

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В АРКУАТНЫХ ЯДРАХ ГИПОТАЛАМУСА РАСТУЩИХ КРЫСЯТ ПОД ВЛИЯНИЕМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

А.В. Смирнов, В.Б. Писарев

*Отдел общей и экспериментальной патологии ВНЦ РАМН
и Администрации Волгоградской области*

Согласно современным представлениям нейропептиды, вырабатываемые нейронами гипоталамуса, выделяются в первичную капиллярную сеть портальной системы и регулируют выработку гормонов аденогипофизом [1]. По мнению De Myer W. (1998) АЯ (аркуатные ядра) вырабатывают ряд нейрогипофиз-связанных гормонов, к которым автор относит адренокортикотропный гормон, β -эндорфин, дофамин. Некоторые нейроны АЯ содержат одновременно нейропептид У и кортикотропин-рилизинг фактор [5]. Острый иммобилизационный стресс приводит к увеличению уровня иРНК нейропептида У в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса [6, 9].

В последние годы особенно активно изучаются аспекты структурной организации ядер гипоталамуса при различных воздействиях, в том числе под влиянием бактериального эндотоксина [3], невесомости [8], при моделировании сердечной недостаточности [10], однако не приводятся данные о характере морфологических изменений аркуатных ядер в условиях стрессового воздействия в раннем постнатальном онтогенезе.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить морфологические изменения в аркуатных ядрах гипоталамической области растущих крысят под влиянием иммобилизационного стресса.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование воздействия иммобилизационного стресса (ИС) осуществляли на беспородных белых крысах (48 животных) в исходном возрасте 30-ти суток. Экспериментальных животных (24 крысы) подвергали воздействию ИС в течение 24 часов в сутки путем помещения в клетки-пеналы, выполненные из металлической сетки. Эвтаназию проводили под эфирным наркозом на 3, 7, 15, 30 сутки экспериментального воздействия в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных". Контролем служили крысы тех же возрастов, находившиеся в стандартных условиях вивария.

Фиксацию кусочков исследуемых органов производили в 10 % нейтральном формалине. С блоков готовили парафиновые срезы толщи-

ной 4–6 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, тионином по методу Ниссля, импрегнировали азотнокислым серебром по Шабашу в модификации Ландау.

На фронтальных срезах гипоталамуса с помощью системы анализа изображений, программы "Видеотест-Морфо" определяли количество нейронов и глиальных клеток в поле зрения, среднюю площадь нейронов, их ядер, рассчитывали их объемы и отношение ядра к цитоплазме перикариона.

Для обеспечения рандомизированной репрезентативной выборки проводили систематический случайный отбор на каждом уровне исследования [2]. Вариационно-статистическую обработку результатов исследования проводили в среде электронных таблиц MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных в исходном возрасте 30 суток, подверженных иммобилизационному стрессу (ИС) в течение 3-х суток, аркуатное ядро было представлено рыхло расположенными нейронами.

Большинство нейронов имело небольшие размеры перикарионов, полигональные очертания. Ядро нейрона было, как правило, небольшого размера, округлое, везикулярное, центрально расположенное. Ядрышко было, как правило, хорошо выражено, находилось в центральной области ядра или несколько эксцентрично. Цитоплазма перикарионов базофильная, при окраске по методу Ниссля глыбки хроматофильной субстанции были распределены равномерно в цитоплазме перикариона. Отмечался небольшой перичеселлюлярный отек.

На препаратах импрегнированных азотнокислым серебром цитоплазма перикарионов демонстрировала умеренную степень аргирофилии. В пределах ядра определялось небольшое количество нервных волокон. В нейропиле определялись, преимущественно, глиальные и безмиелиновые нервные волокна.

На 7-е сутки значительная часть нейронов имела небольшие или близкие к средним размеры перикарионов, полигональные очертания. Строение нейрона являлось, как правило, характерным для данного возраста (рис. 1).

Единичные нейроны средних размеров имели резко очерченную звездчатую форму. Вокруг них отмечался значительный перичеселлюлярный отек. Отростки нейрона истончались. Ядро уменьшилось в размерах, округлое, располагалось несколько эксцентрично, содержало крупное слегка эктопированное ядрышко. Цитоплазма перикариона обладала слабой базо- и ацидофилией, вакуолизирована, особенно в перинуклеарной области. Наблюдались тесные контакты нейронов с клетками микроглии (рис. 2).

На препаратах, импрегнированных азотно-кислым серебром, цитоплазма перикарионов демонстрировала различную степень аргирофилии от слабой до умеренной. В пределах ядра определялось небольшое количество нервных волокон.

В нейропиле определялись, преимущественно, глиальные и безмиелиновые нервные волокна. Из глиальных клеток отмечалось значительное количество микроглиоцитов. Танициты составляли несколько рядов клеток, посылали тонкие отростки в область изучаемого ядра. Отмечалось несколько меньшее количество капилляров в области исследуемого ядра, по сравнению с контролем соответствующего возраста.

На 15-е сутки ИС большинство нейронов аркуатного ядра имели небольшие размеры, полигональные очертания. Отмечался перичеселлюлярный отек. Цитоплазма перикарионов многих нейронов была в состоянии выраженного хроматолиза. Часть нейронов имела уменьшенные размеры, полигональные очертания. В узкой цитоплазме перикариона субстанция Ниссля была представлена в виде мелко распыленного материала. Из глиальных клеток отмечалось значительное количество микроглиоцитов.

В микроциркуляторном русле сохранялись явления умеренного полнокровия.

На 30-е сутки ИС нейроны аркуатного ядра имели меньшие размеры по сравнению с контролем соответствующего возраста, полигональные очертания были с хорошо различимыми тонкими отростками. Отмечался значительный перичеселлюлярный отек. Ядро нейрона было, как правило, меньших размеров, округлое, везикулярное, центрально расположенное. Ядрышко было хорошо выражено, находилось в центральной области ядра или несколько эксцентрично. Цитоплазма перикарионов подобных нейронов было в состоянии выраженного хроматолиза. Другая популяция нейронов имела многоугольные очертания, небольшие размеры (рис. 3, 4). Ядра содержали значительное количество гетерохроматина в виде тонкого фибриллярного и гомогенного материала. В цитоплазме перикариона отмечался выраженный гиперхроматоз. Встречались единичные нейроны с пикнозом ядер и явления-

ми кариорексиса. На препаратах импрегнированных азотнокислым серебром цитоплазма перикариона демонстрировала различную степень аргирофилии.

В нейропиле определялись, преимущественно, глиальные и безмиелиновые нервные волокна. Количество нервных волокон в пределах исследуемого ядра сохранялось умеренным. Из глиальных клеток обнаруживалось значительное количество микроглиоцитов.

В сосудах микроциркуляторного русла сохранялись явления умеренного полнокровия.

При морфометрическом исследовании максимально значимые изменения морфометрических параметров в аркуатном ядре гипоталамуса у растущих крыс месячного исходного возраста наблюдались в поздние сроки воздействия ИС (на 30-е сутки). Отмечалось достоверное снижение среднего объема перикарионов нейронов на 51,5 % (при $P < 0,001$), при этом средняя площадь перикарионов нейронов уменьшалась на 36,7 % (при $P < 0,001$). Средний объем ядра оказывался понижен на 64,2 % ($P < 0,001$). Отмечалось уменьшение как периметра перикариона на 17,7 % ($P < 0,001$), так и периметра ядра на 29,7 % ($P < 0,001$) (табл.).

В исследовании влияния невесомости на количество выделяемой мочи и объем внеклеточной жидкости, связанной с космическим полетом на растущих крысах [8] обнаружено, что эффект воздействия невесомости может затрагивать функцию гипоталамических нейросекреторных нейронов. Результаты исследования указывали, что космический полет в неполовозрелом возрасте может стимулировать необратимые изменения в окситоцинергических нейронах, что в свою очередь, может приводить к постоянным эндокринным и поведенческим нарушениям.

В нашем исследовании отмечалось некоторое отличие в морфологии аркуатного ядра в ранние сроки ИС по сравнению с контролем соответствующего возраста. Большинство нейронов демонстрировали признаки некоторой активации. В то же время в отдельных клетках определялись дистрофические изменения, сопровождающиеся микроглиальной реакцией.

В поздние сроки воздействия ИС отмечалось отставание процессов созревания нейронов аркуатного ядра. Обнаруживались популяции нейронов, которые, по-видимому, имеют различную степень функциональной активности: клетки с явлениями гиперхроматоза и клетки с явлениями хроматолиза, а также погибающие нейроны. Обнаруживаемый гетероморфизм мог свидетельствовать, на наш взгляд, в пользу существования в аркуатных ядрах у растущих крыс групп нейронов с повышенной и пониженной функцио-

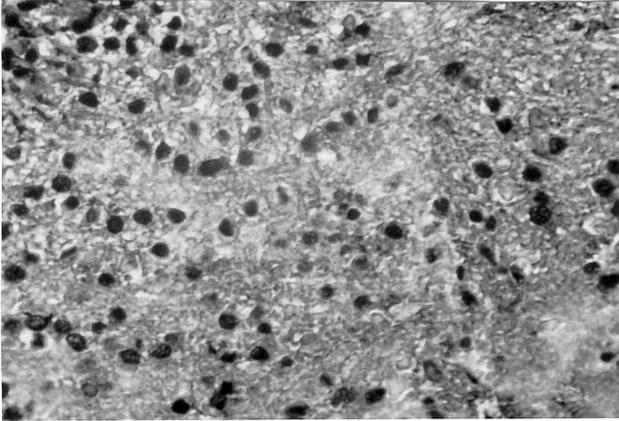


Рис. 1. Гистологическое строение аркуатного ядра гипоталамуса крысы в возрасте 37 суток. Импрегнация азотнокислым серебром. Ув. x 450

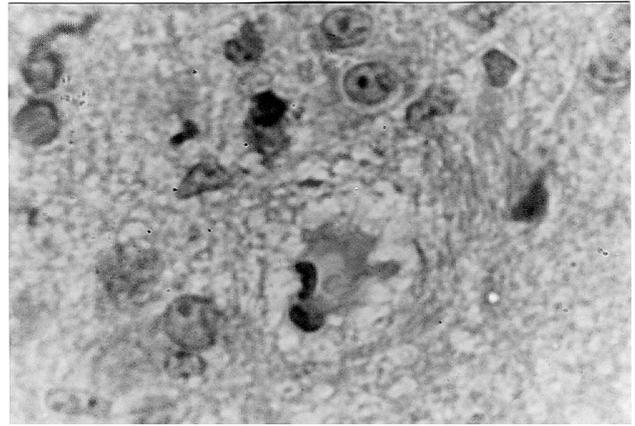


Рис. 2. Гистологическое строение аркуатного ядра гипоталамуса крысы в исходном возрасте 30 суток, помещенной в условия иммобилизационного стресса на 7 суток. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x 1000

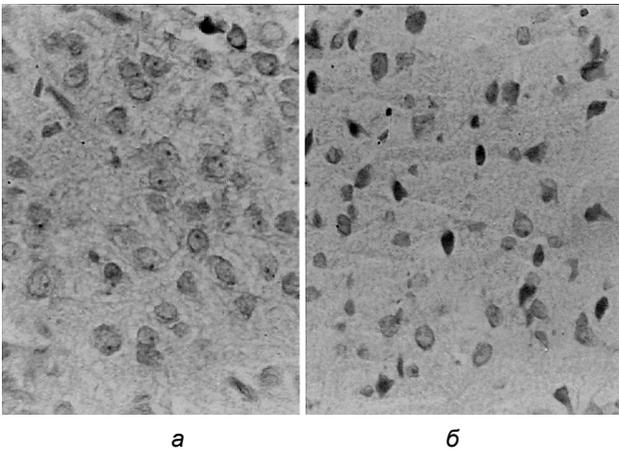


Рис. 3. Гистологическое строение аркуатного ядра гипоталамуса. Окраска по методу Ниссля. Ув. x 400: а – контрольной крысы (возраст 60 суток); б – и крысы в исходном возрасте 30 суток, помещенной в условия иммобилизационного стресса на 30 суток

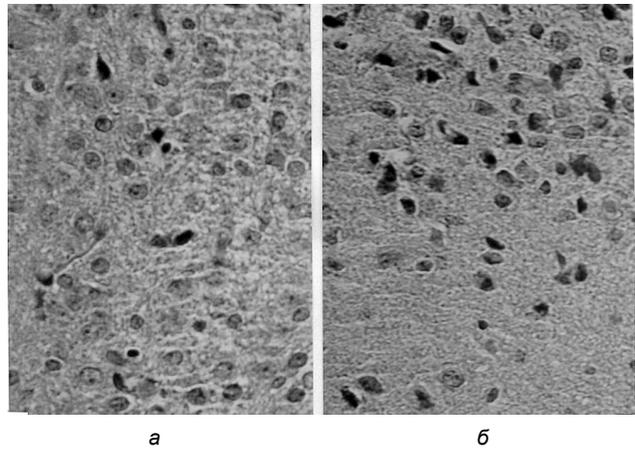


Рис. 4. Гистологическое строение аркуатного ядра гипоталамуса. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. x 450: а – контрольной крысы (возраст 60суток); б – крысы в исходном возрасте 30 суток, помещенной в условия иммобилизационного стресса на 30 суток

Таблица

Изменения морфометрических параметров аркуатного ядра гипоталамуса у растущих крыс под воздействием иммобилизационного стресса

Морфометрические параметры	Контроль,		Стресс,	
	Возраст (сут.)		Возраст+срок (сут.)	
	37	60	30+7	30+30
Средняя площадь перикариона, мкм ²	72,58±32,61	106,54±36,48	65,96±29,53	67,45±28,29***
Средний периметр перикариона, мкм	33,53±6,23	36,72±6,35	32,04±5,94	30,24±6,34***
Средний объем перикариона, мкм ³	481,36±271,32	775,40±418,11	377,24±292,15	375,94±269,11***
Средняя площадь ядра нейрона, мкм ²	23,14±10,06	37,03±12,21	19,53±12,14	18,58±9,63***
Средний периметр ядра нейрона, мкм	15,11±3,02	21,09±3,69	12,34±4,02	14,83±3,80***
Средний объем ядра нейрона, мкм ³	73,24±39,91	153,97±80,41	57,32±41,22	55,16±49,15***

Примечание. Различия с контролем статистически достоверны: * – (P < 0,05); ** – (P < 0,01); *** – (P < 0,001).

нальной активностью. Нейроны вентромедиальной части инфундибулярного ядра помимо нейропептида Y содержали иРНК рецептора кортикотропин-рилизинг фактора, а также экспрессируют его рецептор [5]. Аркуатное ядро гипоталамуса также содержало несколько других популяций нейронов, которые могли быть клетками-мишенями системы кортиколиберина и экспрессировать его рецепторы, например тубероинфундибулярные дофаминергические нейроны. Возможно, подобная клеточная неоднородность, обнаруживаемая у взрослых животных, имела и в препубертатном периоде, что может определять различия в запуске механизмов стресс-реализующих и стресс-лимитирующих систем в условиях стресса у растущего организма.

Изменения динамики морфометрических параметров свидетельствовали о нарушении процессов роста перикарионов аркуатного ядра (особенно выраженном в поздние сроки ИС), которое складывалось из преимущественного отставания формирования компонентов ядра нейрона и цитоплазмы перикариона.

Обнаруженная морфологическая картина имела схожую динамику со структурно-функциональными изменениями в паравентрикулярных ядрах (ПВЯ) гипоталамуса взрослых крыс при моделировании иммунного стресса [1], где доказано повышение секреции кортиколиберина в ПВЯ при остром стрессе и парадоксальное угнетение секреции при хроническом воздействии. Считается, что ПВЯ гипоталамуса может участвовать в подавлении деятельности тубероинфундибулярных дофаминергических нейронов, которая являлась критическим звеном в стрессовом ответе с участием пролактина [5]. Изменение синтеза рилизинг факторов в условиях стресса было связано не только с длительным ингибиторным действием глюкокортикоидов, но и с дисбалансом нейротрансмиттеров в гипоталамусе.

Smirnov A.V., Pisarev V.B. Morphological alterations of hypothalamic arcuate nuclei of growing rats during immobilization stress // Vestnik of Volgograd State Medical University. – 2005. – № 12. – P. 6–9.

The qualitative and quantitative structural changes in the neurons of hypothalamic arcuate nucleus of growing rats are found under the influence of immobilization stress different duration. Neuronal heteromorphism became more prominent. Maximal changes of morphometric parameters, which are marked at the long term of experiment (30 days), demonstrate the neuronal growth and maturation infringement.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острое стрессовое воздействие обуславливает выраженные гистологические изменения в аркуатных ядрах гипоталамуса растущих крыс. Морфологические характеристики могут быть расценены как свидетельства усиления их функциональной активности в сочетании с признаками повреждения некоторых нейронов.

При длительном воздействии иммобилизационного стресса в аркуатных ядрах гипоталамуса обнаруживаются качественные и количественные гистологические изменения, которые, преимущественно, характеризуются как дистрофические, свидетельствующие о нарушении процессов роста нейронов, их структурных компонентов и созревания других тканевых элементов в пределах ядра.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г. // Успехи физиологических наук. – 2003, Т. 34, № 4. – С. 4–15.
2. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
3. Лускина Е.Б., Гриневич В.В., Волкова О.В., Акмаев И.К. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 136, – № 8. – С. 148–151.
4. Судаков К.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1997. – № 2. – С. 124–130.
5. Campbell R.E., Grove K.L., Smith M.S. // Brain Res. – 2003. – Vol. 30, №. 973(2). – P. 223–232.
6. Conrad C.D., McEwen B.S. Acute stress increases neuropeptide Y mRNA within the arcuate nucleus and hilus of the dentate gyms. Brain. Res. – 2000. – Vol. 23. – №. 79 (1-2). – P. 102–109.
7. Fowler J.H., McCracken E., Dewar D., McCulloch J. // Brain Res. – 2003. – Vol. 991. – № 1–2. – P. 104–12.
8. Garcia-Ovejero D., Trejo J.L., Ciriza I., et al. // Brain Res. – 2001. – Vol. 24. – №. 130(2). – P. 191–205.
9. Krukoff T.L., MacTavish D., Jhamandas J.H. // J. Neuroendocrinol. – 1999. – Vol. 11. – №. 9. – P. 715–723.
10. Patel K.P., Zhang K., Kenney M.J., et al. // Brain Res. – 2000. – Vol. 19. – №. 865(1). – P. 27–34.