурой (первая группа), двумя лигатурами (вторая группа) и перерезки ОЖП между двумя лигатурами (третья группа) вызывают различную смертность животных. К концу эксперимента она составила 50, 62 и 78 %, соответственно. При этом максимальная гибель животных во всех группах отмечена в период 5–20 суток после операции. Единичная смерть крыс наблюдалась и позже, но животные, которые не погибли в течение 45 суток после операции, во всех группах остаются жить и далее. При этом у них происходит постепенное исчезновение признаков холестаза (нормализация биохимических показателей холестаза в крови, исчезновение желтухи, а также структурных и метаболических нарушений в мозге).

При введении выжившим крысам туши в ОЖП выше места перевязки (или его культю) через 10–20 суток после операции, у некоторых животных, особенно 1 и 2 группы, наблюдали заполнение 2–4 мелких (0,5–1 мм в диаметре) новообразованных желчевыводящих протоков и появление туши в двенадцатиперстной кишке. По-видимому, новообразование желчных протоков и восстановление оттока желчи в двенадцатиперстную кишку прямо влияет на выживаемость животных и зависит от способа моделирования холестаза. Через 45–90 суток после операции у всех выживших животных на вскрытии на месте ОЖП выше места перевязки или его культя обнаружен лишь спавшийся мешочек небольших размеров (<5 мл). При заполнении его тушью она всегда появлялась в двенадцатиперстной кишке, что подтверждает новообразование желчных протоков и восстановление нормального оттока желчи у всех выживших крыс.

Таким образом, уже в первые дни после перевязки ОЖП у крыс начинается разрастание обходных желчевыводящих путей и к 10 дню некоторые из них у

животных с лигатурой ОЖП, но без его перерезки, достигают двенадцатиперстной кишки, обеспечивая отток желчи и постепенное устранение холестаза, приводящее к выживанию этих животных и восстановлению строения и метаболизма в мозге. Если разрастание обходных желчевыводящих протоков не происходит или развивается слишком медленно, особенно в обход рубца, вызванного перерезкой ОЖП, холестаз и полиорганная недостаточность приводят к необратимым нарушениям в организме и неизбежной гибели животных.

Нейроны головного мозга при потере желчи у крыс **Лобная кора**

Гистологические изменения. Через 1 сутки после наружного отведения желчи на светооптическом уровне видимых изменений в нейронах нет. После 3-суточного отведения желчи выявлены сморщенные нейроны. Они расположены преимущественно в 3, реже во 2 и 5 слоях коры. При увеличении срока до 5 суток у всех животных в лобной коре наблюдаются многочисленные сморщенные и погибшие нейроны. Наблюдаются расширение и скручивание апикальных их дендритов, хроматолиз и вакуолизация в одних нейронах и гиперхроматоз – в других, явления сателлитоза и нейронофагии.

Отведение желчи в течение 5 суток приводит к уменьшению числа нормохромных нейронов, при этом количество гипохромных, гиперхромных сморщенных, клеток-теней и погибших нейронов увеличивается, наблюдается нейронофагия. Так, в 3 слое коры количество гипохромных нейронов возрастает в 2,5 раза ($p=0,007$), гиперхромных сморщенных – в 11,7 раза ($p<0,01$), клеток-теней – в 20 раз, количество погибших нейронов – в 6,2 раза ($p<0,01$), а общее количество нейронов уменьшается на 11 %. При этом количество клеток глии возрастает на 19,1 % ($p=0,004$). Подобные, но менее выраженные изменения наблюдались и в других слоях коры.

Изменения размеров нейронов начинаются уже через 1 сутки отведения желчи. Так во 2 слое периметр перикарионов уменьшается на 2,7 % ($p=0,025$), их площадь на 5,8 % ($p=0,004$), площадь ядер – на 7,2 % ($p=0,025$) ($p<0,01$). В 5 слое изменения размеров нейронов еще более выражены.

Гистохимические изменения. Отведение желчи в течение 1 суток уже приводит к увеличению активности ЛДГ на 11 % ($p=0,002$), в нейронах 3 слоя снижаются активности СДГ – на 6 % и НАДН-ДГ – на 11 % ($p=0,003$). В нейронах 5 слоя снижается активность НАДН-ДГ на 10 % ($p=0,003$) и повышается активность КФ на 23 % ($p=0,006$). 3-суточное отведение желчи приводит к угнетению активности СДГ в нейронах 2, 3 и 5 слоя коры на 38, 25 и 26 %, соответственно ($p<0,01$). Снижается также активность НАДН-ДГ, Г-6-ФДГ и содержания РНК. Маркерный фермент лизосом КФ после 3 суток эксперимента повышается в клетках всех слоев лобной коры на 31–39 % ($p<0,01$), по сравнению

с контролем, активностью ЛДГ также значительно возрастает в нейронах всех изученных слоев коры. 5-суточное отведение всей желчи вызывает еще более глубокие нарушения.

Ультраструктурные изменения. Наиболее выраженные изменения определяются после 5-суточного отведения желчи. Так, форма нейронов всех слоев коры становится весьма гетерогенной: встречаются как округлые, эллипсоидные, так и сильно вытянутые клетки. Ядра этих нейронов округлые, вытянутые, иногда сильно деформированные, с многочисленными складками. В большинстве своем ядрышки расположены эксцентрично, ближе к оболочке ядра с появлением «облака-тени» усиленной миграции субъединиц рибосом. В цитоплазме общее количество органелл уменьшено, гранулярная эндоплазматическая сеть фрагментирована. Наряду с митохондриями обычных размеров и формы, встречаются гигантские, сложной формы с разрушенными кристами. В комплексе Гольджи цистерны расширены, фрагментированы, деструктивно изменены, повсеместно определяются фаголизосомы. Ультрамикроскопическая морфометрия нейронов 2 слоя выявила уменьшение количества связанных рибосом – в 3,6 раза ($p=0,004$) и увеличении средней площади лизосом – в 2,2 раза ($p=0,002$). Аналогичные изменения отмечены в нейронах 3 и 5 слоях лобной коры мозга крыс.

Таким образом, полная потеря желчи организмом приводит к нарастающим ультраструктурным нарушениям в нейронах всех слоев лобной коры, которые коррелируют с гистологическими и гистохимическими изменениями в этих нейронах. Так, разрушение митохондрий сопровождается угнетением их маркерных ферментов СДГ и НАДН-дегидрогеназы, увеличение числа и размеров лизосом сопровождается активацией их маркерного фермента – кислой фосфатазы, а уменьшение числа рибосом – снижением в цитоплазме нейронов содержания РНП.

Теменная кора

Гистологические изменения. В теменной коре после 3 суток отведения желчи определяются сморщенные и погибшие нейроны, последние располагаются поодиночке или группами. Несколько чаще они встречаются в 3 слое коры. Отведение желчи в течение 5 суток вызывает сморщивание нейронов во всех слоях теменной коры. Форма у них вытянутая, встречаются явления гиперхроматоза, расширение апикального отростка штопорообразной формы. Кроме того, в нейронах 3 и 5 слоев обнаружены клетки-тени, случаи сателлитоза и нейронофагии.

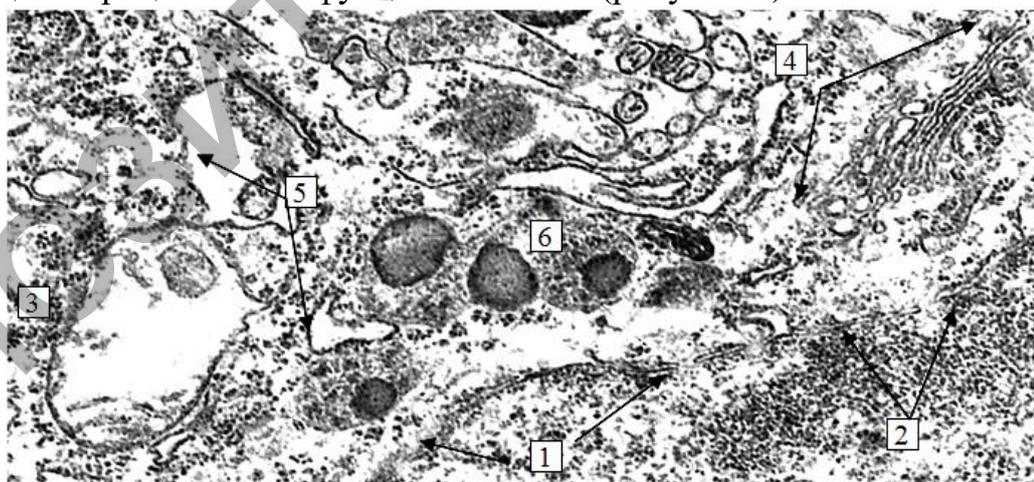
При оценке хроматофилии нейронов 2 слоя коры после 5 суток отведения желчи количество гипохромных форм увеличивается в 4 раза ($p=0,004$), гиперхромных несморщенных нейронов – в 2,6 раза ($p=0,004$), гиперхромных

сморщенных – в 32 раза ($p=0,004$), а клеток-теней – в 24 раза ($p=0,004$). Сумма нейронов уменьшается на 24 % ($p=0,004$). Количество погибших нейронов, определяемых по методике Викторова, возрастает в 24 раза ($p=0,002$). Количество клеток глии увеличивается на 35 % ($p=0,004$). Подобная картина выявляется и в 3, 5 слоях теменной коры.

Отведение желчи у крыс приводит к значительному уменьшению размеров перикарионов и ядер нейронов всех слоев теменной коры. При этом перикарионы и ядра теряют сферичность и резко вытягиваются, что соответствует сморщиванию большого числа нейронов.

Гистохимические изменения. Уже через 1 сутки отведения желчи из организма во 2 слое коры активности маркерных ферментов митохондрий значительно и достоверно снижаются: СДГ – на 24 %, НАДН-ДГ – на 28 % ($p<0,05$). В нейронах 5 слоя угнетена НАДН-ДГ – на 14 % и Г-6-ФДГ – на 28 % ($p<0,05$). Аналогичные, только еще более выраженные, изменения отмечаются после 3–5 суток отведения желчи.

Ультраструктурные изменения. Через 3 суток отведения желчи во всех слоях теменной коры появляются сморщенные, вытянутой формы нейроны с вытянутым, подковообразным ядром. Кариолемма образует многочисленные глубокие складки, причем в некоторых участках она может быть размытая, нечеткая. Ядрышко может достигать гигантских размеров и находиться по краю ядра, у кариолеммы. В цитоплазме появляются участки ГрЭС с расширенными цистернами, лишенными рибосом, гигантские митохондрии с разрушенными кристами, гипертрофированный комплекс Гольджи и фаголизосомы, локальные участки дегенерации и липофусциновые тела (рисунок 5).



Увелич. 11800. Электронная микрофотография

1 – кариолемма местами разрушена; 2 – выход РНП через поры из ядра; 3 – митохондрия с разрушенными кристами; 4 – гипертрофированный комплекс Гольджи; 5 – расширенные цистерны ГрЭС; 6 – фаголизосомы

Рисунок 5. – Участок нейрона 3 слоя теменной коры мозга крысы через 5 суток отведения желчи

Ультрамикроскопическая морфометрия нейронов показала нарушения всех исследованных показателей ультраструктуры в пределах от 15 % до 87 %. Наибольшие изменения определены для площади поверхности мембран гладкой эндоплазматической сети (ГлЭС) – она уменьшается в 2,5 раза ($p=0,003$), при этом средняя площадь лизосом увеличивается в 2,4 раза ($p=0,002$). 5-суточное отведение желчи еще более усугубляет выявленные нарушения нейронов теменной коры мозга крыс.

Таким образом, первым, уже через сутки полного отведения желчи, появляется угнетение окислительных ферментов митохондрий и пентозофосфатного пути, уменьшение размеров и сморщивание нейронов всех слоев теменной коры. Через 3 и, особенно, 5 суток отведения желчи метаболические и деструктивные нарушения нейронов нарастают, что приводит к гибели части нейронов.

Мозжечок

Гистологические изменения. В коре мозжечка после 3 суток отведения желчи наибольшие изменения наблюдаются в клетках Пуркинье. Происходит гибель части из них, в виде участков (очагов) выпадения нейронов. Форма КП меняется и становится разнообразной: вытянутой, овальной, треугольной и уже не соответствует грушевидной. Встречаются сморщенные нейроны. При продлении отведения желчи до 5 суток в сохранившихся нейронах выявлена деформация ядер, набухание или отсутствие ядрышек. Встречаются КП у которых расширены дендриты, выявляется лизис хроматофильной субстанции.

При отведении желчи в течение 5 суток количество гиперхромных не сморщенных КП возрастает в 3,8 раза, гиперхромных сморщенных – в 34 раза, а клеток-теней – в 7,5 раза ($p<0,05$). Количество погибших КП, определяемых по методу Викторова, возрастает в 28 раз, а зернистых нейронов – в 38 раз ($p<0,01$).

При суточном отведении желчи в перикарионах КП мозжечка уменьшается площадь на 11 % ($p=0,01$) и возрастает фактор элонгации – на 6 % ($p=0,025$), Ядра этих нейронов также уменьшаются в размерах, вытягиваются и становятся менее сферичными. Перикарионы зернистых нейронов также уменьшаются в размерах (на 9–17 %), в их ядрах картина противоположная – увеличение всех показателей на 6–15 %. При продлении отведения желчи до 3 и 5 суток происходит еще большее уменьшение размеров, потеря сферичности и удлинение перикарионов и ядер КП и зернистых нейронов коры мозжечка.

Гистохимические изменения. 1-суточное отведение желчи из организма угнетает только НАДН-ДГ в КП на 16 % ($p=0,004$). 3-суточное отведение желчи в молекулярном слое коры мозжечка снижает активность СДГ на 16 %, в КП – на 35 %, а в зернистых нейронах – на 15 % ($p<0,01$), НАДН-ДГ, Г-6-ФДГ и содержания РНК. При этом активность КФ в КП возрастает на 9 % ($p=0,001$), а в

клетках зернистого слоя на 46 % ($p=0,011$). Активность ЛДГ возрастает в КП на 15 %, а зернистых нейронах – на 52 % ($p<0,01$). 5-суточное отведение желчи приводит к еще большему падению активности СДГ, НАДН-ДГ, Г-6-ФДГ и содержания РНК, а также возрастанию активности КФ и ЛДГ в нейронах коры мозжечка.

Ультраструктурные изменения. Отведение желчи приводит к сморщиванию и вытягиванию тел КП и их ядер. Кариолема местами нечеткая, размытая, с повреждениями, образует глубокие складки, перинуклеарное пространство расширено. В цитоплазме КП отмечается расширение каналов ГрЭС, на которых уменьшено количество рибосом. Митохондрии в своей массе набухшие, с разрушенными кристами и просветленным матриксом, в некоторых из них наружная мембрана разрушена. Комплекс Гольджи гипертрофирован, характерные скопления его цистерн встречаются чаще, иногда они расширены, иногда образуют сплошные тяжи, к которым могут вплотную прилежать митохондрии. Выявляется большое количество лизосом и особенно фаголизосом. Нередко встречаются локальные участки дегенерации цитоплазмы – образования характерного бесформенного вида, включающие в себя мелкие гранулы и плотные гомогенные массы.

По результатам морфометрии установлено, что после 5 суток отведения желчи в клетках Пуркинье происходит изменение всех изученных показателей от 20 % до 43 %. Наибольшие изменения определены для связанных форм рибосом – они уменьшаются в 3,2 раза ($p=0,003$); площадь поверхности мембран комплекса Гольджи возрастает в 2,1 раза ($p=0,003$); количество лизосом возрастает в 2,3 раза ($p=0,003$), а средняя их площадь увеличивается в 4,6 раза ($p=0,003$). В зернистых нейронах встречаются те же изменения, что и в клетках Пуркинье.

Таким образом, отведение желчи из организма приводит к нарастающим структурным и гистохимическим изменениям, гибели части нейронов коры мозжечка. При этом все изменения более выражены, чем в нейронах коры мозга и после 10-суточного холестаза.

Гистаминергические нейроны гипоталамуса

Гистологические изменения. После 1-суточного отведения желчи периметр гистаминергических нейронов уменьшается на 4,4 % ($p=0,035$). При отведении желчи в течение 3 суток нейроны округляются: их форм-фактор увеличивается на 8,3 % ($p=0,008$). Отведение желчи в течение 5 суток не приводит к статистически достоверным изменениям размеров и формы гистаминергических нейронов, что указывает на их относительную устойчивость к потере желчи организмом, по сравнению с филогенетически более молодыми корковыми нейронами больших полушарий и мозжечка.

Гистохимические изменения. После первых суток отведения желчи в гистаминергических нейронах активность СДГ уменьшается на 7 %, активность Г-6-ФДГ на 4 %; при этом активность КФ возрастает на 10 % ($p < 0,05$). Отведение желчи в течение 3 суток снижает активность МАО Б на 13 %, СДГ – на 12 %, НАДН-ДГ – на 5,4 %, НАДФН-ДГ – на 13 %, Г-6-ФДГ – на 8,5 % ($p < 0,01$), при одновременном увеличении активности КФ – на 14 % и ЛДГ на 16 % ($p < 0,01$). Потеря желчи организмом в течение 5 суток приводит к еще более существенным изменениям активности изучаемых ферментов в гистаминергических нейронах. Так, активность МАО Б снижается на 15 %, СДГ – на 16 %, Г-6-ФДГ – на 15 %, НАДН-ДГ – на 13 %, НАДФН-ДГ – на 16 %, ЛДГ – на 18 % ($p < 0,01$). Только активность маркерного фермента лизосом – КФ повышается на 24 % ($p = 0,002$).

Иммуногистохимические изменения. Отведение желчи из организма в течение 5 суток приводит к уменьшению содержания гистамина в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса.

Ультраструктурные изменения. Через 3 суток отведения желчи кариолема гистаминергических нейронов гипоталамуса становится складчатой, перинуклеарное пространство на некоторых участках сильно расширено. Гетерохроматин, в виде больших масс, расположен маргинально, ядрышки встречаются реже у кариолеммы. В цитоплазме ГрЭС местами фрагментирована, количество на ней рибосом снижено, но появляется большее количество свободных рибосом. В митохондриях встречаются разрушенные кристы, просветленный матрикс. Появляется большее количество фаголизосом. Отведение желчи из организма в течение 5 суток приводит к еще более значительным нарушениям ультраструктуры изученных нейронов.

В целом, при потере желчи организмом крысы структурные и гистохимические изменения в гистаминергических нейронах гипоталамуса выражены гораздо меньше, чем в нейронах коры мозга и мозжечка.

Холестаз с последующим отведением желчи

Лобная кора

Трехсуточное отведение желчи полностью не устраняет, но корректирует структурные нарушения вызванные 10-суточным холестазом. Так, по-прежнему, выявляются сморщенные нейроны, выявляется большое количество гиперхромных несморщенных нейронов. При окраске по методу Викторова во всех слоях коры определяются погибшие нейроны. При этом площадь перикарионов уменьшена на 16–18 % ($p < 0,01$), а форма нейронов не изменена.

10-суточный холестаз и последующие 3 суток отведения желчи из организма у крыс вызывает в нейронах разных слоев лобной коры снижение активности СДГ на 24–34 % ($p < 0,01$), активности НАДН-ДГ – на 10–20 % ($p < 0,05$), то есть изменения меньше, чем при одном 10-суточном холестазе.

Теменная кора

При 10-суточном холестазах и последующее отведение желчи в течение 3 суток во всех слоях коры, кроме сморщенных, выявляются погибшие нейроны. Отмечены процессы сателлитоза и нейронофагии, деформация ядер нейронов, вакуолизация их цитоплазмы, расширение апикальных отростков, уменьшению площади перикарионах и ядер нейронов. В целом трехсуточное отведение желчи несколько корректирует структурные нарушения вызванные 10-суточным холестазом.

Трехсуточное отведение желчи несколько корректирует, но полностью не устраняет гистохимические нарушения вызванные 10-суточным холестазом. Так, активность СДГ остается сниженной во 2, 3 и 5 слоях коры на 32 %, 41 и 13 %, соответственно ($p < 0,05$), активность НАДН-ДГ во 2 слое снижается на 10 % ($p = 0,006$), а в 3 и 5 слоях снижение не меняется. Активность Г-6-ФДГ в перикарионах нейронов всех слоев снижена на 6–18 % ($p < 0,05$). При этом активность КФ повышена на 8–44 % ($p < 0,01$), а активность ЛДГ – на 14–29 %, кроме 3 слоя, где она снижена на 10 % ($p = 0,006$). При этом содержание РНК уменьшено в 3 и 5 слоях на 11 % ($p < 0,01$).

Кора мозжечка

При 3-суточном отведении желчи после 10-суточного холестаза сохраняется сморщивание КП и гиперхроматоз их цитоплазмы. Выявляются также погибшие нейроны. В КП и зернистых нейронах площадь перикарионов и ядер уменьшается. При этом активность СДГ в КП существенно не изменена, а в зернистых нейронах снижена на 25 % ($p = 0,006$). Активность НАДН-ДГ в КП снижена на 12 % ($p = 0,006$), активность Г-6-ФДГ угнетена в КП и зернистых нейронах соответственно на 12 и 27 % ($p < 0,05$). Кислая фосфатаза в КП увеличена на 8 %, а ЛДГ – на 26 % ($p < 0,05$). Содержание РНК уменьшено в КП и зернистых нейронах на 13 и 9 % ($p < 0,05$).

Следовательно, 3-суточное отведение желчи частично нормализует структурные и гистохимические изменения в нейронах мозга, вызванные 10-суточным холестазом. Кроме того, 3-суточное отведение желчи частично нормализует и биохимические параметры крови, нарушенные при 10-суточном холестазах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. При холестазах, вызванном перевязкой/перерезкой общего желчного протока (ОЖП) у крыс, адаптационные и деструктивные изменения в нейронах мозга в своем развитии проходят три периода: начальный, период ранней адаптации и морфофункциональных изменений (2–5 сутки), период дезадаптации и тяжелых нарушений (10–20 сутки) и период восстановления (45–90 сутки, у выживших животных). Контролем холестаза в начальный период является повышение билирубина на 57–63 % и холестерина на 13 % ($p < 0,01$) в крови, а на вскрытии – застой желчи в культе ОЖП и желтушное окрашивание серозных оболочек. В начальный период холестаза в цитоплазме нейронов лобной, теменной коры и коры мозжечка возрастает содержание белка гена быстрого реагирования *c-fos* – количество *c-fos* иммунопозитивных нейронов возрастает в 1,8–2,9 раза ($p < 0,05$) и маркерного белка крист митохондрий – АТФ-синтазы – на 7–21 % ($p < 0,01$). Однако, активность ферментов митохондрий сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ) в этот период снижена на 5–8 % и 4–19 % ($p < 0,05–0,01$), соответственно, а лактатдегидрогеназы (ЛДГ) повышена на 4–24 % ($p < 0,05$), что свидетельствует о ранних нарушениях функций митохондрий и компенсаторной активации анаэробного гликолиза. При этом в цитоплазме нейронов снижается содержание РНК на 6–12 % ($p < 0,01$). Уже в этот период в цитоплазме нейронов увеличивается содержание белка-активатора аутофагии AMBRA1 на 5–30 % ($p < 0,05$) и активность маркерного фермента лизосом – кислой фосфатазы на 17 % ($p < 0,01$), что свидетельствует об усилении процессов аутофагии, для удаления поврежденных мембран и органелл. Содержание кальций-связывающего белка кальбиндина уже в начальный период холестаза меняется: в одних нейронах снижается, а в других возрастает, что может приводить к нарушению обмена кальция и возбудимости нейронов [1; 17; 21; 23; 25; 27; 28; 29; 34; 36; 41; 51; 56; 59; 64; 65; 66].

2. На 10–20 сутки холестаза (подтверждается возрастанием в крови билирубина на 37–86 % и холестерина на 25–13 % ($p < 0,01$), а также активности маркерных печеночных ферментов: щелочной фосфатазы – на 16–61 %, ЛДГ – на 17–32 %, АлАТ – на 33–71 % (везде $p < 0,01$) и АсАТ – на 11–29 % ($p < 0,05$), переполнением желчью культы ОЖП и сильной желтушностью внутренних органов на вскрытии), морфофункциональные нарушения в нейронах мозга достигают максимума: число гиперхромных, сморщенных нейронов возрастает в 2,6–6,1 раза ($p < 0,01$) и клеток-теней – в 10–14 раз ($p < 0,01$), наблюдается сателлитоз и нейрофагия, очаговая гибель нейронов. Это сопровождается уменьшением общего числа нейронов в разных отделах мозга на 18–27 % ($p < 0,01$) и увеличением числа клеток нейроглии на 25–49 % ($p < 0,05$). При этом

перикарионы нейронов и их ядра, особенно в 3 и 5 слоях коры, уменьшаются в размерах на 5–29 % ($p < 0,01$) и вытягиваются (фактор элонгации увеличивается на 25–27 %; $p < 0,05$). Морфологические признаки апоптоза не встречаются, что подтверждает гибель нейронов преимущественно путем некроза. На ультраструктурном уровне наблюдаются признаки активации ядерного аппарата нейронов: гипертрофия ядрышек со смещением их к кариолемме и появлением скоплений субъединиц рибосом мигрирующих в цитоплазму, увеличение складчатости и размытость кариолеммы, расширение перинуклеарного пространства. При этом в цитоплазме нейронов уменьшено число связанных рибосом на 40–68 % ($p < 0,002$), но увеличено числа свободных рибосом на 20–47 % ($p < 0,05$), что свидетельствует о перестройке биосинтеза белка, как проявление адаптации нейронов, способствующей их выживанию в экстремальных условиях [1; 17; 21; 37; 61].

3. В этот период в нейронах нарастают признаки нарушения структуры и метаболизма, свидетельствующие о срыве адаптации нейронов в условиях продолжающегося холестаза. Так, разрушение митохондрий, значительное снижение АТФ-синтазы на 8–25 % ($p < 0,001$), активности СДГ на 21–46 % и НАДН-дегидрогеназы на 9–43 % ($p < 0,01$), а также активности фермента пентозофосфатного пути Г-6-ФДГ на 17–52 % ($p < 0,05$) и адаптационной активации ЛДГ на 25–50 % ($p < 0,05$), отражают нарушения энергетического обеспечения нейронов. Повреждение ГрЭС, снижение числа связанных рибосом, сопровождающихся снижением содержания РНП в цитоплазме на 16–22 % ($p < 0,05$), отражают угнетение белоксинтетического аппарата клетки. Выявляются нейроны с мультивезикулярными тельцами, участками дегенерации и прилежащими глиальными макрофагами. В этот период во всех нейронах максимально возрастает содержание белка-активатора аутофагии AMBRA1 – на 2–40 % ($p < 0,05$ – $0,0001$), число (на 31–50 %; $p < 0,05$) и размеры (на 64–69 %; $p < 0,01$) лизосом, сопровождающихся активацией кислой фосфатазы (на 28–55 %; $p < 0,05$), что свидетельствует об усилении процессов аутофагии в нейронах для удаления поврежденных мембран и органелл, количество которых в этот период максимально возрастает. Выявленные ультраструктурные изменения соответствуют структурным нарушениям на светооптическом уровне и гистохимическим изменениям. При этом наибольшие морфофункциональные нарушения при холестазе, среди изученных типов нейронов мозга, выявлены в клетках Пуркинье мозжечка, а наименьшие – в гистаминергических нейронах гипоталамуса [1; 5; 8; 16; 20; 24; 26; 30; 46; 47; 55; 56; 62; 63].

4. Выявленные ультраструктурные изменения при нарушениях циркуляции желчи хорошо дополняют и согласуются с гистологическими и гистохимическими изменениями в нейронах мозга. Так, повреждение митохондрий сопровождается угнетением их маркерных ферментов СДГ и

НАДН-дегидрогеназы и содержания АТФ-синтазы, уменьшение числа рибосом и фрагментация ГрЭС сопровождается снижением в цитоплазме содержания РНК, а усиление иммунореактивности белка-активатора аутофагии AMBRA1 – с увеличением числа и размеров лизосом и активности их маркерного фермента, кислой фосфатазы. Это указывает на преимущества комплексного исследования нейронов мозга при морфофункциональной оценке их состояния при нарушениях циркуляции желчи [1; 2; 27; 28].

5. Применение урсодезоксихолевой кислоты в первые 20 дней после перевязки/перерезки ОЖП оказывает защитное действие, уменьшая холестаза (снижает уровень билирубина на 11 % ($p < 0,05$), холестерина – на 14 % ($p < 0,05$) и активности маркерных печеночных ферментов – на 18 % ($p < 0,01$), уменьшает структурные и гистохимические изменения во всех изученных типах нейронов мозга крыс – на 5–10 % ($p < 0,01$) [3; 6; 60].

6. В период восстановления (45–90 сутки после перевязки/перерезки ОЖП) при возобновлении оттока желчи и устранения холестаза (подтверждается нормализацией биохимических показателей крови, прекращением гибели животных, уменьшением культуры ОЖП и желтушности на вскрытии) в результате успешного прорастания обходных желчевыводящих протоков (подтверждается их выявлением при наливке культуры ОЖП тушью и ее поступлением в двенадцатиперстную кишку) у выживших животных, в сохранившихся нейронах, выявленные нарушения постепенно уменьшаются, а через 90 суток исчезают. Это свидетельствует о высоких адаптационных возможностях организма крысы в целом и нейронов их мозга к холестазу. К отдаленным последствиям холестаза (90 сутки) можно отнести очаги выпадения (отсутствия) нейронов во всех слоях коры мозга и мозжечка, уменьшение в них общего числа нейронов на 17–21 % ($p < 0,05$) и повышенное число глиальных клеток на 6–34 % ($p < 0,05$) [1; 22; 33].

7. Полная потеря желчи организмом вызывает нарастающие структурные и гистохимические изменения в нейронах головного мозга крысы (2, 3 и 5 слоях фронтальной и теменной коры, коры мозжечка и гистаминергических нейронов гипоталамуса). Уже через сутки после начала отведения желчи, происходит уменьшение размеров на 4–12 % ($p < 0,05$), сморщивание нейронов и угнетение в них окислительных ферментов митохондрий на 26–52 % ($p < 0,01$). Через 3 суток изменения нарастают и достигают максимума через 5 суток отведения желчи. При этом во всех изученных типах нейронов стереотипно снижается активность: СДГ – на 27–53 % ($p < 0,01$), НАДН-ДГ – на 24–51 % ($p < 0,002$), Г-6-ФДГ – на 40–58 % ($p < 0,01$), содержание РНК – на 32–64 % ($p < 0,001$) и количество гистамина (в области расположения гистаминергических нейронов) на 17 % ($p < 0,01$), но возрастает активность ЛДГ – на 31–73 % ($p < 0,002$) и КФ – на 25–86 % ($p < 0,002$) [2; 4; 7; 10; 12; 13; 14; 15; 32; 35; 40; 43; 49; 57; 58].

8. Ультраструктурные нарушения в динамике полного наружного отведения желчи также нарастают и характеризуются изменением формы ядер, локальным разрушением кариолеммы, расширением цистерн ГрЭС на 22–88 % ($p < 0,01$), уменьшением количества связанных рибосом на 40–360 % ($p < 0,01$), что свидетельствует о глубоких нарушениях белоксинтетического аппарата нейронов. Уменьшаются количество (на 16–46 %; $p < 0,01$) и площадь (на 33–53 %; $p < 0,05$) митохондрий, их матрикс просветляется, нарастает фрагментация крист (на 22–41 %; $p < 0,05$), что указывает на нарушение энергетического аппарата нейронов. При этом во всех типах нейронов возрастают количество (на 37–70 %; $p < 0,01$) и площадь (в 2,4–4,6 раза; $p < 0,01$) лизосом, что свидетельствует о значительном усилении аутофагии, для устранения поврежденных мембран и органелл. Все эти изменения также наиболее выражены в нейронах коры мозжечка и наименее значимы в нейронах гипоталамуса [2; 9; 18; 19; 44; 45; 48; 49; 50; 52; 53].

9. В целом, структурные и метаболические изменения в нейронах мозга при отведении желчи сходны с таковыми при холестазах: развиваются похожие деструктивные нарушения нейронов, их ядерного аппарата и органелл, приводящие к гибели нейронов, сателлитозу и нейронофагии, при этом активность СДГ, НАДН-ДГ, Г-6-ФДГ и содержание РНК в цитоплазме нейронов уменьшаются, а активность ЛДГ и КФ возрастают. Это указывает на стереотипность, не специфичность реакции нейронов мозга на разные нарушения циркуляции желчи, обусловленную ранней недостаточностью их энергетического аппарата. Однако при потере желчи организмом нарушения нейронов развиваются быстрее и более выражены, чем при холестазах, что указывает на важность компонентов желчи для жизнедеятельности нейронов. Все эти изменения наиболее выражены в нейронах коры мозжечка и наименее значимы в нейронах гипоталамуса, что отражает большую чувствительность корковых нейронов, по сравнению со стволовыми [2; 31; 38; 39; 42; 54; 64].

10. Трехсуточное наружное отведение желчи (декомпрессия) после 10-суточного холестаза, устраняя холестаз, частично нормализует структурные и гистохимические нарушения в нейронах коры мозга и мозжечка (на 3–12 %; $p < 0,01$), что подтверждает эффективность такого хирургического вмешательства [3; 11].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Полученные результаты демонстрируют преимущества комплексной гистологической, гистохимической, иммуногистохимической и электронномикроскопической морфофункциональной оценки состояния нейронов мозга в норме и при нарушениях тока желчи в организме, при визуальном, морфологическом и биохимическом контроле состояния при этом печени и желчевыводящих путей. Эти подходы можно рекомендовать использовать при

проведении исследований мозга при других патологических состояниях.

2. Полученные данные послужат фундаментальной основой для понимания патогенеза морфофункциональных изменений в организме при нарушениях циркуляции желчи и оценке возможностей медикаментозной (урсодизоксихолиевая кислота) и хирургической (отведение желчи) коррекции при холестазах.

3. Результаты проведенных исследований могут быть использованы для расширения фундаментальных знаний студентов вузов медико-биологического профиля о важной роли желчи и ее нормальной циркуляции в обеспечении гомеостаза нейронов мозга, о неблагоприятном влиянии холестаза и потере желчи на морфофункциональные свойства нейронов мозга.

4. Результаты исследований и выводы, сделанные на их основе, внедрены в учебный процесс на профильных кафедрах Гродненского, Витебского и Гомельского государственных медицинских университетов и Гродненского государственного университета имени Янки Купалы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ**Монографии**

1. Емельянчик, С. В. Мозг при холестазе : моногр. / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин. – Гродно : ГрГУ, 2011. – 265 с.
2. Емельянчик, С. В. Мозг при отведении желчи : моногр. / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин. – Гродно : ГрГУ, 2012. – 303 с.
3. Емельянчик, С. В. Нарушения в мозге при холестазе и пути коррекции : моногр. / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин. – Гродно : ГрГМУ, 2016. – 224 с.

Статьи в рецензируемых научных журналах

4. Некоторые биохимические показатели желчи и сыворотки крови у крыс при трехсуточном полном наружном отведении желчи / С. В. Емельянчик, Е. Л. Красницкая, С. М. Зиматкин, О. В. Барабан // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 2, Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і праўленне. Біялогія. – 2005. – № 1 (31) – С. 135–141.
5. Емельянчик, С. В. Морфологические изменения в нейронах фронтальной коры мозга крыс при десятисуточном холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 2, Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і праўленне. Біялогія. – 2006. – № 3 (46). – С. 97–101.
6. Барабан, О. В. Структурно-метаболические нарушения в гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс при 20-суточном подпеченочном холестазе и их коррекция урсофальком / О. В. Барабан, С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2007. – № 1 (17). – С. 103–106.
7. Барабан, О. В. Морфо-функциональные изменения в гистаминергических нейронах ядра E2 заднего гипоталамуса крыс при потере желчи в течение пяти суток / О. В. Барабан, С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 2, Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і праўленне. Біялогія. – 2007. – № 3 (57). – С. 109–113.
8. Зиматкин, С. М. Метаболические изменения в гистаминергических нейронах мозга крыс в динамике подпеченочного холестаза / С. М. Зиматкин, О. В. Барабан, С. В. Емельянчик // Морфология. – 2007. – Т. 132, № 4. – С. 27–30.
9. Зиматкин, С. М. Структурно-метаболические изменения гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы при потере желчи / С. М. Зиматкин, О. В. Барабан, С. В. Емельянчик // Морфология. – 2007. – Т. 132, № 6. – С. 22–25.

10. Емельянчик, С. В. Показатели морфометрии клеток-зерен коры мозжечка крыс в динамике полного наружного отведения желчи / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 2, Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і упраўленне. Біялогія. – 2009. – № 2 (82). – С. 146–149.

11. Емельянчик, С. В. Морфометрические и гистохимические изменения в коре мозжечка при холестазах в течение десяти суток и последующих трех суток отведения желчи у крыс / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 2, Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і упраўленне. Біялогія. – 2010. – № 3 (102). – С. 120–124.

12. Емельянчик, С. В. Морфометрический и цитометрический анализ морфофункциональных изменений в нейронах фронтальной коры мозга крыс при потере желчи организмом / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 187–194.

13. Зиматкин, С. М. Структурные и метаболические изменения нейронов головного мозга крыс при потере желчи организмом / С. М. Зиматкин, С. В. Емельянчик // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2012. – Т. 56, № 2. – С. 86–91.

14. Емельянчик, С. В. Клетки Пуркинье мозжечка крыс при ахолии / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. біялагічных навук. – 2012. – № 2. – С. 63–68.

15. Емельянчик, С. В. Структурные и гистохимические изменения в нейронах теменной коры мозга крыс при отведении желчи / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Морфология. – 2012. – Т. 141, № 2. – С. 7–12.

16. Емельянчик, С. В. Структурные и гистохимические изменения в нейронах теменной коры мозга крыс при подпеченочном холестазах / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 38–44.

17. Емельянчик, С. В. Структурные и гистохимические изменения в клетках Пуркинье мозжечка крыс при холестазах / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Морфология. – 2013. – Т. 143, № 2. – С. 19–23.

18. Емельянчик, С. В. Ультраструктурные изменения астроцитарной глии коры мозга в динамике отведения желчи у крыс / С. В. Емельянчик // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 5, Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. – 2013. – № 3 (161). – С. 120–124.

19. Емельянчик, С. В. Ультраструктурные изменения гематоэнцефалического барьера при наружном отведении желчи у крыс / С. В. Емельянчик // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі

Купалы. Сер. 5, Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. – 2015. – № 2 (193). – С. 113–119.

20. Emelyanchik, S. V. Synaptophysin and glutamate decarboxylase expression in the rat cerebellum structures in cholestasis / S. V. Emelyanchik, O. A. Karnyushko, S. M. Zimatkin // *Brain and Nerves*. – 2017. – Vol. 1, № 2. – P. 1–3.

21. Емельянчик, С. В. Структурные и гистохимические изменения в нейронах фронтальной коры мозга крыс при холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // *Морфология*. – 2018. – Т. 153, № 1. – С. 7–12.

22. Емельянчик, С. В. К моделированию подпеченочного холестаза у крыс / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // *Новости медико-биологических наук*. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 56–61.

23. Емельянчик, С. В. Экспрессия белка c-fos в нейронах новой коры мозга крыс при холестазе / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // *Новости медико-биологических наук*. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 156–160.

24. Емельянчик, С. В. Экспрессия синаптофизина в теменной коре мозга крыс при холестазе / С. В. Емельянчик // *Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 5, Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія*. – 2018. – Т. 8, № 2. – С. 114–122.

25. Емельянчик, С. В. Иммуногистохимия кальбиндина в нейронах коры головного мозга и мозжечка при холестазе у крыс / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 21–29.

26. Емельянчик, С. В. Нейроглобин в грушевидных нейронах мозжечка крыс при холестазе / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // *Морфология*. – 2019. – Т. 155, № 1. – С. 7–11.

27. Емельянчик, С. В. Состояние митохондрий в клетках Пуркинью мозжечка крысы при холестазе / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // *Клиническая и экспериментальная морфология*. – 2019. – Т. 8, № 2. – С. 41–47.

28. Емельянчик, С. В. Аутофагия в нейронах фронтальной коры мозга крысы при холестазе / С. В. Емельянчик // *Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 5, Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія*. – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 134–141.

29. Емельянчик, С. В. Экспрессия белка c-fos в нейронах коры мозжечка крыс при холестазе / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. медыцынскіх навук*. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 135–141.

30. Зиматкин С. М. Иммунореактивность кальбиндина в нейронах коры мозга и мозжечка крысы / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // *Морфология*. – 2019. – Т. 155, № 3. – С. 7–11.

Статьи в научных журналах

31. Емельянчик, С. В. Изменения нервной системы при холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2005. – № 4 (12). – С. 40–42.

32. Емельянчик, С. В. Биохимические изменения в желчи и сыворотке крови в динамике полного наружного отведения желчи у крыс / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2005. – № 4 (12) – С. 43–45.

33. Емельянчик, С. В. К патогенезу нарушений в головном мозге при холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Гепатология и гастроэнтерология. – 2017. – Т. 1, № 1. – С. 12–16.

34. Емельянчик, С. В. Изменения иммунореактивности АТФ-синтазы в нейронах коры мозга и мозжечка крыс при холестазе / С. В. Емельянчик, О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 55–60.

Материалы конференций

35. Показатели желчи после полного наружного отведения ее в течение пяти суток в эксперименте / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин, Е. Л. Красницкая, О. В. Барабан, Л. С. Ольшевская // Актуальные проблемы экологии : материалы I междунар. конф., Гродно, 6–8 окт. 2004 г. : в 2 ч. / отв. ред. Н. П. Канунникова. – Гродно, 2005. – Ч. 2. – С. 243–245.

36. Барабан, О. В. Метаболизм гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крысы при экспериментальном холестазе / О. В. Барабан, С. В. Емельянчик // Актуальные проблемы морфологии : сб. тр. междунар. науч-практ. конф., посвящ. 85-летию Белорусского государственного медицинского университета, Минск, 22–23 нояб. 2006 г. / БГМУ ; под ред. П. Г. Пивченко. – Минск, 2006. – С. 18–19.

37. Емельянчик, С. В. Гистохимические изменения в нейронах второго, третьего и пятого слоев фронтальной и теменной коры головного мозга крыс при пяти суточном экспериментальном холестазе / С. В. Емельянчик // Актуальные проблемы морфологии : сб. тр. междунар. науч-практ. конф., посвящ. 85-летию Белорусского государственного медицинского университета, Минск, 22–23 нояб. 2006 г. / БГМУ ; под ред. П. Г. Пивченко. – Минск, 2006. – С. 56–57.

38. Гистаминергические нейроны мозга в норме и при экспериментальных воздействиях / С. М. Зиматкин, В. Б. Кузнецова, О. В. Барабан, С. В. Емельянчик // Актуальные проблемы морфологии : сб. тр. междунар. науч-практ. конф., посвящ. 85-летию Белорусского государственного медицинского университета, Минск, 22–23 нояб. 2006 г. / БГМУ ; под ред. П. Г. Пивченко. – Минск, 2006. – С. 62–63.

39. Функциональная морфология гистаминергических нейронов мозга / С. М. Зиматкин, В. Б. Кузнецова, О. В. Барабан, С. В. Емельянчик // Нейрогуморальные механизмы регуляций функций в норме и патологии, посвящается 100-летию со дня рождения академика И. А. Булыгина : сб. науч. ст. / Белорусское общество физиологов, Институт физиологии НАН Беларуси / под ред. В. Н. Гурина, В. Н. Калюнова, Д. М. Попутникова. – Минск, 2007. – С. 103–107.

40. Емельянчик, С. В. Структурные и метаболические изменения в нейронах мозга при отведении желчи из организма крыс / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Актуальные вопросы медицины : материалы конф., посвящ. 50-летию ГрГМУ, Гродно, 20 дек. 2008 г. / ГрГМУ ; редкол.: П. В. Гарелик (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2008. – С. 113–114.

41. Структурные и метаболические изменения в нейронах мозга при экспериментальном подпеченочном холестазе / С. М. Зиматкин, С. В. Емельянчик, О. В. Барабан, С. А. Крупский // Актуальные вопросы медицины : материалы конф., посвящ. 50-летию ГрГМУ, Гродно, 20 дек. 2008 г. / ГрГМУ ; редкол.: П. В. Гарелик (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2008. – С. 130–131.

42. Зиматкин, С. М. Функциональная морфология гистаминергических нейронов мозга / С. М. Зиматкин, О. В. Барабан, С. В. Емельянчик // Фундаментальные и прикладные аспекты физиологии : материалы науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию каф. нормальной физиологии ГрГМУ, Гродно, 20–21 мая 2009 г. / ГрГМУ ; редкол.: П. В. Гарелик (отв. ред.), [и др.]. – Гродно, 2009. – С. 67–70.

43. Емельянчик, С. В. Структурно-метаболические нарушения в нейронах головного мозга при ахолии у крыс / С. В. Емельянчик, О. В. Барабан, С. М. Зиматкин // Научная организация деятельности анатомических кафедр в современных условиях : материалы междунар. науч.-практ. конф. руководителей анатомических кафедр и институтов вузов СНГ и Восточной Европы, посвящ. 75-летию ВГМУ, Витебск, 21 окт. 2009 г. / ВГМУ ; редкол.: А. К. Усович (отв. ред.) [и др.]. – Витебск, 2009. – С. 183–186.

44. Барабан, О. В. Влияние полного наружного отведения желчи на ультраструктуру гистаминергических нейронов ядра E2 заднего гипоталамуса крыс / О. В. Барабан, С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Актуальные проблемы экологии–2009 : материалы V междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 21–23 окт. 2009 г. / ГрГУ им. Я. Купалы : редкол.: И. Б. Заводник (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2009. – С. 31–34.

45. Емельянчик, С. В. Ультрамикроскопические изменения коры мозжечка в динамике отведения желчи из организма крыс / С. В. Емельянчик // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии : материалы науч.-практ.

конф. с междунар. участием памяти проф. О. А. Голубева, Гомель, 4–5 мая 2010 г. / ГГМУ ; редкол.: А. П. Лызиков (отв. ред.) [и др.]. – Гомель, 2010. – С. 29–30.

46. Емельянчик, С. В. Морфо-функциональные изменения в нейронах коры мозга и мозжечка в динамике экспериментального холестаза у крыс / С. В. Емельянчик // Актуальные теоретические и прикладные аспекты патофизиологии : материалы Респ. конф. с междунар. участием, Гродно, 14 мая 2010 г. / ГрГМУ ; редкол.: Н. Е. Максимович (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2010. – С. 138–141.

47. Емельянчик, С. В. Ультрамикроскопическая морфометрия нейронов фронтальной коры мозга крыс при десяти суточном холестазе / С. В. Емельянчик // Актуальные проблемы экологии : материалы VI междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 27–29 окт. 2010 г. / ГрГУ им. Я. Купалы ; редкол.: И. Б. Заводник (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2010. – С. 173–174.

48. Емельянчик, С. В. Ультраструктурные изменения в нейронах мозга крыс при потере желчи организмом / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Актуальные проблемы медицины : материалы ежегод. итоговой науч. конф., Гродно, 15–16 дек. 2011 г. / ГрГМУ ; редкол.: М. Н. Курбат (отв. ред.). – Гродно, 2011. – С. 408–411.

49. Емельянчик, С. В. Ультрамикроскопические изменения нейроглии коры мозга при отведении желчи / С. В. Емельянчик // Актуальные проблемы экологии : материалы VIII междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 24–26 окт. 2012 г. : в 2 ч. / ГрГУ им. Я. Купалы ; редкол.: И. Б. Заводник (отв. ред.) [и др.] – Гродно, 2012. – Ч. 1. – С. 155–156.

50. Емельянчик, С. В. Ультрамикроскопические изменения микроглии коры мозга крыс при отведении желчи / С. В. Емельянчик // Зоологические чтения : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. И. К. Лопатина, Гродно, 14–16 марта 2013 г. / ГрГУ им. Я. Купалы ; редкол.: О. В. Янчуревич (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2013. – С. 110–111.

51. Емельянчик, С. В. Ультрамикроскопические изменения астроцитов коры мозга крыс при холестазе / С. В. Емельянчик // Актуальные проблемы экологии : материалы IX междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 23–25 окт. 2013 г. : в 2 ч. / ГрГУ им. Я. Купалы ; редкол.: И. Б. Заводник (отв. ред.) [и др.] – Гродно, 2013. – Ч. 1. – С. 136–137.

52. Емельянчик, С. В. Ультраструктурные изменения эндотелиальных клеток гемокapилляров коры мозга при наружном отведении желчи у крыс / С. В. Емельянчик // Актуальные проблемы экологии : материалы X междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 1–3 окт. 2014 г. : в 2 ч. / ГрГУ им. Я. Купалы ; редкол.: В. Н. Бурдь (гл. ред.), [и др.]. – Гродно, 2014. – Ч. 1. – С. 170–171.

53. Емельянчик, С. В. Ультраструктурные особенности строения гематоэнцефалического барьера при ахолии у крыс / С. В. Емельянчик //

Актуальные проблемы экологии : материалы XI междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 5–7 окт. 2016 г. / ГрГУ им. Я. Купалы ; редкол.: Н. В. Бурдь (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2016. – С. 149–151.

54. Емельянчик, С. В. К вопросу о причинах изменений в головном мозге при экспериментальных воздействиях у крыс / С. В. Емельянчик // Зоологические чтения : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. К. М. Ельского, Гродно, 15–17 марта 2017 г. / ГрГУ им. Я. Купалы ; редкол.: О. В. Янчуревич (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 83–84.

55. Емельянчик, С. В. Иммуногистохимические изменения в коре мозжечка крыс при холестазе / С. В. Емельянчик // Актуальные проблемы экологии : материалы XII междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 4–6 окт. 2017 г. / ГрГУ им. Я. Купалы ; редкол.: Н. В. Бурдь (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 107–109.

56. Емельянчик, С. В. Экспрессия кальбиндина во фронтальной и теменной коре мозга крыс при холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Актуальные проблемы гистологии, цитологии и эмбриологии : материалы науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию организации кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГрГМУ, Гродно, 22 июня 2018 г. / ГрГМУ ; редкол.: С. М. Зиматкин (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2018. – С. 35–38.

Тезисы докладов

57. Емельянчик, С. В. Метаболические нарушения в нейронах теменной коры мозга и ядре E2 гипоталамуса крыс при моделировании ахолии / С. В. Емельянчик, О. В. Барабан, С. М. Зиматкин // XI съезд Белорусского общества физиологов, Минск, 22 сент. 2006 г. : тез. докл. / под ред. В. Н. Гурина [и др.] – Минск, 2006. – С. 41–42.

58. Морфометрические параметры нейронов коры мозжечка и гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крыс в динамике полного наружного отведения желчи / С. В. Емельянчик, С. Л. Андреева, О. В. Барабан, С. М. Зиматкин // Морфология : материалы докл. VIII конгресса междунар. ассоциации морфологов, Орел, 15 сент. 2006 г. – 2006. – Т. 129, № 4. – С. 49.

59. Зиматкин, С. М. Структурно-метаболические изменения нейронов головного мозга при подпеченочном холестазе у крыс / С. М. Зиматкин, С. В. Емельянчик, О. В. Барабан // Морфология : материалы конф. посвящ. 100-летию Л. И. Фалина, Москва, 15–17 сент. 2006 г. – 2007. – Т. 131, № 3. – С. 71.

60. Zimatkin, S. M. Structural and metabolic disturbances in rat brain histaminergic neurons under cholestasis and their correction with ursofalk / S. M. Zimatkin, O. V. Baraban, S. V. Yemelyanchik // Future perspectives in gastroenterology, Dresden, 11–12 october, 2007 : abstr. falk symposium. – Dresden, 2007. – P. 22.

61. Барабан, О. В. Ультраструктурные изменения в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс при 10-суточном подпеченочном холестазе /

О. В. Барабан, С. М. Зиматкин, С. В. Емельянчик // Актуальные проблемы экологии–2007 : тез. докл. III междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 21–23 нояб. 2007 г. / под ред. Н. П. Канунниковой (и др.). – Гродно, 2007. – С. 90–91.

62. Изменения в крови и мозге в динамике экспериментального подпеченочного холестаза / С. М. Зиматкин, С. В. Емельянчик, О. В. Барабан, С. А. Крупский // Актуальные вопросы гепатологии : материалы VIII междунар. симпозиума гепатологов Беларуси, Витебск, 5–6 июня 2008 г. : в 2 т. / ГрГМУ ; редкол.: В. М. Циркунов (отв. ред.) [и др.]. – Гродно, 2008. – Т. 2. – С. 82.

63. Зиматкин, С. М. Роль желчи в обеспечении структурно-метаболического гомеостаза нейронов мозга / С. М. Зиматкин, С. В. Емельянчик, О. В. Барабан // Научные труды II съезда физиологов СНГ, Кишинев, 29–31 окт. 2008 г. / редкол.: А. И. Григорьев, Р. И. Сепиашвили, Ф. И. Фурдуня (отв. ред.). – М. ; Кишинев, 2008. – С. 147.

64. Емельянчик, С. В. Морфофункциональные нарушения в нейронах мозга крыс при холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин, // Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций : XIV съезд Белорусского общества физиологов и III междунар. науч. конф. к 95-летию со дня основания кафедры физиологии человека и животных БГУ и нормальной физиологии БГМУ, к 110-летию со дня рождения акад. И. А. Булыгина, Минск, 5 окт. 2017 г. : тез. докл. / Белорусское общество физиологов, БГУ ; редкол.: В. В. Лысак [и др.]. – Минск, 2017. – С. 38.

65. Емельянчик, С. В. Экспрессия белка кальбиндина-D28к в коре мозжечка крыс при холестазе / С. В. Емельянчик, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук : труды междунар. науч. конф. «Фундаментальные и прикладные науки – медицины», Минск, 12 окт. 2018 г. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 31–32.

66. Емельянчик, С. В. Экспрессия синаптофизина во фронтальной коре мозга при холестазе в эксперименте / С. В. Емельянчик // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии : сб. науч. тр. науч. конф. с междунар. участием, Москва, 1–2 нояб. 2018 г. / Министерство науки и высшего образования ; редкол.: О. В. Макарова (отв. ред.) [и др.]. – М., 2018. – С. 16–17.

РЭЗІЮМЭ

Емяльянчык Сяргей Уладзіміравіч

Заканамернасці морфафункцыянальных змяненняў нейронаў мозгу пацукоў пры парушэннях цыркуляцыі жоўці

Ключавыя словы: галаўны мозг, нейроны кары лобнай і цемянной, кары мозачка, гістамінэргічныя нейроны, ўльтраструктуры, гістахімія, імунагістахімія, морфаметрыя, падпячоначны халестаз, страта жоўці, халестаз і страта жоўці.

Мэта даследавання: ўсталяваць дынаміку і заканамернасці адаптацыйных і дэструктыўных перабудоў нейронаў галаўнога мозгу пацукоў пры парушэннях цыркуляцыі жоўці і ацаніць магчымасці іх медыкаментознай і хірургічнай карэкцыі.

Метады даследавання: гісталагічныя, біяхімічныя, гістахімічныя, цытафотаметрычныя, морфаметрычныя, імунагістахімічныя, электронна-мікраскапічныя і статыстычныя. **Апаратура:** крыястат Leica CM 1850 (Германія), мікраскопы (Carl Zeiss Jena, Германія) і Axioskop 2 plus (Zeiss, Германія), лічбавыя відэакамеры (Panasonic Colour CCTV Camera WV-CP410/G, Японія, Sony DFW-X710, Японія), ультрамікратом MT-7000 (США), электронны мікраскоп JEM-100 CX (Японія).

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Упершыню праведзена комплекснае морфафункцыянальнае даследаванне нейронаў галаўнога мозгу ва ўмовах парушэння цыркуляцыі жоўці. Упершыню ўстаноўлена, што як халестаз, так і адвядзенне жоўці, змяняюць структуру і метабалізм нейронаў мозгу, стан іх функцыянальных апаратаў: энергетычнага, сінтэтычнага, апарата пераварвання і абароны, выклікаюць пашкоджанне клетачных мембран і арганэл, зморшчванне і гібель часткі нейронаў. Упершыню паказана дынаміка спецыфічных малекулярных маркераў нейронаў мозгу пры халестазе. Выяўлены агульныя заканамернасці і асаблівасці дынамікі дэструктыўных і адаптацыйных зменаў нейронаў розных адзелаў галаўнога мозгу пры халестазу і страты жоўці арганізмам. Упершыню паказана карыгіруючае дзеянне ўрсадзезаксіхолевай кіслаты і кароткачасовага адвядзення жоўці для нейронаў мозгу пры халестазе.

Рэкамендацыі па выкарыстанні. Атрыманыя вынікі можна выкарыстаць для выкладання студэнтам медыка-біялагічнага профілю і пры правядзенні далейшых навуковых даследаванняў мозгу пры парушэннях пячоначна-кішэчнай цыркуляцыі жоўці.

Галіна выкарыстання: гісталогія, цыталогія, клеткавая біялогія, нейрахімія, нейрамарфалогія, неўралогія, гепаталогія.

РЕЗЮМЕ**Емельянчик Сергей Владимирович****Закономерности морфофункциональных изменений нейронов мозга крысы при нарушениях циркуляции желчи**

Ключевые слова: головной мозг, нейроны коры лобной и теменной, коры мозжечка, гистаминергические нейроны, ультраструктура, гистохимия, иммуногистохимия, морфометрия, подпеченочный холестаза, потеря желчи, холестаза и потеря желчи.

Цель исследования: установить динамику и закономерности адаптационных и деструктивных перестроек нейронов головного мозга крысы при нарушениях циркуляции желчи и оценить возможности их медикаментозной и хирургической коррекции.

Методы исследования: гистологические, биохимические, гистохимические, цитофотометрические, морфометрические, иммуногистохимические, электронно-микроскопические и статистические.

Аппаратура: криостат Leica CM 1850 (Германия), микроскопы (Carl Zeiss Jena, Германия) и Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровые видеокамеры (Panasonic Colour CCTV Camera WV-CP410/G, Япония, Sony DFW-X710, Япония), ультрамикротом MT-7000 (США), электронный микроскоп JEM-100 CX (Япония).

Полученные результаты и их новизна. Впервые проведено комплексное морфофункциональное исследование нейронов головного мозга в условиях нарушения циркуляции желчи. Впервые установлено, что как холестаза, так и отведение желчи, изменяют структуру и метаболизм нейронов мозга, состояние их функциональных аппаратов: энергетического, синтетического, аппарата переваривания и защиты, вызывают повреждение клеточных мембран и органелл, сморщивание и гибель части нейронов. Впервые показана динамика специфических молекулярных маркеров нейронов мозга при холестазе. Выявлены общие закономерности и особенности динамики деструктивных и адаптационных изменений нейронов разных отделов головного мозга при холестазе и потере желчи организмом. Впервые показано корригирующее действие урсодезоксихолевой кислоты и кратковременного отведения желчи для нейронов мозга при холестазе.

Рекомендации по использованию. Полученные результаты можно использовать для преподавания студентами медико-биологического профиля и при проведении дальнейших научных исследованиях мозга при нарушении печеночно-кишечной циркуляции желчи.

Область применения: гистология, цитология, клеточная биология, нейрохимия, нейроморфология, неврология, гепатология.

SUMMARY

Emelyanchik Sergey Vladimirovich

Regularities of morphofunctional changes in rat brain neurons in violation of bile circulation

The keywords: brain, neurons of the frontal and parietal cortex, cerebellar cortex, histaminergic neurons, ultrastructure, histochemistry, immunohistochemistry, morphometry, subhepatic cholestasis, bile loss, cholestasis and bile loss.

The aim of the study: to determine the dynamics and regularities of adaptive and destructive rearrangements of rat brain neurons in cases of bile circulation disorders and to evaluate the possibilities of their medical and surgical correction.

The methods of the study: histological, biochemical, histochemical, cytophotometrical, morphometrical, immunohistochemical, electron microscopical, statistical. **Apparatuses:** cryostat Leica CM 1850 (German), microscopes (Carl Zeiss Jena, German) and Axioskop 2 plus (Zeiss, German), digital video cameras (Panasonic Colour CCTV Camera WV-CP410/G, Japan, Sony DFW-X710, Japan), ultramicrotome MT-7000 (USA), electron microscope JEM-100 CX (Japan).

The received results and their novelty. For the first time, a comprehensive morphofunctional study of brain neurons in conditions of bile circulation disturbance was carried out. It was established for the first time that both cholestasis and bile drainage alter the structure and metabolism of brain neurons, the state of their functional apparatuses: energy, synthetic, digestion and defense apparatus, cause damage to cell membranes and organelles, wrinkling and death of some neurons. For the first time, the dynamics of specific molecular markers of brain neurons in cholestasis is shown. The general patterns and characteristics of the dynamics of destructive and adaptive changes in neurons of different parts of the brain during cholestasis and loss of bile by the body are revealed. For the first time, the corrective effect of ursodeoxycholic acid and short-term removal of bile for brain neurons with cholestasis was shown.

The recommendation for use. These results may be used for teaching of students of medical and biological departments and for the future scientific studies of brain in disturbances of enterohepatic circulation of bile.

The field of application: histology, cytology, cellular biology, neurochemistry, neuromorphology, neurology, hepatology.