

УДК 616.6:616.8

М. Матвієнко, асп., А. Пустовалов, канд. біол. наук,
М. Дзержинський, д-р біол. наук

ВПЛИВ СТРЕСУ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ПАРАМЕТРИ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МІТОХОНДРІЙ АСТРОЦИТІВ І НЕЙРОЦИТІВ АРКУАТНОГО ТА ПРЕОПТИЧНОГО ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ СТАТЕВОГО ЦИКЛУ

Встановлено зростання морфометричних параметрів функціональної активності мітохондрій фіброзних і протоплазматичних астроцитів після впливу іммобілізаційного стресу у тварин як на стадії еструсу, так і дієструсу. Натомість у нейроцитів подібних змін не спостерігалось.

The increase of the morphometric parameters of mitochondria functional activity in fibrous and protoplasmic astrocytes is fixed after immobilization stress effect in animals both at the stage of estrus and diestrus. Instead neurocytes haven't shown such changes.

Вступ. Щільний структурний взаємозв'язок є основою для фізіологічних і патологічних взаємодій глії й нейронів. У результаті дослідження цих взаємодій була сформульована концепція про існування в ЦНС динамічних нейрон-гліальних сигнальних процесів. Можливість передачі сигналів від нейронів до глії відкриває багато варіантів для міжклітинних комунікацій. Враховуючи кількісне нейрон-гліальне клітинне співвідношення, можна припустити, що гліальна мережа може бути перспективним об'єктом при розробці методів та засобів терапії [1, 2, 4, 6].

Важливими й актуальними є дослідження нейрон-гліальних взаємодій в умовах стресу та їхньої ролі в регуляції розмноження тварин. Загальноовизнано, що стресові фактори здатні порушувати регулярність естрального циклу й негативно впливати на репродуктивну здатність організму [3, 5].

Метою роботи було дослідити зміни показників функціональної активності астроцитів і нейронів преоптичного та аркуатного ядер гіпоталамуса щурів, які відіграють провідну роль у регуляції репродуктивної функції, на різних стадіях статевих циклу та в умовах іммобілізаційного стресу.

Матеріали та методи. Дослідження структурно-функціональних змін нейронів та гліальних клітин гіпоталамуса та їхнього впливу на стан репродуктивної системи щурів в умовах іммобілізаційного стресу (90 хв.) проводили на самках щурів *Rattus norvegicus* трьохмісячного віку. Тварини були розділені на 2 серії (контрольна серія та серія стресованих тварин), кожна серія, у свою чергу, складалася із двох груп (особини на стадії еструсу та дієструсу). При проведенні експерименту тварин утримували в умовах одного виварю на стандартному харчовому раціоні. Наприкінці дослідження тварин усіх експериментальних груп піддали декапітації.

Для гістологічних досліджень видалені гіпоталамічні ділянки мозку щурів були оброблені глутаровим альдегідом на фосфатному буфері (рН 7,4), дофіксовані 1% розчином осмієвої кислоти та проведені через спирти зростаючої концентрації з подальшим зневодненням в ацетоні. Препарати були витримані в суміші епоксидних смол для заливки: Епон-812, аралдіт-М, DDSA, DMP-30. Зрізи для електронної мікроскопії (товщиною 30 нм) виготовляли на ультрамикротомі LKB Ultratom ME III TYP 888802. Контрастування зрізів проводили 1% розчином уранілацетату й цитрату свинцю. Ультраструктурне дослідження здійснювали під електронним мікроскопом TEM-125 С (АТ "Селмі", Суми) [7].

На електроннограмах, отриманих на збільшенні $\times 40000$, проводили підрахунок параметрів мітохондрій за допомогою програмного забезпечення Scion Image. Висновки про функціональну активність мітохондрій робили на підставі вивчення наступних морфометричних показників: S1 – площа перерізу мітохондрій (nm^2);

S2 – площа перерізу внутрішньої мітохондріальної камери (ВМК) (nm^2);

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою методів варіаційної статистики. Вірогідність різниці між морфометричними показниками контрольних та піддослідних груп щурів оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Достовірність вважали різницю між контрольними та піддослідними серіями при $p \leq 0,05$. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення SEWSS STATISTICA 7.0. for Windows.

Результати та їх обговорення При стресі в аркуатному ядрі (АЯ) та преоптичному ядрі (ПЯ) гіпоталамуса щурів як на стадії еструсу, так і на стадії дієструсу спостерігається достовірне збільшення площі перерізу ядер нейроцитів, порівняно із групами, що не підлягали дії стресу. Для фіброзних астроцитів характерне достовірне збільшення даного показника в АЯ й ПЯ як на стадії еструсу, так і на стадії дієструсу в групах, що підлягали дії стресу. Протоплазматичні астроцити продемонстрували зміну площі перерізу ядер наступним чином: збільшення в ПЯ на стадії еструсу при стресі та зменшення в АЯ й ПЯ на стадії дієструсу при стресі, порівняно з відповідними контрольними групами. Досліджуваний показник достовірно зростає в нейроцитах АЯ контрольної групи на стадії еструсу та ПЯ в стресованій групі на стадії еструсу в порівнянні з відповідною групою на стадії дієструсу. Площа перерізу ядер фіброзних астроцитів достовірно збільшується в ПЯ контрольної групи на стадії еструсу, а також в АЯ й ПЯ стресованої групи на стадії еструсу, порівняно з відповідною групою на стадії дієструсу. В АЯ контрольної групи на стадії еструсу фіброзні астроцити проявляють достовірне зменшення досліджуваного показника, у порівнянні із групою на стадії дієструсу. Нейроцити АЯ на стадії еструсу достовірно збільшують площу перерізу ядер порівняно з групою на стадії дієструсу. Даний показник у фіброзних астроцитів АЯ й ПЯ як у контрольній групі, так і в стресованій, зазнає достовірних змін на стадії еструсу, порівняно з дієструсом. А саме в АЯ контрольної групи та в ПЯ контрольної й стресованої груп фіброзні астроцити характеризуються зменшенням площі перерізу ядер на стадії еструсу, порівняно з дієструсом. У ПЯ контрольної групи на стадії еструсу у фіброзних астроцитах спостерігається збільшення досліджуваного показника, у порівнянні із клітинами на стадії дієструсу. Для протоплазматичних астроцитів характерне достовірне збільшення площі перерізу в АЯ й ПЯ як контрольної, так і стресованої груп на стадії еструсу, порівняно з відповідною групою на стадії дієструсу (Табл.1). Зміни площі перерізу мітохондрій клітин в залежності від стадії естрального циклу та при стресі. Нейроцити преоптичного ядра гіпоталамуса щурів як на стадії дієструсу ($13,9 \pm 1,8 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$), так і на стадії еструсу ($13,1 \pm 1,0 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$) проявили достовірне зменшення площі перері-

зу мітохондрій на тлі стресу, порівняно з відповідними контрольними групами ($10,8 \pm 1,8 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$; $10,1 \pm 0,8 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Нейроцити інших груп не показали достовірних змін за даним показником. Загалом мітохондрії нейроцитів ПЯ як на стадії дієструсу, так і на стадії еструсу достовірно зменшують площу перерізу на тлі стресу.

Достовірно зміну площі перерізу мітохондрій продемонстрували фіброзні астроцити аркуатного ядра на стадії дієструсу під дією стресу в бік зменшення даного параметру ($9,4 \pm 0,7 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), порівняно з контрольною групою ($12,6 \pm 1,0 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$).

Також достовірно змінилася площа перерізу мітохондрій у фіброзних астроцитів як аркуатного, так і преоптичного ядра на стадії еструсу в бік зростання даного параметра в стресованих групах, порівняно з відповідними контрольними. Так, ФА аркуатного ядра на стадії еструсу мають площу $30,6 \pm 10,8 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$ на тлі стресу, порівняно з контрольною групою ($8,7 \pm 1,0 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Площа перерізу мітохондрій ФА преоптичного ядра на стадії еструсу становить $13,7 \pm 1,4 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$, порівняно з контрольною групою ($8,8 \pm 2,0 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Також збільшення даного параметру спостерігається в мітохондріях ФА преоптичного ядра гіпоталамуса щурів на стадії дієструсу при стресі ($9,9 \pm 1,5 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), порівняно з контрольною групою ($6,3 \pm 0,6 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$).

Таким чином, зміни досліджуваного параметра у фіброзних астроцитів на стадії еструсу і на стадії дієструсу при стресі носять різноспрямований характер, а саме на тлі стресу площа перерізу мітохондрій у даних клітин достовірно зростає у тварин на стадії еструсу.

У протоплазматичних астроцитів площа перерізу мітохондрій достовірно збільшилася як в аркуатному ($15,3 \pm 1,6 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), так і в преоптичному ядрі ($13,8 \pm 2,1 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$) на стадії еструсу, а також у преоптичному ядрі на стадії дієструсу ($13,4 \pm 1,4 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$) при стресі, порівняно з відповідними контрольними групами ($8,8 \pm 0,8 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$; $10,6 \pm 1,1 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$; $8,3 \pm 1,1 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Так, у протоплазматичних астроцитів площа перерізу мітохондрій достовірно зростає при стресі незалежно від стадії естрального циклу.

При аналізі змін площі перерізу мітохондрій в залежності від стадії естрального циклу нейроцити як контрольних, так і стресованих груп не показали достовірних змін за даним параметром.

У фіброзних астроцитів аркуатного ядра контрольної групи достовірно зменшилася площа перерізу мітохондрій на стадії еструсу ($8,7 \pm 1,0 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), порівняно з контрольною групою на стадії дієструсу ($12,6 \pm 1,0 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Також даний параметр зазнає достовірного збільшення у мітохондріях ФА аркуатного ядра стресованої групи на стадії еструсу ($30,6 \pm 10,8 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), порівняно з відповідною групою на стадії дієструсу ($8,7 \pm 1,0 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Таким чином у ФА різноспрямовано змінюється площа перерізу мітохондрій на різних стадіях статевих циклу в умовах стресу – при стресі має тенденцію зростати на стадії еструсу, порівняно з дієструсом.

Площа перерізу мітохондрій протоплазматичних астроцитів достовірно знижується в аркуатному ядрі контрольної групи на стадії еструсу ($8,8 \pm 2,0 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), порівняно з клітинами на стадії дієструсу ($13,8 \pm 0,8 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$).

Загалом нейроцити ПЯ гіпоталамуса щурів як на стадії дієструсу, так і на стадії еструсу показали достовірне зменшення площі перерізу мітохондрій на тлі стресу, порівняно з контрольними групами. Фіброзні астроцити проявили зміни за досліджуваним параметром як на тлі стресу, так і в залежності від стадії статевих циклу. У мітохондріях протоплазматичних астроцитів спостерігаються достовірні зміни під впливом стресу

і на різних стадіях естрального циклу. Варто зазначити, в аркуатному ядрі гіпоталамуса в контрольних групах щурів на стадії еструсу як у фіброзних, так і у протоплазматичних астроцитів достовірно зменшується показник площі перерізу мітохондрій, порівняно з групами на стадії дієструсу (Табл. 1). Зміни площі перерізу внутрішньомітохондріальної камери клітин в залежності від стадії естрального циклу та при стресі. У нейроцитів преоптичного ядра гіпоталамуса щурів як на стадії дієструсу ($4,5 \pm 0,7 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), так і на стадії еструсу ($4,2 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$) при стресі зафіксовано достовірне зменшення площі перерізу ВМК, порівняно з відповідними контрольними групами ($6,6 \pm 1,1 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$; $6,2 \pm 0,6 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$).

Мітохондрії фіброзних астроцитів демонструють достовірні зміни досліджуваного параметру в бік зменшення останнього в аркуатному ядрі на стадії дієструсу при стресі ($4,4 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), порівняно з контрольною групою ($6,1 \pm 0,6 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Інші групи астроцитів проявили протилежні зміни даного показника на тлі стресу. Зокрема, в АЯ у ФА на стадії еструсу при стресі достовірно зростає площа перерізу ВМК ($13,3 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), порівняно з контрольною групою ($4,0 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Також досліджуваний параметр достовірно зростає в мітохондріях ФА преоптичного ядра гіпоталамуса тварин як на стадії дієструсу ($4,5 \pm 0,7 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), так і на стадії еструсу ($6,5 \pm 0,7 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$) при стресі, порівняно з відповідними контрольними групами ($2,8 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$; $4,0 \pm 1,2 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$).

Площа перерізу ВМК достовірно зростає у протоплазматичних астроцитів при стресі в преоптичному ядрі на стадії дієструсу ($6,0 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), на відміну від контрольної групи ($3,7 \pm 0,6 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Також достовірне зростання за даним параметром проявили протоплазматичні астроцити як аркуатного ($6,2 \pm 0,8 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), так і преоптичного ядра ($6,4 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$) на стадії еструсу стресованих груп щурів, порівняно з відповідними контрольними групами ($3,4 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$; $4,3 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Таким чином, протоплазматичні астроцити аркуатного і преоптичного ядра гіпоталамуса тварин як на стадії еструсу, так і на стадії дієструсу показали достовірне зростання площі перерізу ВМК ПА у стресованих групах, порівняно з контрольними.

При дослідженні змін площі перерізу ВМК нейроцитів як аркуатного, так і преоптичного ядра на різних стадіях статевих циклу не зафіксовано достовірних відмінностей за даним параметром.

В аркуатному ядрі як контрольної ($4,0 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), так і стресованої групи ($13,3 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$) фіброзні астроцити показали достовірні зміни площі перерізу ВМК клітин на стадії дієструсу, порівняно з еструсом. А саме мітохондрії ФА аркуатного ядра контрольної групи на стадії еструсу достовірно зменшують площу перерізу ($4,4 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), на відміну від групи на стадії дієструсу ($6,1 \pm 0,6 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$). Фіброзні астроцити аркуатного ядра на тлі стресу проявляють достовірні зміни за досліджуваним параметром у бік його збільшення на стадії еструсу, порівняно з дієструсом.

Таким чином, ФА аркуатного ядра гіпоталамуса проявляють різноспрямовані зміни площі перерізу мітохондрій на різних стадіях статевих циклу при стресі. А саме на тлі стресу даний показник зростає у тварин на стадії еструсу, порівняно з відповідною групою на стадії дієструсу.

У протоплазматичних астроцитів достовірно зменшився показник площі перерізу ВМК клітин аркуатного ядра контрольної групи щурів на стадії еструсу ($3,4 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$), на відміну від групи на стадії дієструсу ($6,4 \pm 0,5 \cdot 10^4 \text{ нм}^2$) (Табл. 1).

Таблиця 1. Площа перерізу мітохондрій та внутрішньої мітохондріальної камери, nm^2

Група тварин	Зона гіпоталамуса	Площа перерізу мітохондрій, 10^4 nm^2			Площа перерізу внутрішньої мітохондріальної камери, 10^4 nm^2		
		нейроцитів	фіброзних астроцитів	Протоплазматичних астроцитів	нейроцитів	фіброзних астроцитів	Протоплазматичних астроцитів
КД	АЯ	14,8±2,0	12,6±1,0	13,8±2,1	6,1±1,0	6,1±0,6	6,5±1,1
	ПЯ	13,9±1,8	6,3±0,6	8,3±1,1	6,6±1,1	2,8±0,3	3,7±0,6
КЕ	АЯ	12,4±1,7	8,7±1,0 [#]	8,8±0,8 [#]	5,5±0,6	4,0±0,5 [#]	3,4±0,3 [#]
	ПЯ	13,1±1,0	8,8±2,0	10,6±1,1	6,2±0,6	4,0±1,2	4,3±0,5
СД	АЯ	13,0±0,9	9,4±0,7*	13,1±1,9	6,3±0,5	4,4±0,3*	6,0±1,0
	ПЯ	10,8±1,8*	9,9±1,5*	13,4±1,4*	4,5±0,7*	4,5±0,7*	6,0±0,5*
СЕ	АЯ	13,5±1,5	30,6±10,8 ^{#*}	15,3±1,6*	6,5±1,0	13,3±0,5 ^{#*}	6,2±0,8*
	ПЯ	10,1±0,8*	13,7±1,4*	13,8±0,8*	4,2±0,5*	6,5±0,7*	6,4±0,5*

– $p \leq 0,05$, порівняно з відповідною групою, на стадії дієструсу;

* – $p \leq 0,05$, порівняно з відповідною групою, що не піддавалася стресу.

Загалом фіброзні та протоплазматичні астроцити аркуатного ядра гіпоталамуса тварин контрольної групи на стадії еструсу продемонстрували достовірне зниження показника площі перерізу ВМК мітохондрій на стадії еструсу, порівняно з групами на стадії дієструсу.

Досліджуючи особливості морфометричних показників мітохондрій у клітин на різних стадіях статевих циклу, нейроцити не показали достовірних змін як на стадії дієструсу, так і на стадії еструсу.

У фіброзних астроцитів досліджувані параметри зазнають збільшення у щурів на стадії еструсу при стресі, але у тварин контрольної групи ці ж показники зменшуються. Дані зміни особливо контрастно проявляються в АЯ гіпоталамуса.

Мітохондрії протоплазматичних астроцитів демонструють зменшення морфометричних показників на стадії еструсу в АЯ щурів переважно контрольної групи, але частково і при стресі. Такі зміни можна пояснити зниженням синтетичної активності мітохондрій астроцитів на стадії еструсу.

Астроцити проявили більше достовірних змін як на тлі стресу, так і в залежності від стадії естрального циклу. Можна припустити, що мітохондрії астроцитів більше залучені в стресових реакціях.

Висновки. Отримані результати проведених досліджень показали, що:

1. У щурів на стадії еструсу, порівняно з дієструсом, спостерігається зменшення морфометричних показників функціональної активності мітохондрій фіброзних і протоплазматичних астроцитів, на відміну від мітохондрій нейроцитів, у яких достовірних змін не виявлено. Астроцити зменшують функціональну активність на стадії еструсу, порівняно з дієструсом. Тим часом стадія естрального циклу не впливає на функціональну активність нейроцитів.

2. У фіброзних астроцитів аркуатного й преоптичного ядер гіпоталамуса щурів зростають морфометричні показники функціональної активності мітохондрій після

впливу іммобілізаційного стресу як у тварин на стадії еструсу, так і дієструсу. Незалежно від стадії естрального циклу фіброзні астроцити в досліджуваних гіпоталамічних ядрах продемонстрували зростання функціональної активності на тлі іммобілізаційного стресу.

3. Протоплазматичні астроцити тварин на стадіях еструсу і дієструсу демонструють зростання морфометричних параметрів мітохондрій під дією іммобілізаційного стресу як в аркуатному, так і в преоптичному ядрах гіпоталамуса. Аналогічно з фіброзними, протоплазматичні астроцити збільшують свою функціональну активність під впливом іммобілізаційного стресу.

4. В мітохондріях нейроцитів аркуатного й преоптичного ядер гіпоталамуса спостерігається зменшення параметрів функціональної активності на тлі іммобілізаційного стресу. Нейроцити, на відміну від астроцитів, при стресі знижують свою функціональну активність.

1. Зуева М.В. Неспецифическая терапия и роль хронобиологии в решении проблемы оптимальности терапевтических воздействий // Материалы Первого Российского Съезда по хронобиологии и хрономедицине с международным участием. – Владикавказ, 2008. – С. 25-26. 2. Caleb E. Neurons, glia and plasticity in normal brain aging // Neurobiology of Aging. – 2003. – Vol. 1, № 24. – P. 123-127. 3. Devall A.J., Lovick T.A. Differential activation of the periaqueductal gray by mild anxiogenic stress at different stages of the estrous cycle in female rats. // Neuropsychopharmacology. – 2010. – Vol. 5, № 35. – P. 1174-1185. 4. Fellin T. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity // Neurochemistry. – 2009. – Vol. 3, № 108. – P. 533-544. 5. Goldstein J.M., Jerram M., Abbs B., Whitfield-Gabrieli S., Makris N. Sex differences in stress response circuitry activation dependent on female hormonal cycle. // J. Neurosci. – 2010. – Vol. 2, № 30. – P. 431-438. 6. Milligan E.D., Watkins L.R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain // Nat. Rev. Neuroscience. – 2009. – Vol. 1, № 10. – P. 23-26. 7. Sato S., Aadachi A., Sasaki Y., Ghazizadeh M. Oolong tea extract as a substitute for uranyl acetate in staining of ultrathin section // J. Microscopy. – 2008. – Vol. 1, № 229. – P. 17-20.

Надійшла до редколегії 17.01.2011