

НЕЙРОГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЕДУЛЛЯРНЫХ ЯДРАХ РАСТУЩИХ КРЫСЯТ ПОД ВЛИЯНИЕМ СТРЕССОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

А.В. Смирнов, Г.Л. Снигур, Д.Ю. Гуров

*Кафедра патологической анатомии ВолГМУ,
отдел общей и экспериментальной патологии ВНЦ РАМН
и Администрации Волгоградской области*

Продолговатый мозг, являясь релейной станцией на пути афферентного и эфферентного потоков информации, играет важную роль в модуляции многих физиологических функций, процессах адаптации к факторам окружающей среды, в том числе и к психоэмоциональному напряжению [3, 9, 10]. Известна также роль парасимпатических ядер продолговатого мозга и структур, тесно взаимосвязанных с симпатической нервной системой [5, 6]. Подобные элементы можно рассматривать как звенья взаимопротивоположных систем: стресслимитирующей и стрессреализующей [4].

Несмотря на то, что в последние годы активно изучаются многие аспекты поведенческих, в том числе стрессовых, реакций у детей и взрослых [6, 11], не приводятся данные о характере морфологических изменений медуллярных ядер в условиях стрессового воздействия в раннем постнатальном онтогенезе.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследовать нейрогистологические и иммуногистохимические изменения, возникающие в латеральном ретикулярном и двойном ядрах продолговатого мозга растущего организма под воздействием ранних сроков стрессового воздействия.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование воздействия эмоционально-болевого стресса (ЭБС) осуществляли на беспородных белых крысах (28 животных) в исходном возрасте 30-ти суток. Экспериментальных животных (14 штук) подвергали воздействию ЭБС в течение 3 часов в сутки путем групповой фиксации [5]. Эвтаназию проводили под эфирным наркозом на 3-и и 7-е 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-м % нейтральном формалине. С блоков готовили парафиновые срезы толщиной 4-6 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, тионином по методу Ниссля, импрегнировали азотнокислым серебром по Шаб-

дашу в модификации Ландау. Иммуногистохимическое определение белка нейрофиламентов NF-200 производили с использованием моноклональных антител в стрептавидин-биотиновой системе производства NovoCastral [2].

На фронтальных срезах продолговатого мозга с помощью системы анализа изображений, программы «Видеотест-Морфо 4.0» определяли среднюю площадь и суммарную площадь иммунопозитивной фазы. Для обеспечения рандомизированной репрезентативной выборки проводили систематический случайный отбор на каждом уровне исследования [1]. Вариационно статистическую обработку результатов исследования проводили в среде электронных таблиц MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

У контрольных животных в возрасте 33-37 суток латеральное ретикулярное ядро (ЛРЯ) достаточно хорошо отграничено от соседних ядер. Нейроны ЛРЯ сгруппированы по 2-3 клетки, окружены астроцитами и их отростками, образуя сеть, в ячейках которой находятся преимущественно безмиелиновые нервные волокна, собранные в пучки.

В ранние сроки (на 3-е сутки) иммобилизационного стресса форма перикарионов нейронов полигональная, приближается к овальной. Ядро нейрона, как правило, округлое или овальное, расположено центрально. Ядрышко крупных размеров, находится в центральной части ядра. У единичных нейронов эктопировано. К 7-м суткам воздействия количество нейронов с эктопированными ядрышками увеличивается. Цитоплазма перикарионов у большинства нейронов более базофильна по сравнению с контролем. Субстанция Ниссля мелко распылена и в некоторых участках образована мелкими гранулами. Отмечается нарастание гиперхроматоза к 7-м суткам. При импрегнации срезов азотнокислым серебром цитоплазма перикарионов нейронов аргирофильна, выглядит гомогенной. У значительного количества нейронов в цитоплазме перикарионов отмечается усиление аргирофилии. Количество расположенных перпендикулярно плоскости среза нервных волокон оказывалось несколько выше по сравнению с контролем. Отростки нейро-

нов, находящиеся в плоскости среза, образуют связи внутри изучаемого ядра. Их количество мало отличается от контрольной группы.

Уже на 3-и сутки воздействия отмечается повышенная экспрессия белка NF-200 в аксонах, находящихся в проекции ЛРЯ, расположенных перпендикулярно плоскости фронтального среза, по сравнению с контролем соответствующего возраста (рис. 1, 2).

Так, средняя площадь иммунопозитивной фазы увеличивается на 34,7 % ($P<0,05$), а средняя суммарная площадь иммунопозитивных фаз

незначительно снижается на 1,46 %. Перикарионы нейронов остаются иммунонегативными, что вполне соответствует иммуногистохимическим результатам, полученным при изучении нейронов головного мозга взрослых крыс [7, 8]. К 7-м суткам воздействия значимых изменений вышеобозначенных параметров не отмечается: средняя площадь иммунопозитивной фазы увеличивается на 31,6 %; средняя суммарная площадь иммунопозитивных фаз становится выше контрольных значений соответствующего возраста на 2,74 % (табл. 1).

Таблица 1

Изменения морфометрических параметров в ядрах продолговатого мозга растущих крыс под влиянием стрессового воздействия (иммуногистохимическое окрашивание моноклональными антителами к NF-200)

Морфометрические параметры	Контроль, возраст (сут.)		Стресс, возраст + срок (сут.)	
	33	37	30+3	30+7
Двойное ядро				
Средняя площадь иммунопозитивных объектов, мкм ²	11,93±2,24	11,39±1,70	10,11±1,53	6,02±0,65*
Объемная доля иммунопозитивных объектов	0,187±0,017	0,201±0,019	0,140±0,009*	0,119±0,008*
Латеральное ретикулярное ядро				
Средняя площадь иммунопозитивных объектов, мкм ²	5,36±0,62	5,67±0,87	7,22±0,98*	7,46±1,02*
Суммарная площадь иммунопозитивной фазы в поле зрения	0,174±0,009	0,188±0,011	0,172±0,007	0,193±0,011

* – различия с контролем статистически достоверны

У животных в исходном возрасте 33-37 суток двойное ядро (ДЯ) на фронтальных срезах имеет вид достаточно компактного скопления нейронов в вентролатеральной части продолговатого мозга. Изучаемое ядро образовано нейронами средних размеров, преимущественно овальной формы. Их цитоплазма умеренно базофильная, гранулы базофильной субстанции средних размеров, распределены равномерно. Отмечается постепенный рост размеров перикарионов нейронов. Глиальные клетки хорошо развиты. В проекции ДЯ имеется умеренно развитая сеть нервных волокон, выявляемая при импрегнции срезов азотнокислым серебром. При иммуногистохимическом исследовании в нервных волокнах, большинство из которых расположено перпендикулярно плоскости среза, наблюдается экспрессия белка NF-200.

У животных в исходном возрасте 30 суток на 3-и сутки эмоционально-болевого стресса в ДЯ наблюдается более плотное расположение нейронов. Перикарионы нейронов сохраняют полигональные очертания, однако к 7-м суткам отмечается некоторое отставание роста их размеров по сравнению с контролем того же возраста. Появляются нейроны, имеющие вытянутую форму перикариона. Ядро клетки округлое светлое, располагается, как правило, в центре, сохраняет крупные размеры. Ядрышко, как правило, одно, средних размеров, иногда эктопировано. В цито-

плазме перикариона гранулы субстанции Ниссля мелко распылены и располагаются по периферии. Отмечаются явления хроматолиза. При изучении срезов, импрегнированных азотнокислым серебром, в цитоплазме перикарионов большинства нейронов определяется повышенная степень аргирофилии. Между перикарионами нейронов располагается слабо развитая сеть безмиелиновых нервных волокон, расположенных в плоскости среза.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии белка NF-200 отмечается наличие значительно менее выраженного иммунопозитивного окрашивания по сравнению с контролем (рис. 3, 4). При автоматическом количественном анализе средней площади иммунопозитивного материала отмечается статистически достоверное уменьшение вышеуказанного параметра, уже начиная с 3-х суток стрессового воздействия.

Так, средняя площадь иммунопозитивной фазы на 3-и сутки опыта снижается на 15,2 %, а средняя суммарная площадь иммунопозитивных фаз значимо уменьшается на 25,4 % ($P<0,01$). На 7-е сутки стрессового воздействия отмеченные тенденции сохраняются. Средняя площадь иммунопозитивной фазы понижена по сравнению со значениями данного параметра у контрольных животных того же возраста на 47,1% ($P<0,001$). Средняя суммарная площадь иммунопозитивных фаз снижена на 40,6 % ($P<0,001$).

В экспериментах, проведенных на взрослых животных, в латеральном ретикулярном ядре (ЛРЯ) обнаруживается уменьшение содержания $\alpha 2$ A-адренорецепторной РНК в адренергических нейронах под влиянием стрессового воздействия [10].

Обнаруживаемое в результатах нашего исследования увеличение плотности расположения нервных волокон в ЛРЯ, а также увеличение средней площади иммунопозитивных аксонов и их оптических параметров демонстрирует изменение структурной организации латерального ядра ретикулярной формации и о повышении содержания отдельных белковых компонентов нейрофиламентов в нейронах растущих крыс при остром ЭБС. Увеличение количества нервных волокон, находящихся в проекции исследуемого ядра, по нашему мнению, отражает увеличение информационного потока, поскольку латеральное ретикулярное ядро считается релейной станцией, обеспечивающей соматосенсорный контроль, поскольку находится в непосредственной нейротопографической близости от спиноталамического тракта и имеет афферентные и эфферентные связи с мозжечком и красным ядром.

Усиление гиперхроматоза цитоплазмы перикарионов нейронов в ЛРЯ, содержащих светлое ядро и выраженное ядрышко, является морфологическим признаком, свидетельствующим, возможно, об активации синтетических процессов в нейронах изучаемого ядра под влиянием ранних сроков иммобилизационного стресса. Подобная морфологическая картина не противоречит исследованиям других авторов (Mansi J.A. et al., 2000), обнаруживших в перикарионах нейронов ЛРЯ взрослых животных увеличение содержания энкефалина, участвующего в регуляции некоторых аспектов адаптационных реакций при остром стрессе.

Напротив, обнаруживаемая гипохромия цитоплазмы перикарионов нейронов в ДЯ может быть расценена как признак некоторого снижения функциональной активности. Выраженное уменьшение экспрессии NF-200 в ДЯ, подтверждаемое значимыми количественными изменениями, свидетельствует, о возможности структурных повреждений цитоскелета аксонов растущих нейронов в условиях острого стрессового воздействия, биохимические механизмы которого остаются неизученными [7].

Выделяемые в последние годы не только физиологические, патологические, но также амбивалентные системы, взаимодействуют, оказывая взаимопротивоположные эффекты, ограничивая и подавляя свой структурно-функциональный антипод [4]. При ЭБС достижение приспособительного результата возможно при формиро-

вании функциональной стрессреализующей системы необходимой для осуществления определенных механизмов (в первую очередь гуморальных и симпатических) и, наконец, для остановки дальнейшей мобилизации рабочих компонентов, если завершено достижение конечного эффекта. В то же время влияние парасимпатической нервной системы, рассматривается в контексте сохранения гомеостаза и восстановления структурных ресурсов, а её компоненты могут быть включены в состав стресслимитирующей системы, угнетаемой при остром стрессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острое стрессовое воздействие обуславливает гистологические и иммуногистохимические изменения в латеральном ретикулярном ядре продолговатого мозга растущих крыс. Морфологические характеристики могут быть расценены как свидетельства усиления функциональной активности ретикулярной формации ствола головного мозга.

Гистологические и иммуногистохимические изменения в двойном ядре продолговатого мозга имеют противоположную направленность, что свидетельствует о возможности структурных повреждений цитоскелета аксонов растущих нейронов в условиях острого стрессового воздействия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – Казань, 2000. – 279 с.
3. Судаков К.В. // Бюлл. exper. биол. и медицины. 1997. – № 2. – С. 124–130.
4. Хитров Н.К., Салтыков А.Б. // Бюлл. exper. биол. и медицины, 2003. – №7. – С. 4–10.
5. Юматов Е.А. // Эмоциональный стресс: теоретические и клинические аспекты / Под ред. Судакова К.В., Петрова В.И. – Волгоград, 1997. – С. 23–28.
6. Beauchaine T. // Dev. Psychopathol. – 2001. – Vol. 13, №2. – P.183–214.
7. Fowler J.H., McCracken E., Dewar D., McCulloch J. // Brain Res. – 2003. – Vol. 991, № 1–2. – P. 104–112.
8. Garcia S.J., Seidler F.J., Slotkin T.A. // Environ. Health Perspect. – 2003. – Vol. 111, №3. – P. 297–303.
9. Mansi J.A., Laforest S., Drolet G. // J. Neurochem. – 2000. – Vol. 74, №6. – P. 2568–2575.
10. Meyer H., Palchadhuri M., Scheinin M., Flugge G. // Brain Res. – 2000. – Vol. 880, № 1–2. – P. 147–158.
11. Porges S.W. // Int. J. Psychophysiol. – 2001. – Vol. 42, №2. – P. 123–146.

Smirnov A.V., Snigur G.L., Gurov D.Y. Neurohistological and immunohistochemical alterations in medullar nuclei of growing rats under the stress influence // Vestnik of Volgograd State Medical University. – 2004. – N 2(11). – P. 8–10.

The lateral reticular nucleus and nucleus ambiguus of the medulla oblongata of growing rats under influence of the emotional-pain stress were investigated with neurohistological and immunohistochemical staining. These results indicate the safety structure of neurons in lateral reticular nucleus with hyperchromatosis of perikarya. There are structural alterations of neurons in the nucleus ambiguus. Immunohistochemically the average square of immunopositive fibers labeled by monoclonal antibodies to NF-200 was reduced.

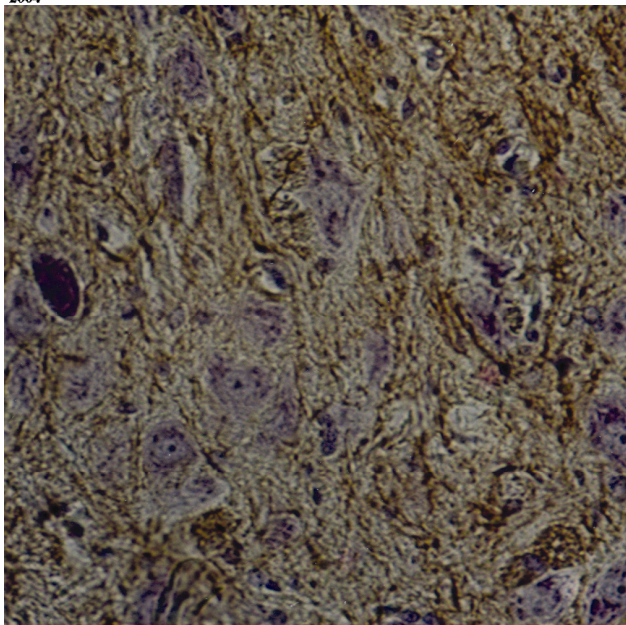


Рис. 1. Латеральное ретикулярное ядро контрольной крысы в возрасте 33 суток. Иммуногистохимическое окрашивание моноклональными антителами к NF-200 - гематоксилин. Ув.х400

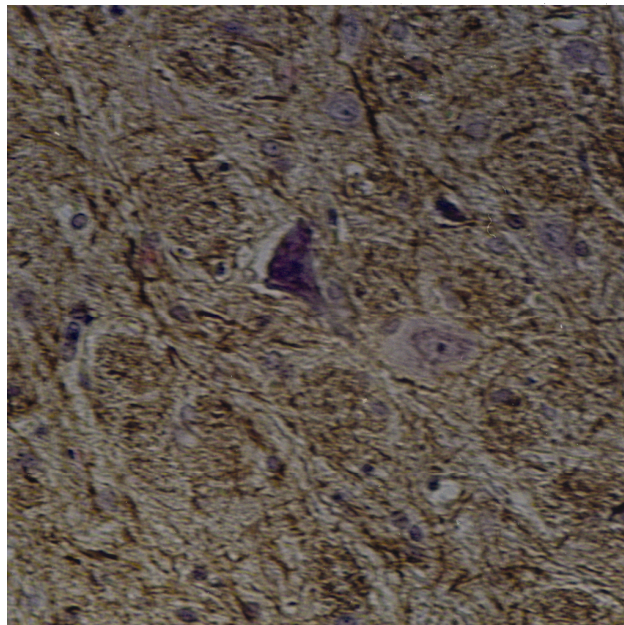


Рис. 3. Двойное ядро контрольной крысы в возрасте 33 суток. Иммуногистохимическое окрашивание моноклональными антителами к NF-200 - гематоксилин. Ув.х400

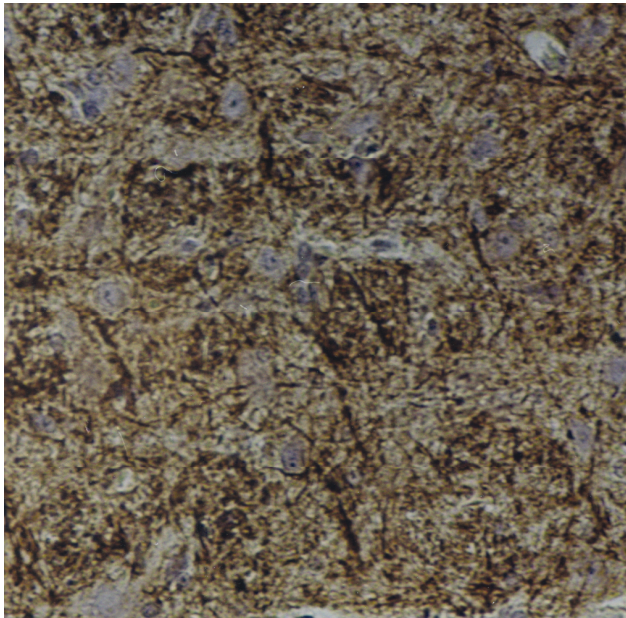


Рис. 2. Латеральное ретикулярное ядро крысы в исходном возрасте 30 суток на 3-и сутки стрессового воздействия. Иммуногистохимическое окрашивание моноклональными антителами к NF-200 - гематоксилин. Ув.х400

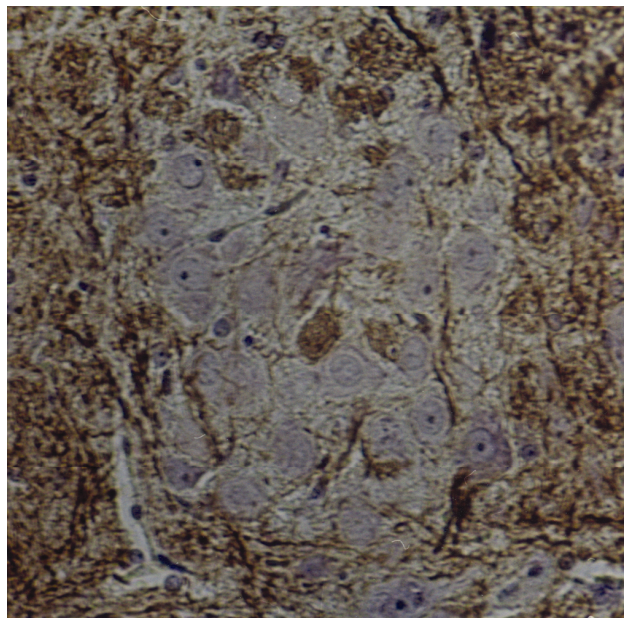


Рис. 4. Двойное ядро крысы в исходном возрасте 30 суток на 3-и сутки стрессового воздействия. Иммуногистохимическое окрашивание моноклональными антителами к NF-200 – гематоксилин. Ув.х400

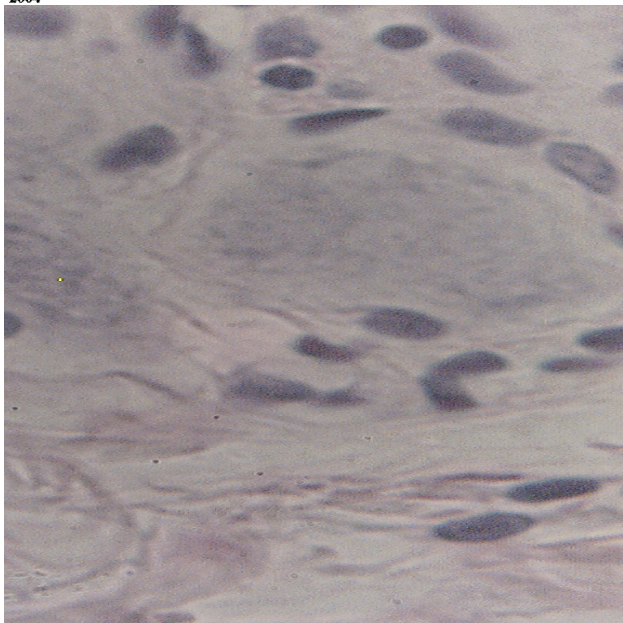


Рис. 1. Внутрисердечный ганглий при хроническом эндотоксикозе. 30 суток. Выраженные цитоплазматические изменения ганглионарных нейронов. Явления нейрофагии. Окр. гематоксилином и эозином. Иммерсия 800

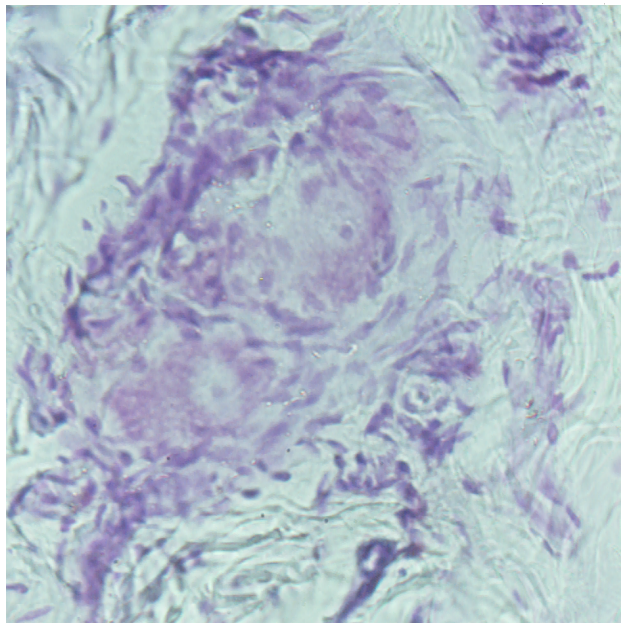


Рис. 3. Внутрисердечный ганглий при хроническом эндотоксикозе. 60 суток. Неравномерное распределение РНК в цитоплазме ганглиоцитов. Минимальное присутствие РНК в глиоцитах. Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 320

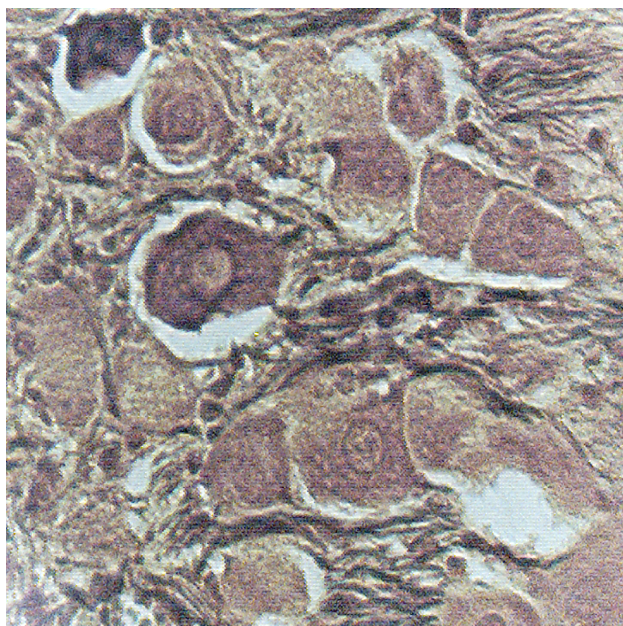


Рис. 2. Внутрисердечный ганглий при хроническом эндотоксикозе. 30 суток. Неравномерная аргентофилия нейронов. Извитость нервных проводников. Серебрение. Ув. 320

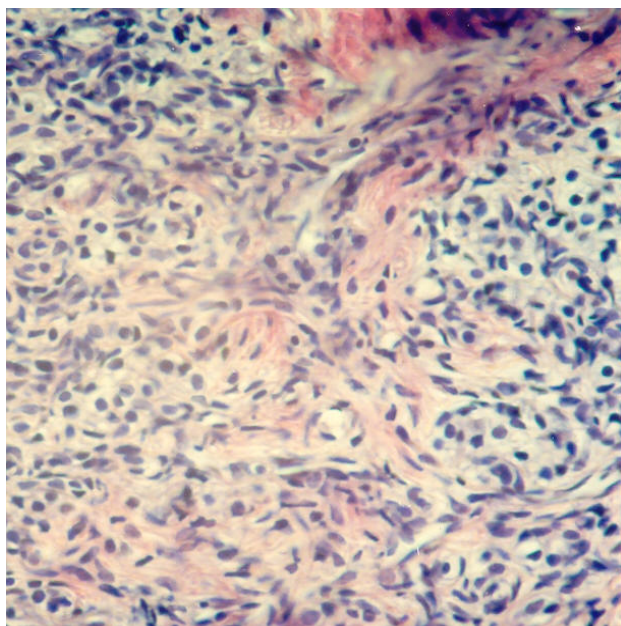


Рис. 4. Внутрисердечный ганглий при хроническом эндотоксикозе. 90 суток. Замещение ткани ганглия соединительной тканью. Окр. гематоксилином и эозином. Ув. 320