

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.831-008.1-092.9-02-07

О. В. Фиделина, О. С. Горбатюк, И. Б. Краснов, И. Г. Акмаев

РЕАКЦИЯ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА И ДОРСАЛЬНОГО ЯДРА ВАГУСА КРЫС НА ИЗМЕНЕНИЯ ГРАВИТАЦИОННОЙ СРЕДЫ

Институт экспериментальной эндокринологии ЭНЦ РАМН, Институт медико-биологических проблем ГНЦ РФ, Москва

Исследование функционального состояния структур мозга, участвующих в организации и реализации вегетативных реакций у млекопитающих при изменении гравитационной среды, представляется необходимым как для понимания механизмов регуляции гомеостатических функций организма, так и для разработки средств поддержания гомеостаза организма в условиях длительной смены гравитационной среды обитания. Существенная роль в регуляции вегетативных реакций, осуществляемых через автономную нервную систему, принадлежит, как известно, гипоталамусу. Реализация вегетативных реакций в значительной мере определяется дорсальным ядром вагуса, которое выполняет роль постсинаптического эфферентного выхода медуллярного центра вагуса. Снижение содержания инсулина в плазме крови, обнаруженное у человека во время космического полета [9], а также гипопункция β -клеток поджелудочной железы, выявленная в морфологическом исследовании у крыс, находившихся в условиях невесомости [2], позволяют предположить возникновение в невесомости перехода на иной (по сравнению с условиями силы тяжести Земли) уровень функционирования механизмов, регулирующих инсулинсинтезирующую и инсулинсекретирующую функции островкового аппарата поджелудочной железы. Согласно концепции И. Г. Акмаева [1], одним из путей регуляции функции β -клеток поджелудочной железы является нисходящий гипоталамический нервный путь, начинающийся в паравентрикулярном ядре (ПВЯ) гипоталамуса и оканчивающийся в продолговатом мозгу в дорсальном ядре вагуса (ДЯВ), холинергически преганглионарные нейроны которого оказывают стимулирующее влияние на секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы [11, 14, 15] и активируются с аллоксановым диабетом [6]. Сведения о состоянии структуры и функции нейронов в ПВЯ гипоталамуса и ДЯВ продолговатого мозга у млекопитающих, находившихся в условиях измененной гравитации, в литературе отсутствуют. Все вышесказанное определило наш интерес к реакции ДЯВ и ПВЯ гипоталамуса на изменения гравитационной среды.

Материалы и методы

Использовали крыс-самцов линии Вистар-СПФ массой 320—360 г полетной группы и группы виварного контроля. Животные, составившие полетную группу, находились 14 сут в невесомости в космическом полете на биоспутнике "Космос-2044" и 8—11 ч в условиях силы тяжести Земли пос-

ле приземления. Через 5—6 мин после декапитации животных из головного мозга вырезали левую половину гипоталамуса и продолговатого мозга у 5 крыс в каждой экспериментальной группе и замораживали во фреоне-12, охлажденном жидким азотом. В криостате при температуре $-18-20^{\circ}\text{C}$ изготавливали фронтальные срезы толщиной 12 мкм. Помещенные на предметные стекла и подсушенные срезы гипоталамуса и продолговатого мозга окрашивали растворами нитрата серебра и метиленового синего для выявления ядрышек и цитоплазмы нейронов. В каждом 5-м срезе продолговатого мозга на уровне ДЯВ гистохимическими методами [8] выявляли эффективность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ). Все срезы после проведения гистохимической реакции докрашивали квасцовым кармином для облегчения идентификации нейронов, в которых реакция не обнаруживалась или была очень низкой. Согласно классификации Е. И. Гоуфмана [5], ПВЯ гипоталамуса у крыс представлено 10 субъядрами. Для исследования были выбраны 3 субъядра (рис. 1): ЗС — заднее средноклеточное, нейроны которого имеют прямые эфферентные связи с ДЯВ, ММ — медиальное мелкоклеточное (содержит нейроны, синтезирующие кортиколиберин и тиролиберин), ЛК — латеральное крупноклеточное субъядро (содержит нейроны, синтезирующие вазопрессин) [10, 13, 16, 17]. Исследование нейронов ДЯВ проводили отдельно в роstralном, среднем и каудальном отделах. Площадь ядрышка в нейронах измеряли с помощью телевизионного анализатора изображения и выражали в мкм^2 . Уровень активности ферментов в нервных клетках оценивали визуально по интенсивности гистохимической реакции в световом микроскопе ($\times 500$). Подсчитывали количество нейронов с высокой, умеренной, низкой активностью ферментов и с отсутствием ферментативной активности. Полученные результаты выражали в процентах от общего числа нейронов в исследуемом отделе ДЯВ. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В ПВЯ гипоталамуса у крыс полетной группы по сравнению с крысами виварного контроля обнаружено достоверное уменьшение площади ядрышка в нервных клетках ММ, а также выяв-

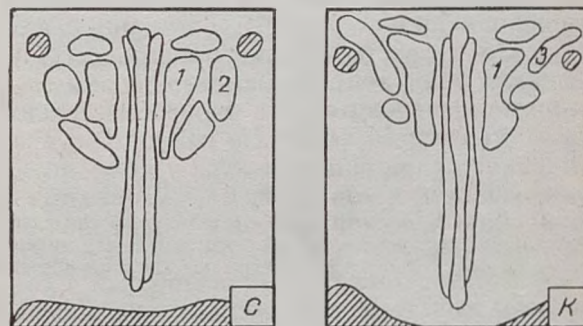


Рис. 1. Схема расположения субъядер в средней (С) и каудальной (К) протяженности ПВЯ гипоталамуса крысы.

1 — ММ, 2 — ЛК, 3 — ЗС.

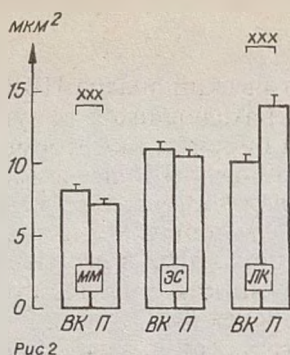


Рис. 2. Площадь ядрышек нейронов в ММ, ЗС и ЛК субъядрах ПВЯ гипоталамуса крыс.

Здесь и на рис. 3 и 4: ВК — виварный контроль; П — полетная группа. Три звездочки — $p < 0,001$, две — $p < 0,01$.

лена тенденция к уменьшению площади ядрышка в нейронах ЗС. Площадь ядрышка в нейронах ЛК у крыс полетной группы была увеличена по сравнению с крысами виварного контроля (рис. 2). В ДЯВ продолговатого мозга после космического полета по сравнению с группой виварного контроля площадь ядрышка нейронов оставалась без изменений в среднем и каудальном отделах и достоверно уменьшалась в ростральном отделе (рис. 3).

Поскольку объем или площадь ядрышка являются интегративными показателями интенсивности биосинтетических процессов в клетке [7], указывающими на уровень функциональной активности клетки в целом, обнаруженное нами в результате морфометрического исследования снижение площади ядрышка в нейронах рострального отдела ДЯВ у крыс, пребывавших 14 сут в космическом полете, свидетельствует о снижении биосинтетических процессов в нервных клетках, т. е. о гипофункции этих нейронов в невесомости. Морфометрическое исследование ядрышек нейронов ПВЯ гипоталамуса выявило неоднородную реакцию изученных субъядер на микрогравитацию, что является отражением их функциональных различий. Уменьшение площади ядрышек в нейронах ММ, которые участвуют в продукции гипоталамических тиролиберина и кортиколиберина, свидетельствует о гипофункции центральных механизмов, участвующих как в реализации стрессорной реакции животных, так и в регуляции функции соматотрофов и тиреотрофов гипофиза. Резкое увеличение у крыс полетной группы площади ядрышка в нейронах ЛК ПВЯ, очевидно, связано с резким возрастанием синтеза вазопрессина в условиях силы тяжести Земли в течение 8—11 ч после приземления — с процессом, аналогичным описанному ранее для нейронов супраоптического ядра гипоталамуса у крыс после космических полетов [3, 4, 12]. Тенденция к уменьшению площади ядрышек в нейронах ЗС ПВЯ гипоталамуса, дающих проекции в ДЯВ, свидетельствует о некоторой, возникшей в космическом полете, гипофункции этих клеток, сочетание которой с описанной выше гипофункцией нейронов рострального отдела ДЯВ свидетельствует об определенном снижении в невесомости функциональной активности системы

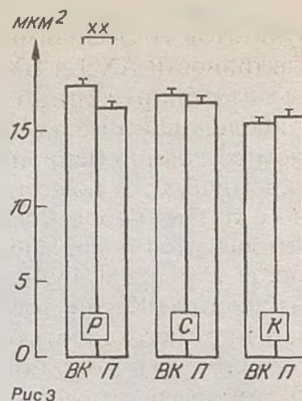


Рис. 3. Площадь ядрышек нейронов в ростральном (Р), среднем (С) и каудальном (К) отделах ДЯВ крыс.

нейрон заднего субъядра ПВЯ — нейрон рострального отдела ДЯВ.

Гистоэнзимологическое исследование ДЯВ показало, что у крыс полетной группы количество нервных клеток с высокой и умеренной активностью АХЭ достоверно выше в ростральном отделе и достоверно ниже в среднем отделе по сравнению с крысами группы виварного контроля (рис. 4, а). В каудальном отделе достоверных изменений числа нервных клеток с высокой и умеренной активностью АХЭ после полета не отмечено. У крыс после полета имело место достоверное увеличение числа нервных клеток, проявляющих высокую и умеренную активность БХЭ только в ростральном отделе ДЯВ. В других его отделах отличий от крыс группы виварного контроля не выявлено (рис. 4, б). Из вышеизложенного следует, что гистохимическое выявление АХЭ и БХЭ позволяет маркировать в ДЯВ разные популяции нейронов, реакция которых на изменения гравитационного поля Земли неодинакова. Помимо этого, исследование БХЭ в нервных клетках ДЯВ показало, что как у крыс виварного контроля, так и у животных полетной группы в ростральном отделе ядра популяция нейронов с высокой и умеренной активностью фермента превышает по численности популяцию клеток с высокой и умеренной активностью АХЭ.

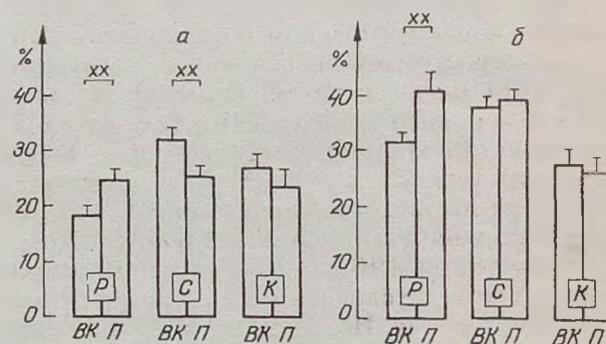


Рис. 4. Процентное содержание нервных клеток, проявляющих высокую и умеренную активность АХЭ (а) и БХЭ (б) в ростральном (Р), среднем (С) и каудальном (К) отделах ДЯВ крыс.

Анализ результатов гистоэнзимологического исследования активности АХЭ и БХЭ в ДЯВ выявил отличные от обнаруженных при морфометрическом исследовании закономерности в функциональном состоянии нейронов этого ядра у крыс после космического полета. По-видимому, это связано с тем, что уровень ферментативной активности является более лабильным, чем размер ядрышка, маркером функционального статуса нервных клеток. Кроме того, нейроны с высокой и умеренной активностью АХЭ и БХЭ составляют только часть популяции нервных клеток ДЯВ. В этой связи возрастание активности АХЭ в части нейронов рострального отдела ДЯВ у крыс полетной группы можно расценивать как свидетельство повышения их функциональной активности после полета, в условиях силы тяжести Земли. В то же время снижение активности АХЭ в нейронах среднего отдела ДЯВ у крыс полетной группы в сравнении с крысами виварного контроля свидетельствует об усилении торможения холинергических нейронов в среднем отделе после приземления. Полученные данные отражают избирательность усиления афферентного входа в различных отделах ДЯВ в условиях силы тяжести Земли после невесомости. В каудальном отделе ДЯВ не было выявлено существенных изменений ни в биосинтетической активности нервных клеток, ни в активности ацетилхолинергической популяции нейронов.

Таким образом, результаты морфологического анализа ПВЯ гипоталамуса мозга крыс, находившихся 14 сут в космическом полете на биоспутнике "Космос-2044" и 8—11 ч в гравитационном поле Земли после приземления, указывают на возникновение в невесомости тенденции к снижению влияния нейронов этого ядра на нейроны ДЯВ, на гипофункцию в невесомости нейронов, синтезирующих тиролиберин и кортиколиберин, а также резкое возрастание после приземления активности нейронов, синтезирующих вазопрессин. В ходе исследования получены свидетельства функциональной гетерогенности ДЯВ, в котором в отличие от ПВЯ до сих пор не обнаружено четкого топографического представительства контролируемых им функций. Результаты проведенной работы позволяют также считать, что использование стереологического подхода при морфологическом исследовании ДЯВ может способствовать прояснению его структурно-функциональной организации. Результаты морфологического анализа ДЯВ крыс, находившихся 14 сут в космическом полете и 8—11 ч в гравитационном поле Земли после приземления, свидетельствуют, с одной стороны, о развитии в невесомости гипофункции нейронов рострального отдела ДЯВ, с другой — об активации этих нейронов в условиях силы тяжести Земли после приземления. Исследованием установлено, что на изменения гравитационной среды в ДЯВ реагируют нейроны рострального и среднего отделов ядра, тогда как в каудальном отделе ДЯВ морфометрические и гистоэнзимологические показатели активности нейронов у крыс полетной и виварной групп были сходными.

Выводы

1. Морфологический анализ ПВЯ гипоталамуса мозга крыс, находившихся 14 сут в космическом полете на биоспутнике "Космос-2044" и 8—11 ч в гравитационном поле Земли после приземления, выявил достоверное уменьшение площади ядрышка в нервных клетках ММ и увеличение этого показателя в нервных клетках ЛК, а также тенденцию к уменьшению площади ядрышка в нейронах ЗС.

2. Морфологический анализ ДЯВ у тех же животных выявил достоверное уменьшение площади ядрышка в нейронах рострального отдела ДЯВ, увеличение числа нейронов с высокой и умеренной активностью АХЭ и БХЭ в ростральном отделе ДЯВ и снижение числа нейронов с высокой и умеренной активностью АХЭ в среднем отделе ДЯВ. В каудальном отделе ДЯВ достоверных изменений изученных показателей функциональной активности нейронов не обнаружено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И. Г. // Успехи соврем. биол. — 1987. — Т. 103. № 1. — С. 109—123.
2. Алексеев Е. И., Краснов И. Б. // Космическая биология и авиакосмическая медицина. 10-я конф.: Тезисы докладов. — М., 1994. — С. 159.
3. Газенко О. Г., Демин Н. Н., Панов А. И. и др. // Косм. биол. — 1979. — Т. 10, № 4. — С. 14—19.
4. Савина Е. А., Алексеев Е. И. // Влияние динамических факторов космического полета на организм животных. — М., 1979. — С. 79—82.
5. Akmayev I. G., Goufman E. I. // Biomed. Sci. — 1990. — Vol. 1. — P. 193—198.
6. Akmayev I. G., Rabkina A. E., Fidelina O. V. // Endocrinologie. — 1978. — Vol. 71, № 2. — P. 169—174.
7. Hadjiolov A. A. The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. — New York, 1985.
8. Karnovsky M. T., Roots I. // Histochem. Cytochem. — 1964. — Vol. 12, N 3. — P. 219—221.
9. Leach C. S., Rambault P. S. // Biomedical Results from Skylab. / Eds. R. S. Johnston, L. F. Dietlein. — Washington, 1977. — P. 204—216.
10. Lechan R. M., Jacobson I. M. D. // Endocrinology. — 1982. — Vol. 111, N 1. — P. 55—65.
11. Rohner-Jeanrenaud F., Ionescu E., Jeanrenaud B. // J. Auton. Nerv. Syst. — 1983. — Vol. 9, № 1. — P. 173—184.
12. Savina E. A., Pankova A. S., Alekseev E. I., Podymov V. K. // Aviat. Space Environ. Med. — 1976. — Vol. 47, № 8. — P. 853—855.
13. Sawchenko P. E., Swanson L. W. // J. Comp. Neurol. — 1982. — Vol. 205, № 3. — P. 260—272.
14. Sjaud P., Puech R., Assenmacher I., Alonso G. // Cell Tiss. Res. — 1990. — Vol. 259, № 3. — P. 535—542.
15. Smith P. H., Davis B. J. // J. Auton. Nerv. Syst. — 1983. — Vol. 9. — P. 53—66.
16. Swanson L. W., Sawchenko P. E., Wiegand S. J., Price J. L. // Brain Res. — 1980. — Vol. 198, № 1. — P. 190—195.
17. Swanson L. W., Sawchenko P. E., River J., Vale W. W. // Neuroendocrinology. — 1983. — Vol. 36, № 3. — P. 165—186.

Поступила 16.02.95

O. I. Fidelina, O. S. Gorbatyuk, I. B. Krasnov, I. G. Akmayev - REACTIONS OF THE PARAVENTRICULAR HYPOTHALAMIC NUCLEUS AND DORSAL MOTOR NUCLEUS OF VAGUS OF RATS TO CHANGES OF THE GRAVITATIONAL ENVIRONMENT

Summary. Morphologic study of the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) and of the dorsal nucleus of the vagus (DNV) in the brain of Wistar-SPF rats exposed to weightlessness during a 14-day mission on Cosmos-2044 biosatellite and to Earth gravitation during 8-11 h after landing showed a reliable reduction of the cross-sectional area of the nucleolus in the neurons of the

median parvicellular subnucleus, an increase of this parameter in the neurons of the lateral magnocellular subnucleus, and a trend to its decrease in the neurons of the posterior parvicellular subnucleus. As for the DNV, a reliable decrease in the cross-sectional area of the nucleolus in the neurons and an increased number of neurons

with high and moderate acetylcholinesterase (ACE) and butyrylcholinesterase activities of its rostral portion were revealed, as well as a reduction of the number of neurons with high and moderate ACE activity in the median portion of DNV. In the caudal portion of DNV no reliable changes in the studied parameters were detected.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.379-008.64-02:614.7-084-092.9

И. А. Волчегорский, В. Э. Цейликман, О. Л. Колесников, Ю. К. Костин, А. А. Колесникова,
Н. А. Скобелева, И. А. Вязовский, Р. И. Лифшиц

ГИПОГЛИКЕМИЗИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ СТРЕССОРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ САХАРНОГО ДИАБЕТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Кафедра биологической химии (зав. — член-корр. АЕН РФ Р. И. Лифшиц) Челябинского медицинского института

Острое воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды на организм теплокровных животных и человека вызывает стереотипную метаболическую реакцию, проявляющуюся гипергликемией, накоплением кетонных тел в крови, вторичной гиперлипидемией, усилением липолиза, гликогенолиза, глюконеогенеза и повышением потребления кислорода [5, 8]. Описанные сдвиги принято рассматривать как отражение резистентной (гиперкатаболической, калоригенной) стратегии адаптации или стрессорного диабета напряжения. Данный вариант адаптационной стратегии во многом реализуется через активацию β -адренорецепторов и усиление продукции глюкокортикоидов надпочечниками [5, 8], что сопровождается развитием инсулинорезистентности [1, 12]. Последнее обстоятельство наряду с характером вышеописанных метаболических сдвигов позволяет говорить о гомологичности стрессорного диабета напряжения и diabetes mellitus как нозологической формы. Вместе с тем известно, что 1-часовой иммобилизационный стресс, воспроизводимый после суточной депривации пищи, дает инсулинсенсбилизирующий эффект и приводит к развитию гипогликемии [1]. Установлено также, что хронический холодовой стресс вызывает стойкую гипогликемию и формирование резистентности к диабетогенному действию аллоксана [8, 11]. Очевидная противоречивость приведенных данных литературы не позволяет высказать однозначного суждения о роли стресса в патогенезе сахарного диабета. При этом профилактика diabetes mellitus II типа, развивающегося на фоне непрерывного нарастания проявлений стресса в онтогенезе (гиперадаптоза), рассматривается как один из путей предупреждения гериатрической патологии вообще [2].

Настоящая работа посвящена изучению гипогликемизирующего эффекта разнородных стрессовых воздействий и рассмотрению возможности использования этого эффекта для профилактики экспериментального сахарного диабета.

Материалы и методы

Использовали 303 белые беспородные крысы массой 180—220 г. Животных подвергали острому и хроническому стрессу. В качестве острого стрессорного воздействия применяли

1- и 9-часовую иммобилизацию. Для моделирования хронического стресса использовали 3-кратную иммобилизацию (по 60 мин в сутки) и 3-кратное подкожное введение нейтрофилокина (НК)¹ (абсолютная разовая доза $7 \cdot 10^{-7}$ мг). Указанное вещество является секреторным продуктом активированных нейтрофилов [3], обладает прооксидантной активностью и вызывает развитие стресс-синдрома [4].

В отдельных сериях эксперимента иммобилизационный стресс модулировали предварительной 24-часовой депривацией пищи и/или подкожным введением обзидана (пропранолола гидрохлорида, Arzneimittelwerk Dresden GmbH, Германия) в дозе 0,45 мг/кг.

В качестве диабетогенных воздействий применяли внутривенное введение аллоксана тригидрата ("Lachema", Чехословакия) в дозе 200 мг/кг [9] и подкожное введение пролонгированного глюкокортикоидного препарата каналога ("VEB Berlin-Chemie", Германия) в дозе 2 мг/кг. Индукторы экспериментального диабета вводили натощак через сутки после завершения хронического стресса. Проявления диабета исследовали через 3 сут после его моделирования с помощью аллоксана и через 4 сут после введения каналога.

Эффекты изучаемых воздействий оценивали по уровню гликемии, содержанию холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ), иммунореактивного инсулина (ИРИ) и кортизола в сыворотке крови, а также по изменению массы тела, выраженному в процентах от исходного уровня. Дополнительно определяли тяжесть аллоксаниндуцированного повреждения печени, о котором судили по активности аланин- и аспартат-аминотрансфераз (АЛТ и АСТ соответственно), активности γ -глутамилтранспептидазы (ГТП) и коэффициенту де Ритиса (АСТ/АЛТ). Инсулиночувствительность животных оценивали по латентности развития комы после внутривенного введения экзогенного гормона ("Инсулрап SPP", Плива, Югославия) в дозе 40 ЕД/кг [1].

В отдельной серии экспериментов изучали влияние хронического стресса на гипергликемизирующее и антилипидическое действие α_2 -адреномиметика клофелина (сернокислая соль отечественного производства), который вводили подкожно натощак за 30 мин до забора в дозе 0,009 мг/кг. Содержание глюкозы в сыворотке и плазме крови определяли глюкозооксидазным методом при помощи стандартных наборов реактивов ("Lachema", Чехословакия), концентрацию свободных жирных кислот (СЖК) в плазме крови регистрировали колориметрически [13], содержание гликогена в печени — нефелометрически [14], остальные биохимические параметры определяли на анализаторе фирмы KONE (Финляндия). Уровень ИРИ и кортизола исследовали радиоиммунологически с применением наборов РИО-ИНС-П¹²⁵I и РИО-КОРТ-I-³H соответственно. Результаты обработаны статистически, о достоверности различий судили по критерию Стьюдента, а также по трем критериям непара-

¹ Гомогенный препарат НК, выделенный совместно с Институтом иммунологии Минмедпрома СССР и Институтом биоорганической химии им. М. М. Шемякина (Москва), был любезно предоставлен профессорами И. И. Долгушиным и А. В. Зурочкой (кафедра микробиологии Челябинского медицинского института).