

АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СОСУДИСТЫХ СПЛЕТЕНИЙ ЖЕЛУДОЧКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС В КОНТРОЛЕ И ПРИ ВВЕДЕНИИ КСЕНОГЕННОГО ЛИКВОРА

Гасанова И.Х.¹, Куница В.Н.¹, Ермола Ю.А.¹, Гасанли З.Х.¹, Новосельская Н.А.¹

¹Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь, e-mail: ilaha_gasanova@mail.ru

Проведено исследование влияния парентерального введения ксеногенной цереброспинальной жидкости на ультраструктурную организацию сосудистых сплетений желудочков головного мозга новорожденных белых крыс. Ликвор вводился из расчета 2 мл/кг массы животного один раз в 3 дня. В качестве контроля служили новорожденные крысы, которым вводили в такой же дозе и кратности физиологический раствор. Животные выводились из опыта на 7-е и 30-е сутки. Извлеченные структуры мозга подвергались общепринятой обработке. После чего на ультрамикротоме ULTRACUT изготавливали ультратонкие срезы с последующей окраской уранилацетатом и цитратом свинца. Основное внимание при проведении электронно-микроскопического исследования уделяли основной функциональной единице сосудистого сплетения – эпителиоциту, а также ультраструктурным особенностям его взаимодействия с сосудами микроциркуляторного русла. Показано, что введение ликвора приводит к повышению функциональной активности, в первую очередь, эпителиоцитов, проявляющейся усилением секреции цереброспинальной жидкости и активацией ультраструктур эндотелиоцитов, что особенно проявлялось к 30-м суткам эксперимента. Эндотелиоциты капилляров увеличены, имеют овальную форму с широкими периферическими отростками, крупные эухромные ядра с ядрышками и глубокими инвагинациями кариолеммы, электронно-прозрачный цитоплазматический матрикс с многочисленными пиноцитозными везикулами, свободными рибосомами, полисомами, мелкими митохондриями, профилями гранулярной цитоплазматической сети и аппарата Гольджи. Происходит увеличение количества секреторных гранул с различной электронной плотностью, которые располагаются не только на апикальной части клетки, но и вдоль боковой части цитоплазмы. Полученные данные организации хорOIDных сплетений способствуют пониманию общих механизмов созревания сосудистых сплетений желудочков головного мозга и являются отправной точкой при проведении исследований по ликворологии и физиологии нервной системы.

Ключевые слова: сосудистое сплетение, головной мозг, спинномозговая жидкость, период новорожденности.

ANATOMICAL PECULIARITIES OF INTRAVENTRICULAR VASCULAR PLEXI ULTRASTRUCTURE OF NORMAL NEWBORN RATS AND EXPOSED TO CEREBROSPINAL FLUID

Gasanova I.Kh.¹, Kunitsa V.N.¹, Yermola Yu.A.¹, Gasanli Z.Kh.¹, Novoselskaya N.A.¹

¹Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky, Simferopol, e-mail: ilaha_gasanova@mail.ru

This research has illustrated the effect of parenteral administration of xenogeneic cerebrospinal fluid on the ultrastructural organization of vascular plexi of cerebral ventricles of newborn white rats. Cerebrospinal fluid was administered at a rate of 2 ml / kg of animal weight once a day every 3 days. The control group was made out newborn rats which were administered the physiological saline solution at the same dose and multiplicity. Animals were removed from the experiment on the 7th and 30th days. The extracted structures of the brain were subjected to conventional histological processing. Then ultrathin sections were made by Ultracut ultramicrotome and stained by uranyl acetate and lead citrate. The main focus of the electron microscopy study was concentrated on the basic functional unit of the vascular plexus - the epitheliocyte as well as on the ultrastructural features of its interaction with the microcirculatory vessels. It was shown that the introduction of CSF leads to an increase in functional activity, primarily of epithelial cells, manifested by increased secretion of the cerebrospinal fluid and activation of ultrastructural changes in endotheliocytes, which was especially evident on the 30th day of the experiment. The endotheliocytes of the capillaries were enlarged, oval in shape with wide peripheral processes, large euhromic nuclei with nucleoli and deep invaginations of the karyolemma, electron-transparent cytoplasmic matrix with numerous pinocytosis vesicles, free ribosomes, polysomes, small mitochondria, contours of the granular cytoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. There was an increase in the number of secretory granules with different electron density, which were located not only on the apical part of the cell, but also along the lateral part of the cytoplasm. The obtained data of the organization of the choroid plexi helps us to understand the general mechanisms of the maturation of the

Одним из научных направлений кафедры нормальной анатомии Крымской медицинской академии им. С.И. Георгиевского является доклиническое исследование *in vivo* свойств ксеногенной цереброспинальной жидкости (КЦЖ), рассматриваемое как возможное перспективное сырье для выпуска нового иммунобиологического препарата [1; 2]. Предшествующее изучение состава и биологических свойств аллогенной, а затем и ксеногенной цереброспинальной жидкости, парентеральное ее введение экспериментальным животным убедительно доказали высокую степень коррекции различных патологических состояний. Серии проведенных экспериментов выявили отсутствие тератогенных, эмбриотоксических свойств КЦЖ, а также иммунопатологических реакций после ее введения [3].

При парентеральном введении КЦЖ выявлено ее влияние на рост и созревание животных, состояние кожи и ее трофики, семенников, яичников, и репродуктивную функцию. Исследовано влияние на эндокринные органы и органы иммунитета, дыхательную систему, опорно-двигательный аппарат, микроциркуляцию, гемодинамику, обмен липидов, эпилептическую активность головного мозга, течение лучевой болезни [4; 5]. В ходе исследований была доказана неоднозначность эффекта КЦЖ в разные возрастные периоды. Доказан «омолаживающий» эффект на органы дыхания, селезенку, надпочечники, тимус, периферические лимфоузлы [6; 7].

Особый интерес представляет изучение воздействия парентерального введения КЦЖ на сосудистые сплетения желудочков головного мозга, представляющих собой морфологический субстрат, ответственный за продукцию 70-80% эндогенного ликвора. Ранее нами было установлено, что парентеральное введение ксеногенного ликвора оказывает влияние на морфогенез сосудистых сплетений желудочков головного мозга крыс половозрелого и предстарческого возраста [8]. Мы поставили цель изучить влияние ксеногенной цереброспинальной жидкости на ультраструктурное строение сосудистых сплетений желудочков головного мозга новорожденных крыс при парентеральном введении.

Материал и методы исследования. Эксперимент проведен на 20 белых крысах линии Вистар периода новорожденности (первые сутки после рождения, средняя масса – 6-8 г). Животные распределены на две равные серии по 10 особей в каждой: 1 - контрольную (введение физиологического раствора), 2 – экспериментальную (введение КЦЖ). В обеих сериях препараты вводили десятикратно из расчёта 2 мл/кг массы животного один раз в 3 дня. Подбор дозы и кратности введения КЦЖ основывается на многочисленных

экспериментальных данных Крымской ликворологической школы анатомов [9]. Животных содержали в стандартных условиях вивария при постоянной температуре и влажности воздуха со свободным доступом к воде и пище. Выведение из опыта проводили на 7-е и 30 сутки (по 5 особей на каждый срок) путем декапитации животных под эфирным наркозом. Исследования проводились в соответствии с Женевской конвенцией International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals [10]. Из исследуемой части органа вырезали кусочки размером около 1 мм³ и помещали их в фиксирующий 2,5% раствор глютарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере с pH 7,2–7,4. Фиксацию проводили на протяжении 12 часов при температуре -4 °С, после чего материал промывали в 0,1 М фосфатном буфере 3 раза по 10, 20, 30 минут и дофиксировали на протяжении одного часа 1% раствором тетраоксида осмия на 0,1% фосфатном буфере 1,5-2 часа. Кусочки заливали в капсулы смесью эпоксидных смол. Из полученных капсул на ультрамикротоме ULTRACUT изготавливали ультратонкие срезы с последующей окраской уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы просматривали и фотографировали на трансмиссионном микроскопе PEM-106.

Результаты исследования и их обсуждение. Вне зависимости от срока эксперимента основное внимание при проведении электронно-микроскопического исследования уделяли главной функциональной единице сосудистого сплетения – эпителиоциту, а также ультраструктурным особенностям его взаимодействия с сосудами микроциркуляторного русла (преимущественно гемокапиллярами). В целом изучаемые структурные компоненты сосудистого сплетения сохраняли своё типичное строение.

В первой группе исследования к 7-му дню отмечалась следующая картина. В центре ворсинки находится гемокапилляр, выстланный эндотелиальными клетками. В просвете обнаруживаются эритроциты. Гемокапилляр окружают рыхло расположенные фрагменты коллагеновых волокон, которые образуют базальную мембрану. По ультрамикроскопическим данным капилляры относятся преимущественно к фенестрированному типу. Снаружи на базальной мембране располагаются эпителиоциты кубической и/или цилиндрической формы с плотными межклеточными контактами. На базальной поверхности клеток образуются хаотично расположенные выпячивания цитоплазмы и десмосомы умеренной электронной плотности, формирующие так называемый базальный лабиринт. На апикальной мембране эпителиоцита находятся неравномерно расположенные множественные микроворсинки и единичные реснички умеренной электронной плотности, имеющие различный угол наклона и различную высоту, что является характерной особенностью для этой группы исследования. Ядра эндотелиоцитов сосудистых сплетений чаще эллипсоидной формы и занимают центральную часть клетки. У

эпендимоцитов, расположенных в области вершечек ворсинок, локализация ядер центрально-базальная или базальная. Более вытянутые, имеющие полигональную форму ядра определяются у эпендимоцитов на основании ворсинок с незначительными выпячиваниями кариолеммы. По периферии кариолеммы находится прерывисто конденсированный электронно-плотный гетерохроматин; в кариоплазме диффузно располагается в виде мелких глыбок электронно-плотный эухроматин, среди которого отмечается овальной формы ядрышко также с высокой электронной плотностью. В апикальной части цитоплазмы эпендимоцитов обнаруживаются множественные мелкие электронно-плотные (осмиофильные) гранулы – рибосомы, свободно лежащие в виде очаговых скоплений, локализующиеся между митохондриями и секреторными гранулами, единичные лизосомы. Образование гранул в клетках эпендимы указывает на то, что клетка находится в процессе подготовки к секреции цереброспинальной жидкости (рис. 1).

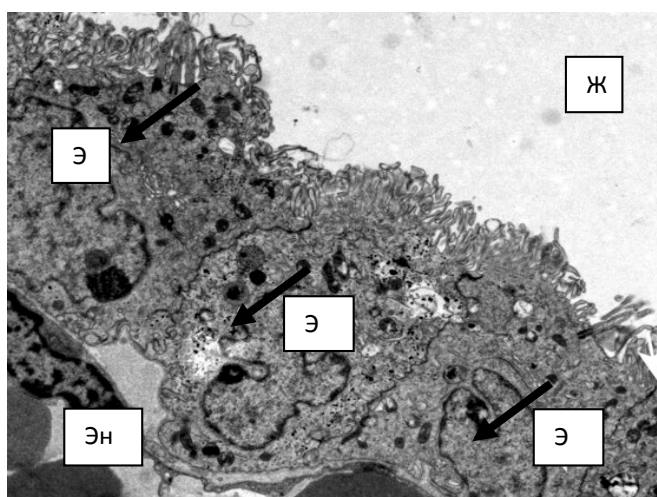


Рис. 1. Электронограмма. Эпителиоциты (Э) сосудистого сплетения. Эн – эндотелиоцит; Ж – просвет желудочка головного мозга; стрелки – секреторные гранулы. Первая серия, 7-е сутки. ТЭМ. Увеличение x3000

У экспериментальных крыс второй группы на 7-е сутки ультраструктурная картина сосудистого сплетения в целом соответствовала первой. В центре ворсинки находится гемокапилляр, окруженный рыхло расположенными фрагментами коллагеновых волокон, которые образуют базальную мембрану. На базальной мембране располагаются эпендимоциты кубической формы с рыхлыми межклеточными контактами, формирующими так называемый базальный лабиринт (рис. 2).

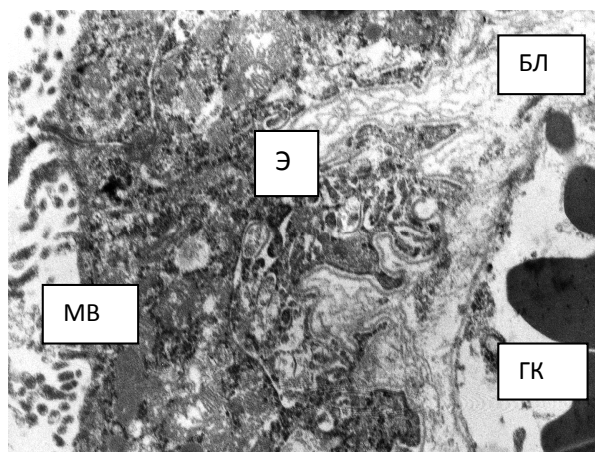


Рис. 2. Электронограмма. Участок эпителиоцита (Э) сосудистого сплетения, базальный лабиринт (БЛ). ГК – просвет гемокапилляра; МВ – микроворсинки на апикальной поверхности эпителиоцита. Вторая серия, 7-е сутки. ТЭМ. Увеличение x4000

Эпендимоциты имеют уплощенную форму. На апикальной мембране эпендимоцита находятся неравномерно расположенные множественные микроворсинки и единичные реснички умеренной электронной плотности, имеющие различный угол наклона и различную высоту (рис. 3). В апикальной части цитоплазмы эпендимоцитов обнаруживаются множественные мелкие электронно-плотные (осмиофильные) гранулы – рибосомы, свободно лежащие в виде очаговых скоплений, локализующиеся между митохондриями и секреторными гранулами, единичные лизосомы. Образование гранул в клетках эпендимы указывает на то, что клетка находится в процессе подготовки к секреции спинномозговой жидкости. На активность клетки указывают и множественные митохондрии с четкой визуализацией крист.

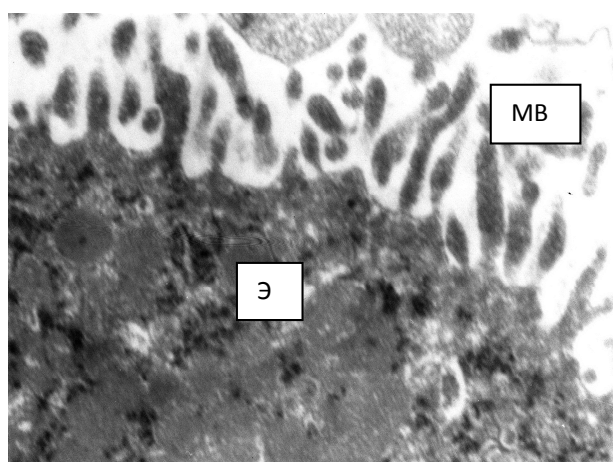


Рис. 3. Электронограмма. Апикальная мембрана эпителиоцита (Э) сосудистого сплетения. МВ – микроворсинки на апикальной поверхности. Вторая серия, 7-е сутки. ТЭМ. Увеличение x6000

Ядра эпендимоцитов сосудистых сплетений чаще эллипсоидной формы и занимают центральную часть клетки. У эпендимоцитов, расположенных в области вершук ворсинок, локализация ядер центрально-базальная или базальная. Более вытянутые, имеющие полигональную форму, ядра определяются у эпендимоцитов на основании ворсинок с незначительными выпячиваниями кариолеммы. По периферии кариолеммы находится прерывисто конденсированный электронно-плотный гетерохроматин; в кариоплазме диффузно располагается в виде мелких глыбок электронно-плотный эухроматин, среди которого отмечается овальной формы ядрышко также с высокой электронной плотностью. В перинуклеарной зоне располагается пластинчатый комплекс Гольджи, сформированный параллельно лежащими мембранами. На канальцах эндоплазматической сети располагаются рибосомы. В капиллярах сосудистого сплетения эндотелиоциты выстилают внутреннюю поверхность. Цитоплазма эндотелиоцитов имеет более высокую электронную плотность, в которой присутствует небольшое количество органелл. Митохондрии эндотелиоцитов средней электронной плотности с параллельными кристами; цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума незначительно расширены, на мембранах которых практически отсутствуют рибосомы. Комплекс Гольджи редуцирован и представлен отдельно лежащими, беспорядочно ориентированными гладкими мембранами. Ядро эндотелиоцита овальной формы с наличием инвагинаций и конденсацией электронно-плотным кольцом гетерохроматина по периферии. Цитоплазматическая мембрана, обращенная к току крови, образует мелкие парусообразные выросты. В цитоплазме отростков эндотелиоцита находится небольшое количество микропиноцитозных пузырьков, заполненных электронно-прозрачной субстанцией.

На 30-е сутки исследования при электронно-микроскопическом исследовании наблюдается повышение функциональной активности эпендимоцитов во 2-й группе эксперимента по сравнению с 1-й. Они имеют цилиндрическую форму с большим количеством органелл. При этом ядра занимают базально-центральные отделы клеток, увеличиваются в размерах и приобретают многочисленные инвагинации кариолеммы по сравнению с предыдущим сроком исследования. Конденсация электронно-плотного гетерохроматина наблюдается больше вблизи кариолеммы. Центральная кариоплазма становится разряженной с очагами слабой электронной плотности. На апикальной поверхности эпендимоцитов определяются секреторные массы и неравномерно расположенные микроворсинки и увеличенное количество ресничек различных размеров, отходящие от базальных телец. Форма микроворсинок и ресничек более разнообразна: пальцевидная, булавовидная, раздвоенная.

Следует отметить увеличение во второй группе количества секреторных гранул с

различной электронной плотностью, которые располагаются не только на апикальной части клетки, но и вдоль боковой части цитоплазмы. Митохондрии различных размеров, овальной формы с очаговой гомогенизацией крист. Отмечается набухание цистерн комплекса Гольджи, локализующегося в перинуклеарной зоне. Канальцы гранулярной эндоплазматической сети содержат небольшое количество рибосом. Количество свободно расположенных мелких осмиофильных рибосом в апикальной части клетки уменьшается. Десмосомальные межклеточные контакты более плотные по сравнению с предыдущим сроком исследования. Также уплотняется и базальный лабиринт, посредством которого хорOIDный эпендимоцит плотно контактирует с базальной мембраной капилляра (рис. 4).

Эндотелиоциты капилляров увеличены, имеют овальную форму с широкими периферическими отростками, крупные эухромные ядра с ядрышками и глубокими инвагинациями кариолеммы, электронно-прозрачный цитоплазматический матрикс с многочисленными пиноцитозными везикулами, свободными рибосомами, полисомами, мелкими митохондриями, профилями гранулярной цитоплазматической сети и аппарата Гольджи (рис. 4).

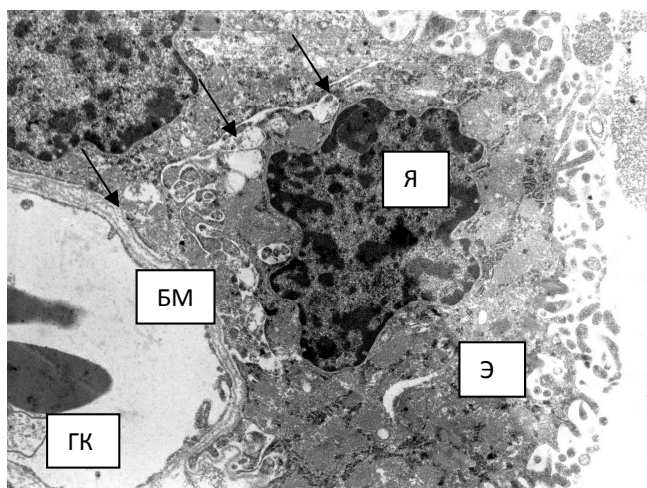


Рис. 4. Электронограмма. Структурный фрагмент ворсинки: эпителиоцит (Э); ядро (Я); базальная мембрана (БМ); гемокапилляр с эритроцитами (ГК); межэпителиальные контакты (стрелки). Вторая серия, 30-е сутки. ТЭМ. Увеличение x2800

Несмотря на существующие до сих пор разногласия, большинством исследователей признано, что цереброспинальная жидкость является результатом секреторной деятельности сосудистых сплетений. Вырабатываемая жидкость постоянно циркулирует в желудочках головного мозга, субарахноидальном пространстве мозговых структур, ликворопроводящих путях. При этом основной функцией ликвора является защита головного и спинного мозга от механических и гравитационных воздействий, обеспечение поддержки стабильного внутричерепного давления и водно-электролитного равновесия, а также участие в

трофических и обменных процессах между кровью и мозгом. Нарушение секреции и оттока ликвора, особенно во внутриутробном и послеродовом периодах, приводит к разнообразным нарушениям, хорошо известным в неврологической практике. Введение КЦЖ приводит к возрастанию функциональной активности сосудистых сплетений, в первую очередь эпителиоцитов, проявляющейся усилением секреции цереброспинальной жидкости и активацией ультраструктур эндотелиоцитов, и ожидаемо приведет к торможению возрастной инволюции органа, проявляющейся утолщением стромы за счет огрубения волокон и увеличения их количества.

Заключение. В целом выявленные структурные изменения у крыс периода новорожденности свидетельствуют о стимулирующем эффекте парентерального введения КЦЖ на секреторную активность сосудистых сплетений на протяжении всего срока эксперимента.

Список литературы

1. Кривенцов М.А. Эффект цереброспинальной жидкости на функциональное состояние лейкоцитов периферической крови облученных крыс / М.А. Кривенцов, Н.В. Девятова // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2017. – Т. 7, № 3. – С. 33-37.
2. Крымская анатомическая научная школа / В.С. Пикалюк [и др.] // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 205-211.
3. Девятова Н.В. Влияние ликвора на возрастные изменения слепой кишки крыс // Инновационное развитие современной науки: проблемы, закономерности, перспективы: сб. ст. III междун. науч.-практ. конф. – Пенза, 2017. – С. 256-259.
4. Девятова Н.В. Реакция крови и лимфоидных образований кишечника на введение ксеногенной цереброспинальной жидкости / Н.В. Девятова [и др.] // Научный поиск в современном мире: сб. мат. VIII междун. науч.-практ. конф. – Махачкала, 2015. – С. 239-241.
5. Кривенцов М.А. Структурная организация тимуса крыс раннего постнатального периода при парентеральном введении спинномозговой жидкости // Український медичний альманах. – 2013. – Т. 16, № 2. – С. 40-43.
6. Морфологические изменения паренхимы лёгких крыс при введении итраконазола и ксеногенной цереброспинальной жидкости / Д.В. Шатов [и др.] // Таврический медико-биологический вестник. – 2014. – Т. 17, № 2 (66). – С. 139-145.
7. Кривенцов М.А. Изменение абсолютной и относительной массы тимуса крыс при парентеральном введении спинномозговой жидкости в онтогенетическом аспекте //

Український морфологічний альманах. – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 55-57.

8. Гасанова И.Х. Возрастные органометрические показатели головного мозга крыс в норме и при введении ксеногенной спинномозговой жидкости // Український морфологічний альманах. – 2012. – Т. 10, № 4. – С. 23-24.

9. Кривенцов М.А. Пролиферативный потенциал тимуса в постлучевом периоде при введении ксеногенной спинномозговой жидкости // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 63-68.

10. Беляева Е.А., Кривенцов М.А. Структурные преобразования поднижнечелюстной слюнной железы после однократного тотального гамма-облучения // Таврический медико-биологический вестник. – 2014. – Т. 17, № 3 (67). – С. 9-12.