

УДК 612.82

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЯДЕР ПЕРЕДНЕГО ГИПОТАЛАМУСА В ОБЕСПЕЧЕНИИ СТРЕСС-РЕАКТИВНОСТИ ОРГАНИЗМА

<sup>1</sup>Постнова М.В., <sup>1</sup>Новоцадов В.В., <sup>2</sup>Потанин М.Б.

<sup>1</sup>ФГАОУ ВПО «Волгоградский государственный университет»,

Волгоград, e-mail: postnova@volsu.ru;

<sup>2</sup>Компания «Agfa Healthcare», Москва

В рамках выявления структурных основ стресс-реактивности у белых крыс изучена морфология супраоптических (SO), супрахиазматических (SCh) и паравентрикулярных (PV) ядер гипоталамуса. Исследование выполнено у интактных и стрессированных крыс с высокой и низкой реактивностью, с помощью классических гистологических, морфометрических и иммуногистохимических методик (маркеры астроцитов и микроглиальных клеток). Для оценки фазы и интенсивности стрессорной реакции определяли концентрации АКТГ и кортизола в сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа. Показано, что у животных с высокой реактивностью имеются структурные предикты более высоких триггерных свойств SO и PV в формировании нейроэндокринного ответа на стрессор при относительно меньшей резистентности к повреждению. Это предполагает у них более быстрое истощение механизмов стрессорного ответа. Выявленные особенности лежат в основе вариабельности адаптивных гомеостатических реакций и играют ключевую роль в обеспечении стресс-реактивности.

**Ключевые слова:** гипоталамус, гомеостаз, реактивность, стресс

## MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL PECULIARITIES OF ANTERIOR HYPOTHALAMUS NUCLEI IN THE ENSURING STRESS-REACTIVITY

<sup>1</sup>Postnova M.V., <sup>1</sup>Novochadov V.V., <sup>2</sup>Potinin M.B.

<sup>1</sup>FGAOU VPO «Volgograd State University», Volgograd, e-mail: postnova@volsu.ru;

<sup>2</sup>The Agfa Healthcare Company, Moscow

The morphology of supraoptic (SO), supraschiasmatic (SCh) and paraventricular (PV) hypothalamic nuclei studied on white rats as a part of the establishing structural basics of stress-reactivity. These structures studied in intact and stressed animals, pre-differentiated by phenotypic manifestations of constitutional reactivity, using classical histological, morphometric, and immunohistochemical methods (to mark astrocytes and microglial cells). To evaluate the phase and intensity of stress reactions the serum concentrations of ACTH and cortisol were determined by enzyme immunoassay. It is revealed for SO and PV in animals with high reactivity to have structural predicts of higher trigger properties in neuroendocrine response to the stressor and, the same time, relatively lower resistance to damage. This finding implies more rapid depletion of stress response reactions in such animals. The identified features underlie the variability of adaptive reactions and homeostasis and are crucial in ensuring stress-reactivity of the organism.

**Keywords:** hypothalamus, homeostasis, reactivity, stress

Многочисленными исследованиями подтверждено, что гипоталамус относится к основным структурам, обеспечивающим последовательность нейроэндокринных изменений при стрессе и стресс-реактивность организма [2, 4, 9, 12]. К наиболее активным и в то же время наиболее уязвимым гипоталамическим структурам при стрессе были отнесены паравентрикулярное (PV) и супраоптическое (SO) ядра [6, 11].

Менее изученным остается вопрос о типологических особенностях строения гипоталамуса, в основе которых лежит генетически детерминированное своеобразие молекулярных механизмов трофики, сигнального управления и специфической функции нейронов и глиальных клеток. Именно они в совокупности определяют итоговый баланс нейромедиаторов и триггерных гормонов стресса (прежде всего – кортиколиберина и АКТГ), интенсивность местных процессов и системных нейро-

иммуно-эндокринных взаимодействий, обеспечивая тем самым индивидуальную динамику ответа организма на стрессорное воздействия, обозначаемое как стресс-реактивность [6].

**Цель исследования** – выявить в эксперименте структурные основы различной стресс-реактивности на уровне фенотипических особенностей ядер переднего гипоталамуса.

### Методы и материалы исследования

Эксперимент проводили на 32 нелинейных белых крысах породы Вистар массой от 220 до 240 г. При проведении работы руководствовались этическими нормами, изложенными в «Международном кодексе медицинской этики» (1994), Хельсинской декларации (2000) и Директивах Европейского сообщества 86/609ЕЕС.

Уровень реактивности животных определяли как фенотипически устойчивое (конституциональное) свойство организма, используя два теста: по порогу болевой чувствительности [5] и по величине

30-минутного градиента температуры при действии малых доз (0,1 мг/кг внутривенно) липополисахарида *S. Typhimurium* [7]. На основе совпадения результатов двух тестов было отобрано по 16 животных с высокой (BP) и низкой реактивностью (HP). Хронический стресс моделировали путем 2-часовой иммобилизации через день в течение трех недель по 8 животных BP и HP групп, остальные составили контрольные группы. Этаназию производили путем декапитации под легким эфирным наркозом, что обеспечивало минимальное повреждение тканей головного мозга [6]. Для оценки фазы и интенсивности стрессорной реакции определяли концентрации АКГТ и кортизола в сыворотке крови с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Использовали спектофотометр StatFax 2100, вошер StatFax 2600 (Awareness Technology, USA) и готовые наборы «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия).

Мозг разделяли фронтальной секцией через точку P<sub>0</sub> в координатах Хорслей–Кларка на два блока и готовили по 50 фронтальных срезов с задней поверхности переднего блока и 100 срезов – с передней поверхности заднего блока, что позволяло в полном объеме выявить цитоархитектонику SO, супрахиазматического (SCh) и PV ядра гипоталамуса [14]. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Нисслю [3]. Иммуногистохимическое исследование проводили готовыми наборами производства DakoCytomation (Дания) для выявления макрофагального антигена (окрашивает

микроглиальные клетки) и кислого глиального протеина (визуализирует астроциты). Количественно определяли объемную долю нейронов (%), средние объемы ядер нейронов (мкм<sup>3</sup>), среднее число граничных нейронов и астроглиоцитов в окружении нейрона, а также коэффициент микроглия/нейрон. В условиях стресса также рассчитывали степень повреждения нейронов (по А.И. Чубинидзе в модификации [6], в баллах), общую потерю нейронов (%) и степень глиальной реакции, оцененную по приросту яркости в окраске на микроглиальные клетки (усл. ед.).

**Результаты исследования и их обсуждение**

SO визуализировалось в виде плотного овоидного скопления крупных нейронов, примерно по 50–60 клеток на срезе; SCh – как неравномерное скопление 30–40 полигональных нейронов средних и небольших размеров несколько каудальнее SO; PV – под эпэндимой третьего желудочка в виде крупноклеточной части из 60–80 компактно сгруппированных нейроэндокринных клеток и мелкоклеточной части, расположенной более латерально. Данные количественного морфологического анализа представлены в табл. 1.

**Таблица 1**

Показатели морфометрии основных ядер переднего гипоталамуса крыс с различной реактивностью (M ± m)

Морфометрические показатели	Реактивность	
	Низкая	Высокая
<b>Супраоптическое ядро</b>		
Объемная доля нейронов, %	36,2 ± 2,1	24,9 ± 1,3 *
Средний объем ядер нейронов, мкм <sup>3</sup>	372,0 ± 18,9	452,0 ± 30,6 *
Среднее число граничных нейронов в объеме	13,9 ± 0,7	9,1 ± 0,6
Среднее число граничных астроцитов	5,7 ± 0,4	6,1 ± 0,4
Коэффициент микроглия/нейрон	5,53 ± 0,34	3,45 ± 0,23 *
<b>Супрахиазматическое ядро</b>		
Объемная доля нейронов, %	40,2 ± 2,5	48,4 ± 2,7 *
Средний объем ядер нейронов, мкм <sup>3</sup>	169,3 ± 7,1	327,0 ± 11,8 *
Среднее число граничных нейронов в объеме	14,8 ± 1,1	15,3 ± 1,2
Среднее число граничных астроцитов	4,6 ± 0,3	4,0 ± 0,3
Коэффициент микроглия/нейрон	8,31 ± 0,57	5,01 ± 0,36 *
<b>Паравентрикулярное ядро</b>		
Объемная доля нейронов, %	47,5 ± 2,2	44,8 ± 1,9
Средний объем ядер нейронов, мкм <sup>3</sup>	414,7 ± 30,1	435,8 ± 29,4
Среднее число граничных нейронов в объеме	17,7 ± 1,3	11,0 ± 0,6 *
Среднее число граничных астроцитов	7,1 ± 0,4	4,6 ± 0,3 *
Коэффициент микроглия/нейрон	8,12 ± 0,48	8,07 ± 0,48

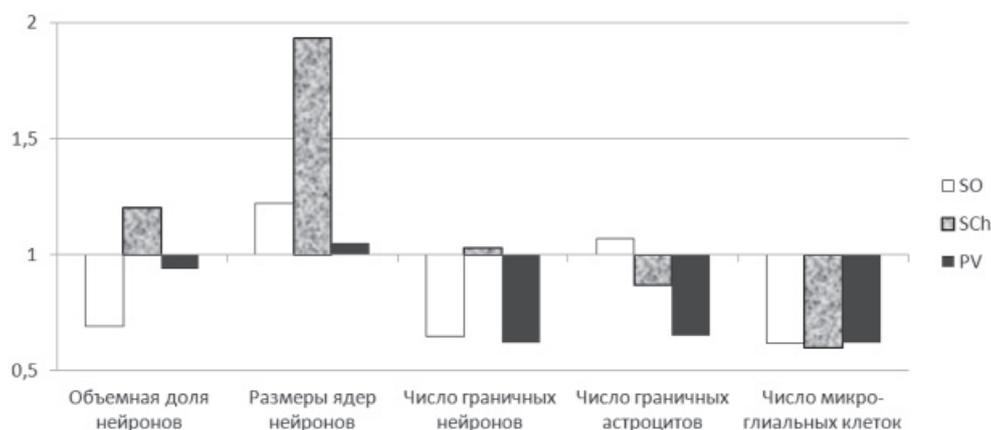
Примечание. \* – достоверные различия между группами.

Как видно из представленных данных, для SO животных BP группы были характерны относительно большая объемная доля нейронов, размеры их ядер и коэффициент глия/нейрон, но меньшее число граничных нейронов. Количество граничных астроцитов в SO не различалось между группами. Для SCh крыс с BP были харак-

терны относительно более высокие объемная доля нейронов и средний объем ядер (в 1,92 раза больше, P < 0,001), но относительно низкий коэффициент микроглия/нейрон. Количества граничных нейронов и граничных астроцитов практически не различались между собой. Объемная доля нейронов, средние размеры ядер клеток

и коэффициент микроглия/нейрон в PV были сходными у животных ВР и НР групп. В то же время на один нейрон в PV животных ВР группы приходилось относительно

меньше граничных нейронов и астроцитов. В целом наиболее яркие структурные отличия выявлены в SO и SCh, а минимальные – в PV (рисунок).



*Особенности строения ядер переднего гипоталамуса, связанные с высокой реактивностью. За единицу принято значение показателя в НР группе животных*

При анализе данных различий следует принимать во внимание такие ключевые моменты, как потенциальные функциональные возможности отдельных нейронов и сложность нейронного окружения, которая предполагает как серьезную синергию их деятельности, так и наличие защитно-трофических свойств нейроглии [7, 8, 10].

В совокупности выявленные особенности могут быть расценены как свидетельство относительно более сложной внутренней организации SO гипоталамуса и его относительно большей потенциальной резистентности к повреждающим воздействиям у животных с НР. У животных с ВР организация SO менее сложная, но его нейроны обладают признаками более интенсивных триггерных реакций при нейросекреторной регуляции гомеостаза. Для SCh можно говорить о примерно равных функциональных возможностях у животных с различной реактивностью, но при большей потенции SCh к триггерным реакциям у животных ВР группы, но большей резистентности к нагрузкам и повреждающим воздействиям – у животных с НР. В отношении PV крыс с ВР не выявлено структурных предпосылок к его большей активности или большей устойчивости к действию повреждающих факторов и функциональных перегрузок, в сравнении с аналогичным ядром у крыс НР группы.

Моделирование стресса сопровождалось у животных ВР группы снижением АКТГ крови до  $1,25 \pm 0,10$  пг/мл (против  $3,88 \pm 0,31$  пг/мл в контроле,  $P < 0,001$ ) и повышением уровня кор-

тизола до  $27,05 \pm 2,24$  нмоль/л (против  $18,09 \pm 1,50$  нмоль/л в контроле,  $P < 0,01$ ), что расценено как начальная стадия истощения адреналовой (стрессорной) гормональной оси. Определено по уровню гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы – АКТГ и кортизол. У животных НР группы после стресса в крови выявлено умеренно высокое количество АКТГ ( $4,13 \pm 0,38$  пг/мл против  $3,03 \pm 0,27$  пг/мл в контроле) и крайне высокое содержание кортизола ( $93,72 \pm 10,09$  нмоль/л против  $20,75 \pm 1,86$  нмоль/л,  $P < 0,001$ ). Это соответствовало фазе напряжения острого стресса [9].

Стресс-индуцированное повреждение нейронов в значительной степени варьировало по глубине в различных ядрах переднего гипоталамуса. Данные морфометрии представлены в табл. 2.

У интактных животных степень повреждения нейронов составляла несколько процентов только в SO и PV, что было связано с наличием нейросекретии и была заметно большей у крыс ВР группы. Стресс-индуцированные изменения нейронов у животных ВР группы были достаточно интенсивными в SO (22%) и PV (25,6%) при явно меньшей степени повреждении нейронов SCh (9,4%). У крыс НР группы степень повреждения нейронов оказывалась значительно меньше и не превышала 14,3%. Общая потеря нейронов варьировалась в меньшей степени и составляла в среднем от 6,5% (SCh) до 11,3% (PV) в ВР группе и от 3,5% (SCh) до 6,53% (PV) – в НР группе. Выраженность глиальной реакции при

стрессе была заметно выше у животных ВР группы.

Таким образом, в наибольшей степени при стрессе поражаются нейроны SO и PV, в наименьшей степени – SCh. Высокая реактивность является фактором, обеспечивающим за счет выявленных ранее струк-

турных особенностей (относительно более сложная организация нейронного окружения и высокое микроглиальное представительство), относительно большие повреждения SO и SCh в сравнении с изменениями при стрессе в аналогичных ядрах переднего гипоталамуса у животных с НР.

**Таблица 2**

Количественные показатели повреждения основных ядер переднего гипоталамуса крыс с различной реактивностью при хроническом стрессе (M ± m)

Морфометрические показатели	Реактивность			
	Низкая		Высокая	
	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс
<b>Супраоптическое ядро</b>				
Степень повреждения нейронов, баллов	0,6 ± 0,1	14,3 ± 1,1 *	2,7 ± 0,2 #	22,0 ± 1,2 **
Общая потеря нейронов, %	0	3,2 ± 0,2 *	0	7,5 ± 0,5 **
Глиальная реакция, усл. ед.	7,8 ± 0,4	21,7 ± 1,4 *	10,6 ± 0,7	65,3 ± 4,5 **
<b>Супрахиазматическое ядро</b>				
Степень повреждения нейронов, баллов	0	3,8 ± 0,5 *	0	9,4 ± 0,2 **
Общая потеря нейронов, %	0	1,9 ± 0,1 *	0	6,5 ± 0,4 **
Глиальная реакция, усл. ед.	5,1 ± 0,3	11,6 ± 0,6	7,3 ± 0,5 *	29,5 ± 1,7 **
<b>Паравентрикулярное ядро</b>				
Степень повреждения нейронов, баллов	0,5 ± 0,1	13,8 ± 1,4 *	3,5 ± 0,2 #	25,6 ± 1,3 **
Общая потеря нейронов, %	0	6,5 ± 0,6 *	0	11,3 ± 0,9 **
Глиальная реакция, усл. ед.	8,9 ± 0,6	30,5 ± 2,2 *	8,6 ± 0,5	63,8 ± 4,1 **

Примечание. \* – достоверные стресс-индуцированные изменения; # – между ВР и НР группами.

С учетом того, что описанные гипоталамические ядра напрямую связаны с реализацией нейроэндокринной программы стресса [1, 13], их относительно меньшая резистентность у животных с ВР позволяет предположить у таких животных более быстрое истощение механизмов стрессорного реагирования на соответствующие по силе воздействия окружающей среды.

**Заключение**

Одной из структурных основ генетически детерминированной (конституциональной) реактивности являются морфофункциональные особенности ядер переднего гипоталамуса. У лабораторных животных с высокой реактивностью выявлены структурные предикты более высоких триггерных свойств и активности SO и PV (в меньшей степени – SCh) в нейросекреторной регуляции гомеостаза при меньшей резистентности к действию факторов высокой интенсивности. Выявленные особенности являются основой варибельности механизмов гомеостазирования и адаптивных реакций, обусловленными различиями в реактивности организма.

**Список литературы**

1. Влияние антител к глутамату на развитие стресс-реакций и содержание нейромедиаторов в гиппокампе и гипоталамусе у крыс с разной поведенческой активностью / Л.А. Ветрилэ, И.А. Захарова, В.С. Кудрин, П.М. Клодт // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, № 3. – С. 293–298.
2. Депрессия антистрессовых механизмов как основа развития патологического процесса А.А. Хадарцев, В.Н. Морозов, А.Г. Хрупачев и др. // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 4-2. – С. 371–375.
3. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
4. Миронова В.И., Рыбникова Е.А. Устойчивые модификации экспрессии нейрогомонов в гипоталамусе крыс в модели посттравматического стрессового расстройства // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2008. – Т. 94. – № 11. – С. 1277–1284.
5. Мулик А.Б. Универсальный метод оценки уровня общей неспецифической реактивности организма человека и традиционных видов лабораторных животных // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11: Естественные науки. – 2012. – № 2. – С. 11–15.
6. Писарев В., Смирнов А.В., Гуров Д.Ю. Варибельность структур центральной нервной системы и её роль в развитии патологических процессов. – Волгоград: Волгоградское научное издательство, 2006. – 131 с.
7. Радиальная морфометрия нейронов в оценке конституционально обусловленных особенностей структур промежуточного мозга / Д.Ю. Гуров, В.Б. Писарев, В.В. Новочадов, М.Б. Потанин // Вестник Волгоградского го-

сударственного медицинского университета. – 2005. – № 1. – С. 6–8.

8. Blunted HPA axis response to stress is related to a persistent dysregulation profile in youth / L. Ayer, K. Greaves-Lord, R. R. Althoff, et al. // *Biol. Psychol.* – 2013. – Vol. 93, № 3. – P. 343–351.

9. Bruce S., McEwen A. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain // *Physiol Rev.* – 2007. – Vol. 87, № 3. – P. 873–904.

10. Contestabile A., Monti B., Polazzi E. Neuronal-glia interactions define the role of nitric oxide in neural functional processes // *Curr. Neuropharmacol.* – 2012. – Vol. 10, № 4. – P. 303–310.

11. Herman J.P., Flak J., Jankord R. Chronic stress plasticity in the hypothalamic paraventricular nucleus // *Progr. Brain Res.* – 2008. – Vol. 170. – P. 353–364.

12. Prenatal stress induces long-term effects in cell turnover in the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis in adult male rats / E. Baquedano, C. Garcia-Cáceres, Y. Diz-Chaves, et al. // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 11. – e27549. doi:10.1371/journal.pone.0027549.

13. Stress-dependent and gender-specific neuroregulatory roles of the apelin receptor in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute stress / M.J.F. Newson, G.R. Pope, E.M. Roberts, et al. // *J. Endocrinol.* – 2013. – Vol. 216, № 1. – P. 99–109.

14. Swanson L.W. Brain maps: structure of the rat brain. – Amsterdam: Elsevier, 1998. – 160 p.

### References

1. Vetrile L. A., Zakarova I. A., Kudrin V. S., Klodt P. // *Bull. Exp. Bio. Med. (Moscow)*. 2013, Vol. 155, no 3, pp. 293–298.

2. Khadartsev A.A., Morozov V.N., Khrupachev A.G., Karaseva Y.V., Morozova V.I. *Fundamentalnye Issledovaniya* [Fundamental Res.]. 2012, no. 4(2), pp. 371–375.

3. Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. *Osnovy gistologicheskoy tekhniki* [The basis of histological techniques]. SPb., SpecLit, 2010, 95 p.

4. Mironova V.I., Rybnikova E.A. // *Rus. J. Physiol. (Moscow)*. 2008, Vol. 94, no. 11, pp. 1277–1284.

5. Mulik A. B. *Optimizaciya medikobiologicheskogo eksperimenta in vivo* [Optimization of medico-biological experiment in vivo]. Volgograd, VIESP, 2003, 212 p.

6. Pisarev V.B., Smirnov A.V., Gurov D.Y. *Variabelnost' struktury tsentral'noy nervnoy sistemy i ee rol' v razvitiy patologicheskikh processov* [Structural variability of brain in the development of pathology]. Volgograd, Volgograd scientific edition, 2006, 131 p.

7. Gurov D. Yu., Pisarev V.B., Novochadov V.V., Potanin M.P. *Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta* [Herald of Volgograd State Med. Univ.]. 2005, no. 1, pp. 6–8.

8. Ayer L., Greaves-Lord K., Althoff R. R., Hudziak J. J., Dieleman G. C., Verhulst F. C., van der Ende J. *Biol. Psychol.* 2013, Vol. 93, no. 3, pp. 343–351.

9. Bruce S., McEwen A. *Physiol Rev.* 2007, Vol. 87, no. 3, pp. 873–904.

10. Contestabile A., Monti B., Polazzi E. *Curr. Neuropharmacol.* 2012, Vol. 10, no. 4, pp. 303–310.

11. Herman J. P., Flak J., Jankord R. *Progress in Brain Research.* 2008, Vol. 170, pp. 353–364.

12. Baquedano E., Garcia-Cáceres C., Diz-Chaves Y., Lagunas N., Calmarza-Font I., Azcoitia I., Garcia-Segura Luis M., Argente J., Chowen J. A., Frago L. M. *PLoS One.* 2011, Vol. 6, no. 11, e27549. doi:10.1371/journal.pone.0027549.

13. Newson M.J.F., Pope G.R., Roberts E.M., Lolait S.J., O'Carroll A.-M. *J. Endocrinol.* 2013, Vol. 216, no. 1, pp. 99–109.

14. Swanson L.W. Brain maps: structure of the rat brain. Amsterdam, Elsevier, 1998, 160 p.

### Рецензенты:

Яковлев А.Т., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Волгоград;

Ряднов А.А., д.б.н., доцент, заведующий кафедрой анатомии и физиологии животных, ФГБОУ ВПО «Волгоградский государственный аграрный университет», г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 15.08.2013.