Істина перемагає

Стан білкового обміну та ядерний апарат нейронів кори головного мозку в умовах довготривалої дії солей важких металів на організм

2012

Зміст

Вступ Актуальність теми. 3

РОЗДІЛ 1 Огляд даних літератури 7

1. Кора головного мозку щурів: гістологічні та цитохімічні особливості пірамідних нейронів 7

2. Вплив солей важких металів на головний мозок 10

3. Застосування методу люмінісцентної мікроскопії при дослідженні білкового обміну та морфологічних змін у нейронах 12

РОЗДІЛ 2 Матеріали і методи 14

РОЗДІЛ 3 Результати власних досліджень 16

Висновки 22

Список літератури 23

Вступ

Актуальність теми

На початку XXI ст. найбільш пріоритетними проблемами в Україні є загроза впливу на здоров'я населення техногенних чинників виробничого і навколишнього середовища[24]. Результати гігієнічних, клініко-епідеміологічних і експериментальних досліджень, які були проведені в останні десятиріччя в Україні і за її межами, довели надзвичайно важливу роль важких металів у детермінації найбільш поширених захворювань у людей [15].

Велику роль у виникненні та розвитку небажаних наслідків у людини під впливом несприятливих факторів навколишнього середовища відіграє ЦНС [3]. Зважаючи на важливу роль, яку відіграє головний мозок у формуванні стресорних відповідей організму на вплив різних факторів навколишнього середовища, в тому числі хімічних чинників, дослідження механізмів хронічного порушення церебрального гомеостазу є одним з пріоритетних напрямків сучасної профілактичної медицини. Патологічні чинники, що визивають ураження ЦНС мають екзогенну або ендогенну природу. Ці несприятливі фактори зовнішнього середовища викликають зміни нейронів та міжнейрональних відносин, порушення виділення та рецепції нейромедіаторів, порушення нервової трофіки, утворення антитіл до нервової тканини [19].

Як відомо, нервова система, зокрема головний мозок, одна із перших систем організму (разом з серцево-судинною та ендокринною), яка реагує на поступлення в організм солей важких металів. Виникаючі зміни у нервовій системі під впливом чинників зовнішнього середовища можуть служити показниками шкідливого впливу на організм та викликати зміни будови та функціонування органа.

На теперішній час спостерігається ріст патології нервової системи. Серед основних захворювань можна виділити судинні захворювання головного мозку, хронічні прогресуючі захворювання

нервової системи та захворювання, обумовлені інтоксикаціями. Етіологія більшості захворювань багатопричинна, а патогенез більшості хронічних ушкоджень нервової системи залишаються до кінця не розкритими. Згідно сучасних літературних даних причиною цілого ряду захворювань нервової системи є спадкова схильність та конституційні аномалії, які поєднуються з дією різних екзогенних причин, зокрема надлишку мікроелементів в організмі людини. У Шосткінському, Ямпільскому та С-Будському районах Сумської області відмічено підвищення вмісту в грунті та питній воді солей цинку, хрому та свинцю, що зустрічаються в різних комбінаціях в залежності від регіону [9]. В умовах техногенного забруднення довкілля одним із пріоритетних напрямків екологічної морфології залишається вивчення особливостей і механізмів комбінованої дії найбільш поширених ксенобіотиків – факторів ризику багатьох екологічно залежних мультифакторних захворювань. Відомостей про вплив на центральну нервову систему комплексів солей важких металів у науковій літературі ми не зустріли. Відсутня інформація щодо впливу на ядерний апарат та білковий обмін нейронів комплексу солей важких металів, зокрема одночасного надходження до організму солей цинку, хрому та свинцю.

Мета роботи

- Вивчити особливості білкового обміну та стан ядерного апарату пірамідних нейронів кори головного мозку щурів в умовах впливу на організм солей важких металів в різні терміни експерименту.
- Проаналізувати динаміку виявлених змін.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані такі **задачі дослідження**:

- опрацювати наукову літературу з даної проблеми;
- відпрацювати методику виготовлення цитологічних препаратів кори головного мозку щурів та їх фарбування акридиновим помаранчевим.

- застосувати метод люмінісцентної мікроскопії для дослідження білкового обміну та морфологічних змін ядра нейронів (цитохімічний метод фарбування препаратів акридиновим помаранчевим для встановлення вмісту в нейронах нуклеїнових кислот)
- провести фото документування мікроскопічних препаратів, отриманих в умовах експерименту
- проаналізувати результати експериментальних досліджень.

Об'єкт дослідження:

- Ядерний апарат та цитоплазма пірамідних нейронів кори головного мозку експериментальних тварин.

Предмет дослідження:

- морфологічні перебудови в ядрах пірамідних нейронів;
- особливості білкового обміну пірамідних нейронів в умовах впливу солей важких металів.

Методи дослідження:

1) цитологічний та цитохімічний метод фарбування препаратів акриди новим помаранчевим для встановлення вмісту в нейронах нуклеїнових кислот та морфологічних змін у їх ядрах;

2) метод люмінісцентної мікроскопії:

3) методи медичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів:

- Проведена оцінка стану білкового обміну та морфологічного стану ядер нейронів за допомогою методу люмінесцентної мікроскопії. Виявлено ряд переваг люмінісцентної методики фарбування препаратів акридиновим помаранчевим перед методом фарбування за Ніслем, який має низку недоліків. Вивчено не тільки вміст в нейронах нуклеїнових кислот, але

й морфологічний стан нейрона, тонку будову ядра, ядерця, стан каріомембрани, хроматина.

- Вперше цитохімічний та морфологічний стан пірамідних нейронів в умовах впливу на організм солей важких металів оцінювався за допомогою застосованого методу – одночасно.

РОЗДІЛ 1

Огляд даних літератури

1. Кора головного мозку інтактних щурів: гістологічні та цитохімічні особливості пірамідних нейронів

Будова головного мозку щурів принципово не відрізняється від будови головного мозку інших ссавців. Головний мозок розміщується у черепній коробці, є переднім відділом ЦНС, входить до складу кінцевого мозку і представляє собою найбільш розвинену частину переднього мозку. До складу головного мозку входять 2 півкулі (парні, симетричні, найбільші утворення ЦНС), що з'єднуються між собою за допомогою мозолистого тіла. Півкулі вкриті шаром сірої речовини-корою (плащем). Кора у щурів, як і у всіх ссавців, розподіляється на неокортекс (нову кору) та аллокортекс. Головний мозок вкритий трьома сполучнотканинними оболонками: м'якою, павутинною та твердою[5,6].

При макроскопічному зовнішньому огляді головний мозок інтактних тварин має не напружену тверду мозкову оболонку. М'яка мозкова оболонка з помірним кровонаповненням судин, світло-рожевого кольору. В черепній коробці та на оболонках ексудат відсутній. *Особливостями будови ГМ у щурів є слабкий розвиток мосту, гладкість поверхні переднього мозку півкуль та значні розміри нюхових цибулин.* Межі між сірою та білою речовиною півкуль чіткі.

Згідно результатів морфологічних світлооптичних досліджень, в корі головного мозку щурів, під м'якою мозковою оболонкою, мікроскопіюються нейрони, клітини нейроглії та судинне русло(артерії, вени, гемо капіляри).

Нейрони утворюють в новій корі 6 шарів: I – молекулярний, зовнішній цитоархітектонічний шар кори; II- зовнішній зернистий шар, утворений малими зернистими, зірчатими та пірамідними нейронами; III- зовнішній пірамідний шар, утворений середніми та крупними пірамідними нейронами, найбільш широкий шар неокортекса; IV- внутрішній зернистий шар,

утворений малими зернистими, зірчатими та пірамідними нейронами; V-внутрішній пірамідний шар, утворений переважно середніми та крупними пірамідними, в тому числі, і гігантськими пірамідними нейронами ; VI-поліморфний шар, самий внутрішній шар кори, утворений різноманітними нейронами, переважно веретеноподібної форми, та поодинокими нейронами малих і середніх розмірів.

Пірамідальний тип нейроцитів 3 і 5 шарів соматосенсорної ділянки кори півкуль головного мозку є найбільш розповсюдженим серед інших типів нейронів. Пірамідні нейрони мають добре виражене клітинне тіло пірамідної, або трикутної, овальної форми[13,21].

Для більшості нейроцитів характерні великі округлі, або овальні ядра з світлою каріоплазмою. Ядра мають чітку каріомембрану, розміщені у цитоплазмі, здебільшого, центрально. У каріоплазмі ядер знаходиться одне, рідше два ядерця. Ядерця розміщуються як центрально, так і дещо зміщені до внутрішньої ядерної мембрани. Характерною ознакою нервових клітин контрольних тварин є наявність в них специфічних структур: присутність у цитоплазмі базофільної субстанції (речовини Ніссля) та базофілії ядерця. Базофільна субстанція виявляється у вигляді базофільних тілець та зерен різної форми та розмірів[23].

Нервові клітини, крім відносно рівномірного розташування утворюють окремі скупчення з 3-5, рідше 4-6 нейроцитів.

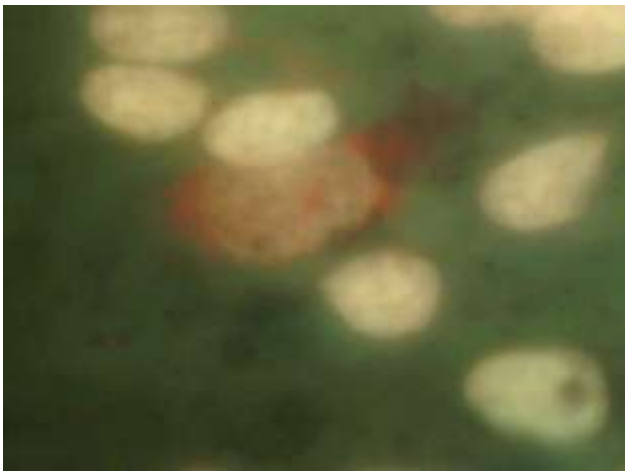

Рис. 1 – РНК-структури в нейронах кори головного мозку інтактних тварин. Акридиновий помаранчевий. Об. 90*, ок. 10*.

При забарвленні нервової тканини головного мозку акридиновим помаранчевим, за L.Bertalanffy та J. Biskis (1956) в модифікації А.П. Загрядської, у нейроплазмі нервових клітин виявляється базофільна речовина у вигляді глибчастих структур різного ступеня червоного забарвлення, в залежності від вмісту РНК в клітинах – субстанція Ніcля та РНК-структури ядерця (рис.1).

Нейрони кори головного мозку інтактних щурів забарвлювалися диференційовано, в залежності від вмісту в цитоплазмі та ядрі клітин ДНК- та РНК- структур. При цьому, ДНК- структури інтактних щурів мали зелене, або зелено-жовте забарвлення, РНК- структури – різний ступінь червоного забарвлення, в залежності від вмісту РНК в клітинах. Тому нервові клітини мають строкатий вигляд та пофарбовані в різні відтінки яскраво-червоного забарвлення (від помірного вмісту РНК-структур (+++) до значного (++++)). Ця субстанція представляє собою гранулярну ендоплазматичну сітку з множинними вільними рибосомами та полісомами. Тільця Ніcля у цитоплазмі можуть розподілятися рівномірно, рядами та у вигляді сіткоподібних структур, локалізуються у перикаріонах та дендритах нейронів. Від цитоплазми відходять один або два відростки. Ядра клітин поліморфні: мають дрібні, середні та великі розміри. В декотрих клітинах ядра займають майже всю цитоплазму. Каріомембрана має чіткі контури. Хроматинова сітка ядер придатна для дослідження, має ніжну структуру хроматина, що дає однорідну жовту, або жовто-зелену флуоресценцію, в залежності від насиченості ДНК-структурами. У декотрих ядрах хроматин дрібнозернистий, рівномірно розподілений. Ядерця в ядрах контуруються чітко, мають яскраво-червоний колір, їх насиченість РНК-структурами, в основному, значна (+++). У поодиноких клітин ядерця мають дуже високу ступінь насиченності РНК-структурами (++++). Над ядром базофільна субстанція утворює згущення – «капюшон».

Глія (астроцити, олігодендроцити) мікроскопірується у вигляді ядер овальної форми, в основному, середніх розмірів, які люмінісцують яскраво зеленим кольором, запиленості червоного кольору, що б свідчило про присутність РНК-структур, але в її ядрах не відмічається.

2. Вплив солей важких металів на головний мозок

Відомо, що більшість важких металів не проникає через гематоенцефалічний бар'єр, але вони накопичуються у нейронах та нейроглії. На теперішній час досить добре вивчено вплив свинцю на ЦНС [1,2,14,24, 27, 29].

За останні десятиліття **свинець** став найбільш розповсюдженим токсикантом із групи важких металів. Токсична дія свинцю на нервову систему різноманітна: токсичні енцефалопатії та нейропатій ,психоневрологічні порушення, що призводять до розвитку психозів[1]. Свинець викликає тяжкі ушкодження як центральної, так і периферичної нервової системи, в основі його дії лежить судин ний фактор[18]. У генезі неврологічних порушень Pb діє як хімічний стресор та викликає порушення гомеостазу клітинних мембран, видозмінює швидкість проведення нервового імпульсу через синапси, що функціонують за рахунок нейромедіаторів (ацетилхоліна, катехоламінів, ГАМК). Відмічається, що безпосередній вплив свинцю на нервові клітини головного мозку обумовлене проникненням свинцю через гематоенцефалічний бар'єр.

Сполуки свинцю, що надходять до організму, мають загальнотоксичний, мутагенний, канцерогенний ефекти, а також можуть заміщати ряд металів у біохімічному ланцюгу внутрішньоклітинних реакцій.

Надлишкове накопичення міді в базальних гангліях головного мозку, внаслідок порушення її метаболізму, є причиною моторних неврологічних порушень[19, 20].

Дефіцит міді в організмі може виявлятися у формі гепатоцеребральної дистрофії, що проявляється у вигляді прогресуючого дегенеративного

захворювання ЦНС. При гострих отруєннях міддю відмічається повнокрів'я та набряк мозку. В таламусі та корі головного мозку відмічається ураження гангліїв з клітинним набряком і тигролізом, при збереженні ядра[18].

Ураження нервової системи спостерігаються і при гострих та хронічних отруєннях **ртуттю** [22,25]. Гострі отруєння викликають «ртутну астенію», «ртутний еретизм» та «ртутний тремор». Все це свідчить про розвиток органічного ураження ЦНС. В організмі до 5% ртуті знаходится в мозку, утворюючи депо. Органічні сполуки ртуті завдяки високій ліпотропності легко проникають через гематоенцефалічний бар'єр. При хронічному ураженні ртутою в тканинах мозку виявляються ознаки набряку, дрібні крововиливи по ходу судин та утворення тромбів, осередковане та дифузне розмноження глії. Пари ртуті та метил ртуть порушують структуру мікротрубочок, що утворюють цитоскелет ЦНС. Метилртуть індукує порушення нейрогенезу, впливає на диференціацію нервових клітин, викликає осередковану дегенерацію нейронів гранулярного шару мозочку, кори головного мозку, особливо зорових областей[30]

Марганець має життєво важливе значення для функції мозку. Найбільш висока концентрація марганцю виявлена в епіфізі, гіпоталамусі та базальних гангліях, корі великих півкуль Він акумулюється переважно в меланіновмісних структурах ЦНС(чорній речовині)[17]. Токсична дія марганцю переважно викликає порушення функції нервової системи. Марганець є нейротропною протоплазматичною отрутою та відкладається в мозку та печінці [8]. Патогенна дія марганцю пов'язана з його здатністю проникати через гематоенцефалічний бар'єр і тропізмом до підкоркових структур головного мозку[17]. Марганець сприяє нейроендокринним змінам(підвищення тонусу симпатичної нервової системи), як мікроелемент, приймає участь у окисно-відновних процесах, стимулює утворення оксиду азоту клітинами мікроглії мозку. Хронічне отруєння марганцем викликає синдром паркінсонізму: дифузні ураження, що особливо виражені в мозковій корі, амонієвому розі[18,24], психічні порушення (ейфорія) [17,19],

різноманітні види порушень поведінки. Хронічна інтоксикація Mn призводить до тяжких незворотних порушень розумової діяльності та незначним порушенням пам'яті.

Цинк впливає на формування поведінкових реакцій[17]. Цинк необхідний для синтеза нуклеїнових кислот та білків, він регулює функцію мембранних рецепторів. При дефіциті цинку у щурів порушується морфологія мозочка, процес синаптогенезу, утворення дендритів[31]. Дефіцит цинку в критичні періоди розвитку мозку затримує його розвиток і викликає стійкі зміни поведінки нащадків щурів та мавп. В ембріогенезі недостатність цинку зменшує об'єм головного мозку, загальне число нейронів. Накопиченням цинку в головному мозку характеризується хвороба Піка (дегенеративні зміни мозку). Цей мікроелемент може викликає пошкодження нейронів, або сам, або через активацію глутаматдегідрогенази, що викликає в свою чергу, порушення обміну глютамінової кислоти – основного медіатора збудження ЦНС. Це призводить до ураження синапсів, тіл нейронів та появою в них аргірофільних включень. [17].

Надлишкове накопичення цинку, марганцю, заліза та міді може викликати токсичне ураження нейронів та сприяти розвитку судинних та нейродегенеративних процесів[7].

3. Застосування методу люмінесцентної мікроскопії при дослідженні білкового обміну та морфологічних змін у нейронах

Метод люмінісцентної мікроскопії дозволяє виявити локалізацію ДНК- та РНК- структур у цитоплазмі та ядрі нейронів. Він заснований на специфічності реакції між хімічним реактивом і субстратом, що входить у склад клітинних структур, і зафарбованих продуктів хімічних реакцій[10,11,12]. При обробці препаратів акридиновим оранжевим, котрий специфічно зв′язується з макромолекулами нуклеїнових кислот, ДНК-нейронів та його похідні мають яскраво- зелене світіння, РНК- та його похідні – яскраво-червоне світіння. Таким чином, спектральний склад

випромінювання несе інформацію про внутрішню будову об′єкта та його хімічний склад[11]. Флуорохроми, які використовують для вивчення нуклеїнових кислот, являють собою діаміноакридини, у переважній більшості випадків 2,8-діаміноакридини.

Флуорохром, призначений для використання в якісній люмінесцентній цитохімії нуклеїнових кислот, повинен задовільняти таким умовам:

1. Сувора цитохімічна специфічність.
2. Яскравість і чіткість люмінесцентномікроскопічних картин, які одержують за його допомогою.
3. Властивість давати ДНК і РНК різне світіння.
4. Відсутність вицвітання препарату (особливо під дією збудливого світла).

Найбільше поширення з усіх похідних акридину одержав акридиновий оранжевий. Багаторічний досвід показав, що ця речовина найбільшою мірою відповідає зазначеним вище умовам і тому може бути рекомендована як краща серед амінопохідних акридину для люмінесцентноцитохімічного вивчення нуклеїнових кислот.

Обов'язковою умовою одержання достовірних результатів є флуорохромування при суворо заданих значеннях pH та вибір етанола, як фіксатора цитологічних препаратів. Використаний метод фіксації в результаті наступного флуорохромування давав у досліджуваних клітинах найбільшу кольорову різницю між РНК-структурами (яскраво-червоне, багряно-червоне або помаранчево-червоне світіння) і ДНК (зелене або, у крайньому випадку, жовто-зелене світіння) [10,23].

РОЗДІЛ 2

Матеріали і методи

Зміни у головному мозку при навантаженні солями важких металів вивчено на 48 статевозрілих білих щурах-самцях масою 200-250г. У цілому результати експерименту грунтуються на вивченні цитологічних препаратів правої півкулі кори головного мозку.

Тварини перебували в стаціонарних умовах віварію, з постійною температурою(20-22°). В експерименті використовували активних тварин з задовільним загальним станом та станом шкіряного покриву. У віварії тварини перебували на стандартному раціоні, в одинакових умовах утримання, харчування та умовах належного догляду.

Утримання тварин та маніпуляції над ними проводилися у відповідності до положень «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001р.), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) та закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р.

Експериментальні та контрольні тварини утримувались в однакових умовах, усі маніпуляції над ними проводилися стереотипно, матеріал забирався та оброблявся паралельно. Протягом всього експерименту проводилося щоденне спостереження за загальним станом і поведінкою тварин.

Моделювання техногенних мікроелементозів здійснювалося шляхом додавання в питний раціон щурів на протязі 1-го, 2 та 3-ох місяців комбінацій солей важких металів:

Цинку ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) – 50 мг/л, хрому ($K_2Cr_2O_7$) – 10 мг/л та свинцю ($Pb(NO_3)_2$) – 3 мг/л.

Забір матеріалу здійснювали після закінчення 30, 60 та 90 діб експерименту, шляхом вилучення головного мозку з черепної коробки.

Цитологічний та цитохімічний метод

Препарати для цитологічного та цитохімічного методів дослідження готували методом мазків – відбитків та давлених препаратів під час забору матеріалу для дослідження. Знежирені у суміші Нікіфорова предметні скельця без натискання прикладали до поверхні досліджуваної зони кори головного мозку[23]. Мазки висушували в умовах кімнатної температури та фіксували етанолом протягом 10-ти хвилин.

Фарбування клітин акридиновим оранжевим (АО) за способом, розробленим L.Bertalanffy та J. Biskis (1956) в модифікації А.П. Загрядської, А.Ф. Федоровцева, Є.І. Корольової (1984)[23]. Використовувалась мікроскопія препаратів у відображеному світлі люмінесцентного мікроскопу «Мікмед – 2». Об'єктиви 40, 90, 100; окуляри – 7, 10, імерсійне середовище – нефлюорисцуюча олія. Фотодокументація отриманих результатів проводилася за допомогою цифрової відеокамери Granum на персональному комп’ютері. Зображення зберігали у банку інформації комп’ютера з подальшим роздрукуванням кольорових фото, вивченням морфологічних ознак препаратів та проведенням морфологічного аналізу.

Кількість РНК в умовних одиницях на одну клітину розраховували за формулою Kaplow.При цьому, застосовували бальну систему оцінки ступеня забарвлення структур наступної градації. Відсутність забарвлення цитоплазми при цитохімічній реакції приймається за негативний результат. 1-й ступінь реакції – слабке дифузне забарвлення цитоплазми клітини , або наявність поодиноких забарвлених гранул; 2-й ступінь – забарвлена речовина заповнює майже всю клітину, тільки де неде зустрічаються незафарбовані ділянки цитоплазми; 3-й та 4-й ступені – інтенсивно забарвлена речовина заповнює всю цитоплазму клітини, часто покриває і ядро. [11].

РОЗДІЛ 3

Результати власних досліджень

Через місяць споживання піддослідними тваринами суміші солей важких металів (цинку, хрому та свинцю при цитохімічному дослідженні у піддослідних тварин відмічається незначна активізація синтетичних процесів у цитоплазмі на рівні синтезу білка (рис.2,3).

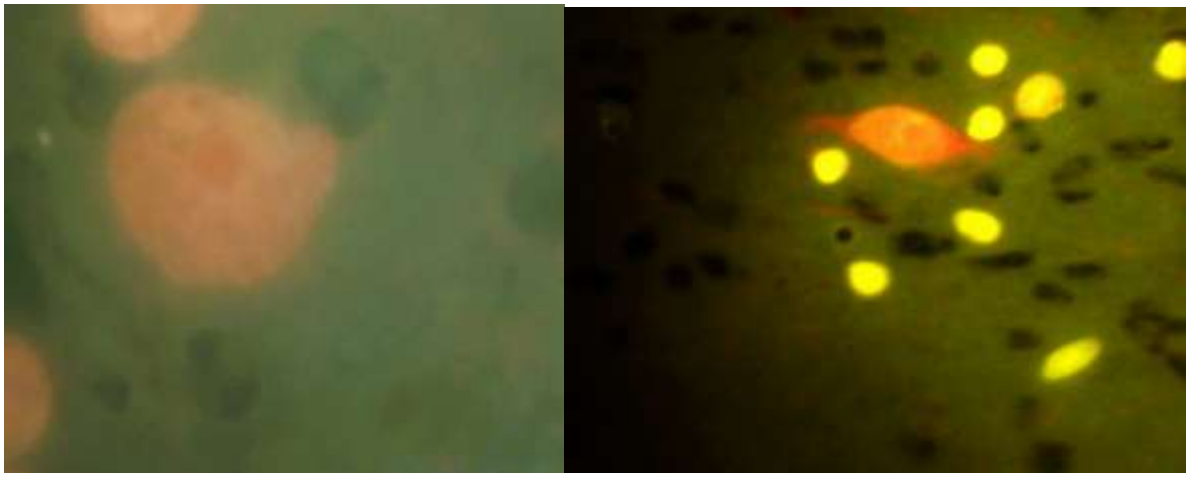

Рис. 2,3 – Активація синтезу білка в нейронах кори головного мозку тварин першого місяця досліду. Акридиновий помаранчевий, Об. 90*, ок. 10*., Об. 40*,ок. 10*.

Про це свідчить збільшення світіння РНК-структур у цитоплазмі частини нейронів, середній та високой ступінь насиченості нейронів цією нуклеїновою кислотою, проліферація ядер та внутрішньоядерних структур (збільшення їх розмірів, об'єму ядерець та ступеня світіння в них РНК – структур, кількості ядерець). Вказані зміни можна віднести до компенсаторно- пристосувальних у відповідь на дію пошкоджуючого фактору. Морфологічні зміни в нейронах мають проліферативний характер. Нейрони кори мали нечіткі контури, в основному, овальну форму. Від цитоплазми відходять один або два відростки. Ядра клітин поліморфні, мають дрібні, середні та великі розміри. Ядерно-цитоплазматичне відношення (індекс) зменшується і становить1:1,1. У декотрих клітинах ядра займають майже всю цитоплазму. Хроматинова сітка більшої частини ядер (в

основному, великих розмірів) придатна для дослідження, флуоресцує зеленим, або жовто-зеленим кольором. Каріомембрана має чіткі розміри, каріоплазма – ніжну, дрібнопетлисту хроматинову сітку. В ядрах відмічено знаходження одне ядерце, яке вільно лежить у каріоплазмі, займаючи центральне положення, без зв'язку з внутрішньою каріомембраною. Ядерця в ядрах контуруються чітко, мають яскраво-червоний колір, середню та високу насиченість РНК- структурами. Це не відрізняє їх за розмірами, формою та розташуванням у ядрі від ядерець у контрольних тварин. Ступінь конденсації хроматину в ядрі мінімальний. Цитоплазма нейронів має сіре забарвлення, з напиленістю червоного кольору різної насиченості. Запиленість червоного кольору передається на ядра та відростки таких клітин. Ядра люмінесцують жовтим кольором. Брилки РНК розташовуються, головним чином, у перикаріоні та дендритах, проектуються на ядра, утворюючи згущення – капішон. Нервова глія мала зелене фарбування як ядер, так і міжклітинної речовини, напиленості червоного кольору в глії не відмічалося.

Кількість РНК в клітинах оцінювалась за ступенем насиченості перікаріона нейронів напиленістю червоного кольору, що відповідає речовині Ніcля. Розрахунки кількості РНК проводилися в умовних одиницях на одну клітину за формулою Кеплоу.

Ступінь насиченості РНК – структурами: відмічено незначне зростання насиченості РНК - структурами цитоплазми нейронів та їх відростків. Оцінка за формулою Кеплоу: 2-3(забарвлена речовина заповнює майже всю клітину, рідко зустрічаються незафарбовані ділянки цитоплазми), а в поодиноких клітинах – до 4-х умовних одиниць (інтенсивно забарвлена речовина заповнює всю цитоплазму клітини, часто покриває і ядро). Це свідчить про середню та високу насиченість РНК- структурами частини нейронів цих тварин.

У тварин після 60-ти денного терміну досліду, у корі головного мозку, спостерігаються більш виражені морфологічні та цитохімічні зміни

пірамідних нейронів. Домінують морфологічні зміни регресивного типу з порушенням регенеративних процесів.

На цитохімічному рівні спостерігається зменшення вмісту РНК – структур у цитоплазмі **частини** клітин, підвищення конденсації хроматинової сітки ядер нейронів та деструкція ядер. Знижується рівень насичення РНК- структурами цитоплазми нейронів, що відображається у зменшенні ступеню насиченості цитоплазми нейронів запиленістю червоного кольору (речовиною Ніcля).

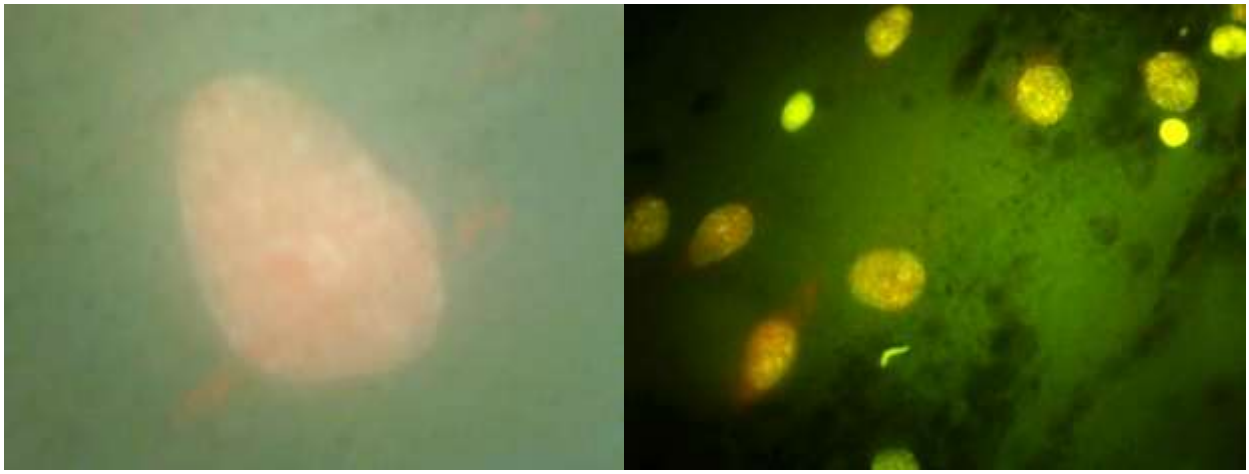

Рис.4,5 – Конденсація хроматина ядра, зменшення насиченості цитоплазми РНК-структурами в нейронах кори головного мозку тварин другого місяця досліду. Акридиновий помаранчевий, Об. 90*, ок. 10*., Об. 40*,ок. 10*.

У більшості нейронів відмічається середній та низький ступінь насиченості РНК-структурами цитоплазми нейронів цих тварин. Хроматофільна субстанція заповнює частину цитоплазми та має блідо-червоне забарвлення. Ступінь насиченості РНК-структурами у ядерці таких клітин корелює з показниками насиченості цитоплазми. На фоні нейронів середнього та низького ступеня світіння РНК – структур у цитоплазмі зустрічається незначна кількість клітин з високим ступенем світіння РНК-структур (яскраво-червоного кольору), що свідчить про розвиток у цих клітинах компенсаторно-пристосувальних процесів.

Морфологічно відмічається підвищення ступеня конденсації хроматинової сітки ядер нейронів, а також їх деструкції. Хроматин ядер нейронів знаходиться у більш конденсованому вигляді, ніж у тварин першої серії. Одна третина ядер має пошкоджену або нечітку каріомембрану, нечітку, гомогенну, грубо- та дрібнопетлисту хроматинову сітку. Ядра мають більші розміри, з наростаючою конденсацією еухроматину у вигляді множинних грудок. Від 1 до 8 грудок конденсованого гетерохроматину вільно розташовуються у каріоплазмі, без зв'язку з ядерцем та внутрішньою каріомембраною. Вони мають різний розмір (від малих до великих), овальну або сферичну форму. У деяких ядрах хроматин має схильність до згущення біля внутрішньої оболонки ядра. У клітинах з малим вмістом РНК структур у цитоплазмі, а їх переважаюча більшість, ядерця в ядрах не контуруються, або контуруються слабо, люмінісцують яскраво- жовтим світінням. Це вказує на недостатню кількість в ядерцях РНК-структур. У тих поодиноких нейронах, що мають достатню насиченість РНК структурами (++++), ядерця також мають достатню кількість вказаних структур, лімінісцують яскраво-червоним кольором (++++).

Контури цитоплазми чіткі, без ушкоджень. Глія в усіх піддослідних тварин малозелене забарвлення ядер та міжклітинної речовини, напиленості червоного кольору в її цитоплазмі не відмічалось.

Поряд з деструктивно зміненими нейронами, у частини клітин, на цитохімічному рівні, виявляються ознаки внутрішньоклітинних реперативних процессів, що, насамперед, торкаються змін у стані ядра та внутрішньоядерних структур, стану білкового обміну у ядрі та цитоплазмі нейронів та приводять до повного, або часткового відновлення структури ядра та білкового синтезу в нейронах. Репаративні зміни у нейронах найкраще виявляються на цитохімічному на субмікроскопічному рівнях.

У тварин, **після 90-то денного терміну експерименту**, морфологічні зміни пірамідних нейронів наростають і носять дифузний поліморфний

характер. Спостерігається суттєве пригнічення білкового синтезу в цитоплазмі нейронів (рис. 6,7).

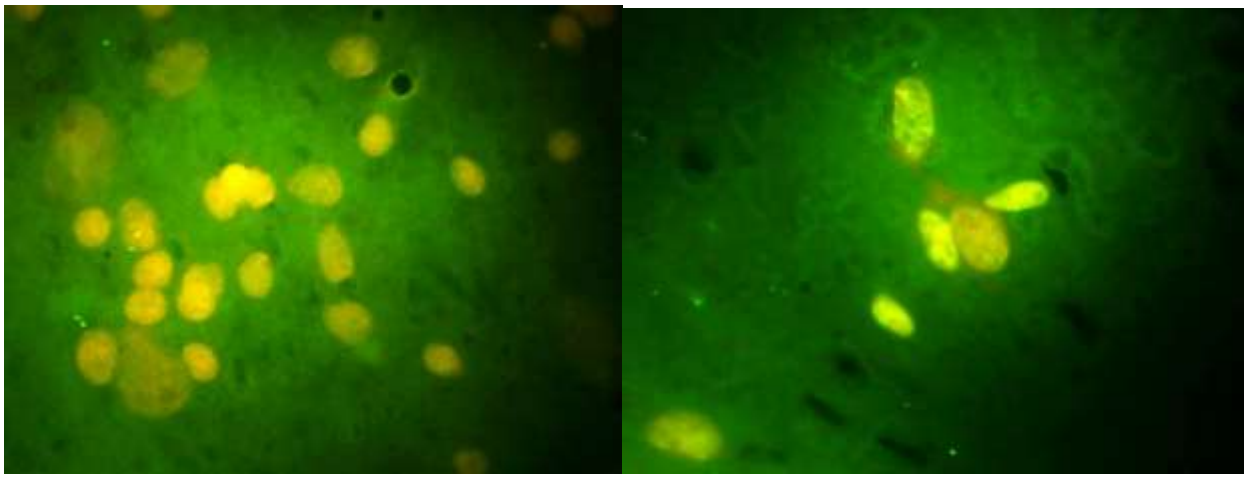

Рис. 6,7 – Різке пригнічення білкового синтезу в нейронах кори головного мозку тварин третього місяця досліду. Акридиновий помаранчевий, Об. 40*,ок. 10*

Хроматофільна субстанція піддається хроматолізу з розпиленням та, у частини клітин, практично повному розчиненню нісслєвських брилок (тигроліз). Спостерігається значне зниження вмісту РНК- структур у цитоплазмі та ядерцях нейронів кори великих півкуль головного мозку. Згідно цитоморфологічних критеріїв оцінки цитологічних препаратів: нейрони мають овальну та пірамідну форму, овальні ядра, що займають у цитоплазмі ексцентричне положення. Цитоплазма клітин – бліда, люмінісцує неяскраво-зеленим світлом. У клітин виражені відростки, що збільшені в розмірах, потовщені, добре виявляються та пофарбовані в пригнічені сіро-зелені відтінки. Напиленості червоного кольору, що притаманне вмісту РНК-структур, у цитоплазмі більшої частини досліджених нейронів не виявлено. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення становить 1:2,6. Ядра клітин сприймають фарбник нерівномірно, люмінісценція ядер неоднорідна (від не яскраво-зеленого до жовтого, з помаранчевим відтінком, чи жовто-зеленого). Це свідчить про неодинакову насиченість ядер ДНК та нерівномірний розподіл цієї нуклеїнової кислоти в ядрах. Хроматинова сітка ядер гомогенна, спостерігається наростаюча конденсація еухроматину в ядрах.

При цьому, хроматинова сітка ядра приймає дрібно-, або велико-зернисту структуру. Нерідко брилки гетерохроматину скупчуються біля внутрішньої частини каріотеки та навколо ядерця. Подекуди в ядрах контурується по 1-2 брилок гетерохроматину, що характеризуються середніми розмірами, сферичною формою та вільним розташуванням у каріоплазмі. В ядрах спостерігається зменшення кількості ядерець. Ядерця в ядрах здебільшого не контуруються, або в ядрах нараховується по 1 – 2 ядерця, що зміщені до каріомембрани. Ядерця гіпертрофовані, не містять РНК-структур(запиленості червоного кольору), люмінісцують сіро-зеленим кольором.

Невелика кількість нейронів має незначну запиленість цитоплазми речовиною блідо-червоного кольору(+ та ++ умовні одиниці). При цьому, такий же ступінь вмісту РНК-структур спостерігається і в збережених ядерцях цих клітин. Отже, подальша тенденція до збільшення ступеня конденсації хроматину ядер та зниження активності синтезу РНК в цитоплазмі клітин слід розглядати як зменшення активності синтетичних процесів у клітинах. Таким чином. збільшення тривалості експериментів викликає пригнічення білкового синтезу з розвитком дистрофічних та деструктивних змін у цитоплазмі та ядрах нейронів.

Висновки

Таким чином, нами опрацьовано і проаналізовано значний масив наукових літературних даних впродовж усіх термінів експерименту. На основі проведеної роботи ми змогли зробити наступні висновки:

1.В умовах впливу на організм солей важких металів у клітинах кори головного мозку спостерігається зміна синтетичної активності нейронів, насамперед, білкового обміну.

2.Місячний експеримент характеризується незначною активізацією синтезу білка, що слід розцінювати як компенсаторно-пристосувальну реакцію на дію пошкоджуючого фактора.

3.Збільшення тривалості експерименту викликає пригнічення білкового синтезу з розвитком дистрофічних та деструктивних змін у цитоплазмі та ядрах нейронів. Після другого місяця досліду спостерігається поступове пригнічення білкового синтезу в цитоплазмі клітин, зменшення біосинтетичної активності хроматину ядра та наростання реактивних змін у нейронах.

4. В нейронах кори великих півкуль головного мозку щурів 3 місяця досліду розвиваються поліморфні дистрофічні, атрофічні та деструктивні зміни, більшість з яких є незворотніми. У клітинах кори головного мозку спостерігається поступове гальмування синтезу РНК і різке пригнічення білковосинтетичних процесів. Все це веде до пригнічення регенеративних процесів.

Список літератури

1. Балан Г.М. К клинике и лечению неврологических и абдоминальных нарушений при хронической свинцовой интоксикации / Г.М.Балан, И.В Юрченко, Л.В. Игнатенко, Г.Н. Проданчук, Л.Н. Гиль, В.И. Стахович, Н.Н. Голованова .// Совр. пробл. токсикол. –2003. –№4. – с. 50-56.

2. Беккельман И. Нейротоксические эффекты многолетней экспозиции свинцом/ И. Беккельман, Э. Пфистер // Мед. труда.—2001.– №5.– С. 22-25.

3. Богоявленська В.Ф. Вплив забруднювачів довкілля на формування показників функціонального стану потомства в експерименті / В.Ф.Богоявленська, А.В.Сташенко, Г.О.Єкімова, О.Г.Бичова, Д. В.Риженко Быков В.Л. Совр. пробл. токсикол. –2001. –№4. – С. 66-69.

4. Бродский В.Я. Трофика клетки/ В.Я.Бродский – М.: Изд. «Наука», 1966.– С.5–289.

5. Быков В.Л. Цитология и общая гистология. Функциональная морфология клеток и тканей человека/ В.Л. Быков. – Санкт-Петербург: СОТИС, 2000.– 100с.

6. Воронова Н.В. Анатомия центральной нервной системы/ Н.В.Воронова, Н.М. Климова, А.М. Менджерицкий – Москва: Аспект пресс, 2008 – 126с.

7. Громова О.А. Нейротрофическая система мозга: нейропептиды, макро- и микроэлементы, нейротрофические препараты/О.А.Громова// Международный неврологический журнал.– 2007.– № 2. – С. 94-104.

8. Добровольский Л.А. Современные представления о влиянии низких уровней тяжелых метал лов на иммунную и другие системы / Л.А. Добровольский, И.Г. Белашова, Е.Л. Радванская // Довкілля та здоров'я.— 2005.– №2.– С.73-78.

9. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в Сумській області у 2000 році. — Суми : Видавництво "Джерело", 2001.

10. Завильгельский Г.Б. Акридиновые красители как эффективные регуляторы фотохимических реакций в нуклеиновых кислотах / Г.Б. Завильгельский., О.Н. Рудченко, В.В. Данилейченко// Биофизика.—1969.– №24, т.1.– С. 34-42.

11. Зеленин А. В. Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот / А. В. Зеленин – М.: Наука, 1974.—134с.

12. Зингер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот/ В.Зингер (перев.с англ.под ред.акад. Б.К.Вайнштейна) – М.: Мир, 1987.

13. Кондрашев А.В. Анатомия нервной системы/ А.В.Кондрашев, О.А. Каплунова.—Москва: Медицинское образование, 2008.—219с.

14. Лозовая О.Г.Токсичность свинца и влияние его на физиологическую активность дрожжей/ О.Г. Лозовая // Совр. пробл. токсикол. —2004. —№2. – С. 60-64.

15. Луговской С.П.Морфо-функціональна характеристика головного мозку щурів при хронічному впливі на організм малих доз свинцю/ С.П.Луговской // Совр. пробл. токсикол. –2005. –№3. – С. 23-28.

16. Лужников Е.А. Острые отравления / Е.А Лужников, Л.Г.Костомарова – Москва.:Медицина, 2000. - С. 21—355.

17. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология /[Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С.]. — Москва : Медицина, 1991. — 496с.

18. Патоморфология нервной системы / [Никулеску И.Т.]. — Бухарест:Мед.издательство, 1963.—987с.

19. Патофизиология / [.Новицкий В.В., Гольдберг Е.Д.,. Уразова О.И.]. – Москва: издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2009 --356с.

20. Приходько О.О. Морфофункціональні зміни периферичної крові в умовах дії екзогенних чинників хімічної природи/ О.О. Приходько// Вісник Сумського державного університету. Серія Медицина.—2009.-- .. Т. 1, № 2.-- С. 34-42.

21. Руководство по гистологии. Частная гистология органов и систем / [Данилова Р.К, Быкова В.Л., Одинцова И.А]. – Санкт-Петербург: СпецЛит., 2001. – 285с.

22. Сокуренко Л.М. Морфологічні зміни спинномозкових гангліїв за умов мікромеркуріалізму та використання терапії, що стимулює метаболічні процеси / Л.М. Сокуренко, Ю.Б.Чайковський // Український морфологічний альманах. – 2008. Т. 6, № 1.– С. 169-171.

23. Старовойтова Р.О. Судово-цитологічний атлас тканин та органів людини/ Р.О. Старовойтова, І.М. Дручініна, В.Г. Бурчинський, Г.Ф. Кривда, О.П. Ліщенко.– Херсон:«Наддніпряночка», 2011.– С.1-105.

24. Трахтенберг І. Книга про отрути та отруєння / І. Трахтенберг// Тернопіль : ТДМУ « Укрмедкнига», 2008. – с.122-123.

25. Шамало С.М. Вплив тіотриазоліну на регенерацію периферійного нерва за умов довготривалого мікромеркуріалізму/ С.М. Шамало, Ю.Б. Чайковский, А.В. Корсак // Вісник морфології. – 2010.– №16(1).– С. 99-101.

26. Шкорбатов Ю.Г. Структурні та електрокінетичні властивості ядер клітин букального епітелію людини у зв′язку з дією фізико-хімічних факторів та зміною функціонального стану організму: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора. біолог. наук: спец. 03.00.11 ,,Цитологія, клітинна біологія, гістологія’’ / Ю.Г. Шкорбатов. — Київ, 2005. — 26 с.

27. Ярыгин Н.Е. Патологические и приспособительные изменения нейронов / Н.Е.Ярыгин, В.Н.Ярыгин —М : Медицина, 1973 . — С.41-91.

28. Current state of developmental toxicity: The clinicians view: Тез.[EUROTOX 2002, Budapest, 15–18 Sept., 2002]/ Ornoy Asher// Toxicol. Lett.– 2002.– 135, прил. 1.– С. 27.– Англ.– ISSN 0378-4274.– NL.

29. Finkelstein Yoram, Markowitz Morri E, Rosen Yohn F. Low —level leadinduced neurotoxicity in children. An update on central nervous system effects // Brain Res. Rev. —1998. —27, №2. —P. 168—176.

30. Johansson C., Castoldi A.F., Onishchenko N. Et al. Neurobehavioral and molecular changes induced by methyl mercury exposure during development // Neurotox/ Res. – 2007/ - V.ll, №3-4.-P.241-260.

31. Zinc is essential for brain development and function: Тез. [6 International Conference of the International Society for Trace Elements Research in Humans (ISTERH) "Trace Element Research for a New Century", Quйbec City, Sept. 15–20, 2001]/ Sandstead Harold H.// J. Trace Elem. Exp. Med.– 2001.– 14, № 3.– С. 364–365.– Англ.– ISSN 0896-548X.– US.

32. Zinc movement and its functional significance in the brain: Тез. [6 International Conference of the International Society for Trace Elements Research in Humans (ISTERH) "Trace Element Research for a New Century", Quйbec City, Sept. 15–20, 2001]/ Takeda Atsushi, Hirate Maki, Minami Akira, Oku Naoto// J. Trace Elem. Exp. Med.– 2001.– 14, № 3.– С. 288.– Англ.– ISSN 0896-548X.– US.