

МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, ПАТОЛОГИЯ

УДК 611-018.13:599.323.4:615.45-001.1/.3-091

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АСТРОЦИТОВ МЕДУЛЛЯРНОГО ГИГАНТОКЛЕТОЧНОГО ЯДРА РАСТУЩИХ КРЫСЯТ ПОД ВЛИЯНИЕМ ОСТРОГО СТРЕССОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

А.В. Смирнов, П.А. Хлопонин, В.Б. Писарев, А.Я. Почепцов
*Кафедра патологической анатомии ВолГМУ,
Ростовский государственный медицинский университет*

Согласно современным представлениям большинство функциональных систем, определяющих оптимальный уровень различных показателей внутренней среды организма, детерминировано генетически, например стволовые дыхательные центры. Все компоненты этих систем включаются в функционирование сразу же по мере их онтогенетического созревания [2]. Однако процессы глиогенеза, формирование миелиновых оболочек аксонов продолжают и после дифференцировки нейронов [3]. Нейроны гигантоклеточных ретикулярных ядер (ГРЯ) образуют интегративные центры, обеспечивающие респираторный ответ организма [16], регулируют в различных адаптационных реакциях организма. Считается, что астроциты являются основными клетками-мишенями адренергической иннервации, регулирующей морфологическую пластичность, энергетический метаболизм, мембранный транспорт, проницаемость щелевых контактов, иммунологические ответы [8]. Однако характер ультраструктурных изменений астроцитов ГРЯ у растущего организма в условиях воздействия стрессовых факторов остается малоизученным.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить на ультраструктурном уровне астроциты медуллярного гигантоклеточного ядра растущих крысят в условиях острого стрессового воздействия.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование воздействия острого эмоционально-болевого стресса (ЭБС) путем групповой фиксации за холки осуществляли на бес-

породных белых крысах (14 животных) в исходном возрасте 30-ти суток. Экспериментальных животных (7 штук) подвергали воздействию ЭБС в течение 3 часов в сутки. Эвтаназию проводили под эфирным наркозом в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных". Контролем служили крысы того же возраста, находившиеся в стандартных условиях вивария.

Фиксацию кусочков продолговатого мозга размером 1 мм³ производили в течение 12 часов в 4 %-м растворе параформа на 0,1М какодилатном буфере с последующей постфиксацией в течение 2 часов в 1 % растворе тетраокиси осмия на 0,1М какодилатном буфере (рН = 7,4) при температуре +4 °С [10]. После промывки в нескольких порциях раствора какодилатного буфера материал подвергали дегидратации в спиртах возрастающей концентрации и заливали в смесь эпона и аралдита.

Ультратонкие срезы толщиной 50–90 нм получали на ультрамикротоме LKB-8800 и монтировали на медные сетки. После контрастирования в 2,5 %-м растворе уранилацетата на 50° этаноле в течение 40 минут и 0,3 %-м растворе цитрата свинца в течение 20 минут срезы изучались в электронных микроскопах JEM-100S и Tesla BS-540 при ускоряющем напряжении 60 кВ. Фотодокументирование производили с использованием фотопластинок "Для ядерных исследований". Электронные микрофотограммы изготавливали на фотографической черно-белой бумаге "Унибром 160 БП".

При электронно-микроскопическом изучении астроцитов медуллярных ГРЯ контрольных животных в исходном возрасте 30 суток определя-

ются основные органеллы общего значения и характерные ультраструктурные признаки данного вида клеток. Отмечается наличие в цитоплазме тела и отходящих отростков умеренно развитой сети, состоящей из пучков промежуточных филаментов, представленных в большем количестве в так называемой астроцитарной ножке, что свидетельствует о незавершенности глиогенеза в данном возрасте. Цитоплазма тела клетки еще составляет относительно небольшой объем, содержит свободные рибосомы. В отростках астроцитов, особенно контактирующих с капиллярами, цитоплазма характеризуется меньшей электронной плотностью.

При электронно-микроскопическом исследовании ультратонких эпон-аралдитовых срезов продолговатого мозга у растущих крыс, подвергнутых эмоционально-болевого стрессу (ЭБС) в течение 3 суток, отмечаются значительные изменения ультраструктурной организации нейронов и нейропиля в гигантоклеточных ретикулярных медуллярных ядрах, что соответствует современным представлениям о тесном метаболическом и трофическом взаимодействии нейронов и глиальных клеток в процессе дифференцировки в постнатальном онтогенезе [3, 11].

Ультраструктурные изменения в нейропиле складываются из изменений в глиальных клетках и волокнах. Протоплазматические и волокнистые астроциты имеют относительно небольшие размеры до 5–6 мкм в диаметре. Их ядра округлые 4–4,5 мкм в диаметре, содержат большое количество эухроматина. В некоторых клетках отмечается маргинация хроматина. Ядрышко достаточно выражено, средних или крупных размеров (до 1 мкм), иногда смещено на периферию ядра к ядерной оболочке, т. е. эктопировано (рис. 1). Цитоплазма большинства астроцитов отличается низкой электронной плотностью. Однако встречаются клетки, особенно расположенные периваскулярно, цитоплазма которых обладает пониженной электронной плотностью цитозоля. Отмечается различная степень выраженности реакций со стороны компонентов цитоплазмы астроцитов (как протоплазматических, так и фиброзных) на острое стрессовое воздействие. Многие клетки демонстрируют явления внутриклеточного отека с образованием неправильной формы вакуолей, расположенных в периферической части тела клетки, заполненных электронно-прозрачным содержимым и достигающих в диаметре 1 мкм (см. рис. 1). Отмечается небольшой перичеселлюлярный отек. Следует отметить, что наряду с подобными изменениями встречаются единичные астроциты, ультраструктура цитоплазмы которых не демонстрирует вакуолизации (см. рис. 2). Их отростки имеют неровные четкие контуры, обнаруживаются вблизи капилляров, содержат глиофибриллы (см. рис. 3). Количество

свободных рибосом несколько выше, чем в контроле, встречаются полисомы. Содержание про-

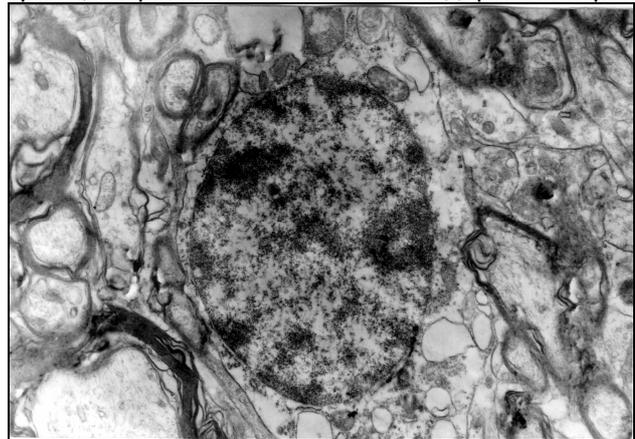


Рис. 1. Ультраструктура астроцита гигантоклеточного ретикулярного ядра продолговатого мозга крысы в исходном возрасте 30 суток, помещенной в условия эмоционально-болевого стресса на 3 суток. Явления внутриклеточного отека. Электронная микрофотограмма. Ув. $\times 20000$

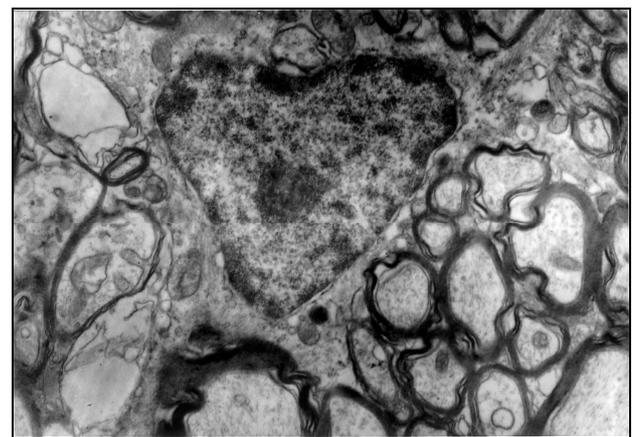


Рис. 2. Ультраструктура астроцита гигантоклеточного ретикулярного ядра продолговатого мозга крысы в исходном возрасте 30 суток, помещенной в условия эмоционально-болевого стресса на 3 суток. Отсутствие вакуолизации. Электронная микрофотограмма. Ув. $\times 20000$

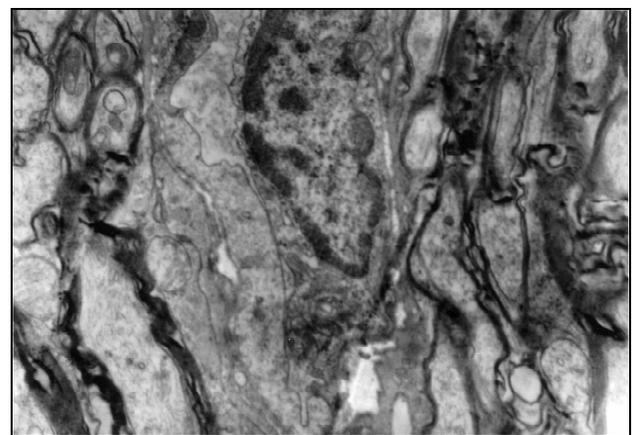


Рис. 3. Ультраструктура астроцита и периваскулярно расположенных отростков в гигантоклеточном ретикулярном ядре продолговатого мозга крысы в исходном

(13)

возрасте 30 суток, помещенной в условия эмоционально-болевого стресса на 3 суток. Электронная микрофотограмма. Ув. $\times 17000$

межуточных филаментов еще не достаточно высокое, что, по-видимому, объясняется особенностями постнатального глиогенеза. Митохондрии имеют округлую и овальную форму, небольшие размеры. Количество и структура крист в них идентичны контролю. Матрикс характеризуется равномерной электронной плотностью, хотя изредка наблюдаются очаговые просветления, как у контрольных, так и экспериментальных животных. Встречаются единичные лизосомы. В прилежащем к астроцитам нейропиле обнаруживаются также отростки других глиальных клеток, находящихся в состоянии резкого отека, демонстрирующих электронно-прозрачные участки цитоплазмы, не содержащие характерных элементов цитозоля.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У растущих неполовозрелых крыс астроциты медуллярных ГРЯ можно охарактеризовать как достаточно зрелые глиальные клетки, продолжающие процесс роста и формирования, что соответствует утвердившимся представлениям о сохраняющемся глиогенезе после завершения нейрогенеза [3].

Ультраструктура микроокружения нейронов и нейроглиальные взаимоотношения под влиянием внешних воздействий продолжают оставаться предметом пристального внимания со стороны исследователей [14]. Известно, что астроциты являются наиболее представительной группой глиальных клеток головного мозга, обеспечивающей поддержание метаболизма и трофику нейронов, модулирующей синаптическую активность [15].

В условиях воздействия стресса астроциты вместе с эндотелием кровеносных капилляров обеспечивают сохранение целостности гематоэнцефалического барьера, в механизмы защиты которого включены интерлейкины и оксид азота [9].

Поэтому обнаруживаемые нами в части астроцитов растущих крыс расширенные вакуоли в условиях острого стресса могут быть расценены как признаки повреждения ультраструктуры клетки, вероятно, ее эндоплазматического ретикулума, повреждения которого отмечены в условиях церебральной ишемии [15], связанные с нарушением кальциевого гомеостаза [6], и рассматриваются как морфологическое свидетельство нарушенного метаболизма и функциональной активности. Нами не отмечены значительные изменения со стороны митохондрий, то есть, по-видимому, экспериментальное воздействие не приводило к запредельному нарушению энергетического обмена в остром периоде, что говорит

о преобладании защитных, стресс-лимитирующих механизмов в астроцитах, к которым относятся, например, экспрессию интерлейкина-6, значительно увеличивающего участие глиоцитов и лимфоцитов ствола головного мозга в воспалительных реакциях, а также повышающего выработку провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1 и интерлейкина-12), фактора некроза опухоли альфа, трансформирующего рост фактора бета, нейротрофина-3, ангиопоэтина, сосудистого эндотелиального фактора роста в ответ на повреждающее воздействие 6-аминоникотинамида [13]. Наша точка зрения укладывается в рамки существующей концепции нейроиммунно-эндоринологии [1] и косвенно подтверждается обнаружением в растущих нейронах и глиальных клетках экспрессии молекул МНС I необходимых для нормального развития тканевых элементов головного мозга [6].

Некоторое увеличение содержания свободных рибосом в цитоплазме астроцитов, эктопия ядрышка и преобладание эухроматина в ядре, по-видимому, свидетельствует о сохранении или даже усилении в части клеточной популяции функциональной активности, обеспечивающей достаточную трофику и антиоксидантную защиту нейронов медуллярных ГРЯ в условиях острого стресса, а также способствующей самовыживанию и уклонению от апоптоза, наступающего при действии интенсивных раздражителей [5, 12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженные ультраструктурные изменения в астроцитах медуллярных гигантоклеточных ретикулярных ядер свидетельствуют о существенном, но не критическом повреждении данного вида глиальных клеток у растущего организма в условиях воздействия острого стресса, что, вероятно, отражается на их функциональной активности и проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Некоторая активация аппарата белкового синтеза астроцитов на фоне достаточно стабильного состояния митохондрий рассматривается как механизм, способствующий выживанию клетки и сохранению ее нейропротекторных функций.

Выявление на субклеточном уровне гетероморфизма астроцитов в условиях острого эмоционально-болевого стресса свидетельствует о возникновении микрообластей в пределах гигантоклеточного ретикулярного ядра, испытывающих, по-видимому, различные влияния стресс-реализующих и стресс-лимитирующих систем растущего организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г. // Успехи физиолог. наук. – 2003, Т. 34, № 4. – С. 4–15.
2. Анохин К.В., Судаков К.В. // Успехи физиолог.

наук. – 2003. – Т. 135, № 2. – С. 124–131.

3. Семченко В.В., Степанов С.С., Чельшев Ю.А. Нейроглия: руководство по гистологии. В 2-х т. – СПб.: СпецЛит, 2001. – Т. 1. – С. 405–413.

4. Berridge M. J., Bootman M. D., Roderick H. L. // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2003. – Vol. 4, № 7. – P. 517–529.

5. Bonini P., Cicconi S., Cardinale A., et al. // J. Neurosci. Res. – 2004. – Vol. 75, № 1. – P. 83–95.

6. Boulanger L. M., Shatz C. J. // Nature Reviews Neuroscience. – 2004. – Vol. 5, № 7. – P. 521–531.

7. Gauriau C., Bernard J.F. // Exp. Physiol. – 2002. – Vol. 87, № 2. – P. 251–8.

8. Hertz L., Chen Y., Gibbs M.E., et al. // Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord. – 2004. – Vol. 3, № 3. P. – 239–267.

9. Krizanac-Benger L., Kapural M., Parkinson F., et al. // Brain Res. – 2003. – Vol. 977, № 2. – P. 239–346.

10. Nasser Hajibagheri M.A. // Humana Press, Totowa, New Jersey. – 1999. – 283 p.

11. Okere C.O., Waterhouse B.D. // Neuroreport. – 2004. – Vol. 9, № 15(2). – P. 255–258.

12. Ouyang Y.B., Giffard R.G. // Neurochem. Int. – 2004. – Vol. 45, № 2–3. – P. 371–9.

13. Penkowa M., Camats J., Hadberg H., et al. // J. Neurosci. Res. – 2003. – Vol. 73, № 4. – P. 481–496.

14. Sandhu J.K., Pandey S., Ribocco-Lutkiewicz M., et al. // J. Neurosci. Res. – 2003. – Vol. 72, № 6. – P. 691–703.

15. Takuma K., Baba A., Matsuda T. // Prog. Neurobiol. – 2004. – Vol. 72, № 2. – P. 111–127.

16. Xu F., Zhou T., Gibson T., et al. // J. Appl. Physiol. 2001. – Vol. 91, № 4. – P. 1713–1722.

Smirnov A.V., Khloponin P.A., Pisarev V.B., Pocheptzov A.Ya. Stress-induced ultrastructural changes in astrocytes of medullary gigantocellular nuclei of growing rats // Vestnik of Volgograd State Medical University. – 2005. – № 1. – P. 3–6.

Ultrastructural changes in the astrocytes of medullary gigantocellular reticular nuclei of growing rats under the effect of severe emotional-pain stress are studied. There are some differences in the manifestation of morphological reactions of neuroglial cell depending on its localization. Intracellular vacuolization, pericellular edema, but not safety mitochondrial ultrastructure evidence of prominent, and non-excessive changes are observed in growing astrocytes.

УДК 616.831.4-091

РАДИАЛЬНАЯ МОРФОМЕТРИЯ НЕЙРОНОВ В ОЦЕНКЕ КОНСТИТУЦИОНАЛЬНО ОБУСЛОВЛЕННЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРУКТУР ПРОМЕЖУТОЧНОГО МОЗГА

Д.Ю. Гуров, В.Б. Писарев, В.В. Новочадов, М.Б. Потанин
Кафедра патологической анатомии ВолГМУ,
отдел общей и экспериментальной патологии ВНЦ РАМН
и Администрации Волгоградской области

В настоящее время все чаще звучит мысль о том, что современная количественная морфология с введением в практику компьютерного анализа образов должна перейти от механической "оцифровки" численных показателей, описывающих структуры, на более сложные, интерпретирующие связи между элементами единой системы гистиона [1, 6, 10–12].

В нейроморфологии, особенно при тонких исследованиях конституционально обусловленных особенностей организации сложных нейронных ансамблей, подобные подходы выглядят весьма перспективными. Естественным выглядит вопрос: насколько неоднородными являются нейроны в сложных подкорковых структурах, и какие избрать подходы к количественной оценке такой неоднородности, не потеряв за многообразием количественных показателей структуры их функциональное выражение? Ранее нами описаны результаты, полученные при построении векторных градиентов (дорсовентрального, билатерального и краниокаудального) для различных свойств нейронов и их ближайшего окружения в ядрах гипоталамуса и стриопаллидарной системы [2–4, 7, 8].

Изучение применимости радиальной морфометрии перикарионов для оценки морфофункциональной организации нейронов в сложно организованных структурах на примере палеостриатума.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили серийные фронтальные срезы головного мозга крыс. Животные были предварительно выбраны путем тройного тестирования в две крайних (маргинальных) группы по отношению к алкогольной зависимости [5, 9]. Из 150 крыс отобрали 8 крыс с максимально выраженной алкогольной мотивацией (группа СА) и 8 животных отвергающих алкоголь (группа НА). Головной мозг животных выделяли немедленно после эвтаназии из черепной коробки, разделяли фронтальными разрезами три фрагмента, фиксировали в жидкости Буэна и заливали в парафин. С каждого блока получали по 400–600 серийных срезов толщиной 4–6 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, тионином по Нисслю, импрегнировали азотно-кислым серебром по Шабадашу в модификации Ландау. Цифровая съемка производилась на

ЦЕЛЬ РАБОТЫ