

© Hancheva O.V.

UCC: 616.831.4-008-092.9-055.62:616.379-008.64-02:618.2

Hancheva O.V.

Zaporizhzhia state medical university, Department of Pathological Physiology (69035, Ukraine, Zaporizhzhia, Majakovskogo av., 26)

AGE FEATURES OF MORFO-HISTOCHEMICAL STATE OF NEURONS OF THE SUPRAOPTIC NUCLEUS OF THE HYPOTHALAMUS IN WISTAR MALE RATS

Summary. Under normal conditions the supraoptic nucleus (SON) is one of the central organs of the osmotic control, regulates the secretion of ACTH and cortisol by the adrenal glands. It acts synergistically with ACTH-releasing factor (CRF) increases the concentration of ACTH, while the effect of CRF on ACTH stimulation is mediated through the activation of adenylate cyclase mechanism and effect of vasopressin is mediated through the activation of protein kinase C. The objective was to examine age features of morpho-histochemical state of hypothalamic neurons of SON in Wistar rats. The study was hold on 40 Wistar male rats allocated into four age groups (2, 4, 6 and 18 months), 10 animals in each group. SON hypothalamus complex research included a study of the percentage of cell population; morpho-densitometric analysis of neurons; also the area of neurons, nuclei and nucleoli and RNA content were measured. During the study it was found that during animals' growth size of SON neurons and their functional activity undergo significant changes. It was observed an age-related decline of morphometric parameters of the neuron and its nucleus, with increased content of RNA to the period of puberty which corresponds to 6 months age of animals. The distribution of neurons by area in the supraoptic nucleus up to 6 months of age is characterized as relatively stable; there is predominance of large cells. At 6 month age the amount of medium-sized and small neurons equals to large neurons amount. In old 18-month animals structural rearrangement of SON develops: large neurons begin to dominate while small neurons practically disappear and medium-sized cells amount decreases to the level of 2 months old rats.

Key words: supraoptic nucleus, hypothalamus, Wistar rats, morphological and histochemical condition.

Introduction

Currently, the increasing interest of researchers is attracted to brain structures that ensure the central regulation of homeostasis. First of all, it refers to the hypothalamus and its neurosecretory paraventricular and supraoptic nuclei, (SON) [Акмаев, 1992; Акмаев, Гриневич, 2003; Geerling et al., 2010]. This is one of the major sites of synthesis of the "classical" neurohormones oxytocin and vasopressin [Абельсон, 1985; Громов, 1998; Marar, Amico, 1998].

SON is a group of closely packed magnocellular neurons in an amount of from 4000 to 7000, lying laterally to the optic chiasm [Swanson, Kupers, 1980; Silverman, Zimmerman, 1983]. SON neurons as well as magnocellular PVN neurons synthesize oxytocin and vasopressin as vasopressin-neurophysin glycopeptide- and oxytocin-neurophysin-glycopeptide [Japundzic-Zigon, 2013], besides oxytocin-synthesizing neurons are mainly concentrated in antero-posterior direction and vasopressin-synthesizing neurons are located posteroventrally in a ratio of 1:1 to 1:1.6 (respectively) [Navarro et al., 1994]. The cells in SON in adults are orientated in mediolateral direction in parallel to the optic tract [Leng et al., 1991].

SON is one of the central organs of the osmotic control under normal conditions, it regulate cardiovascular function, secretion of ACTG and cortisol by the adrenal glands [Bisschop et al., 2013]. Acting synergistically with ACTG-releasing factor (CRF), it increases the concentration of ACTH, the effect of CRF on ACTH stimulation is mediated through the activation of adenylate cyclase mechanism, and the effect of vasopressin is mediated through the activation of protein kinase C [Lopes-Azevedo et al., 2013].

The *objective* was to examine age features of morpho-histochemical state of hypothalamic neurons of SON in Wistar rats.

Materials and methods

The study was hold on 40 male Wistar rats that were

allocated into four age groups (2, 4, 6 and 18 months), 10 animals in each group. Animals were on a standard diet with free access to food and water. The rats of appropriate age were decapitated under anesthesia (sodium etamine 40 mg/kg, ip). Brain was immediately removed and placed into a Buen's retainer. It was dehydrated in alcohols in increasing concentration and then embedded into paraffin blocks. Serial sections were prepared on the rotary microtome MICROM HR-360 (Microm, Germany) in thickness of 5 microns for morphometric studies of hypothalamic neurons and in thickness of 14 microns for immunofluorescence studies. Later sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in descending concentrations of ethanol (100%, 96%, 70%), three times washed in distilled water or phosphate buffer pH 7.4 for 10 minutes.

5 micron brain sections were stained with chrome-gallocyanin alumesn by Einarsson to determine RNA in the structures of neurons. After staining, the slides were embedded in Canada balsam. Morphometric analysis was performed on a microscope Axioskop (Zeiss, Germany). Using the highly sensitive video camera COHU-4922 (COCHU Inc., USA) images of the neurons of SON of the hypothalamus were loaded into computer digital image analysis hardware and software system VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Germany). In each age group at least 400 neurons were studied. Only those neurons that have a nucleus and nucleolus in the slice were studied. As a result of the automatic analysis the area of the neuron, the nucleus and nucleolus (μm^2) and the RNA content in the cytoplasm, nucleus and nucleolus neuron in reference units of optical density ($\text{Uod}/\mu\text{m}^2$) were measured. Increase of the functional activity of neurons was estimated according to the area of cells, their cytoplasm, nuclei, and especially the nucleoli, as well as increase of RNA content and concentration in

Table 1. Age dynamics of morphometric characteristics of the state of neurons of SON of hypothalamus in male Wistar rats ($M \pm m$).

Age	Area, μm^2		
	neuron	nucleus	nucleolus
2 month	359,1 \pm 3,1	268,8 \pm 2,2	3,4 \pm 0,3
4 month	367,9 \pm 5,9	264,9 \pm 4,2	5,6 \pm 0,5*
6 month	300,9 \pm 2,5*	216,2 \pm 1,8*	10,8 \pm 0,44*
18 month	377,1 \pm 3,3*	276,9 \pm 2,2*	7,1 \pm 0,3*

Note: (*) - trusted differences parameters ($p_{St} < 0,05$) in relation to the previous age group of rats.

Table 2. Age dynamics of densitometric characteristics of the state of neurons of SON of the hypothalamus in male Wistar rats ($M \pm m$).

Age	RNA concentration, Uod / μm^2		
	cytoplasm	nucleus	nucleolus
2 month	0,1 \pm 0,0009	0,11 \pm 0,0006	0,25 \pm 0,002
4 month	0,09 \pm 0,002*	0,08 \pm 0,001*	0,24 \pm 0,004*
6 month	0,1 \pm 0,001*	0,12 \pm 0,001*	0,32 \pm 0,003*
18 month	0,1 \pm 0,001	0,1 \pm 0,0009*	0,33 \pm 0,002*

Note: (*) - trusted differences parameters ($p_{St} < 0,05$) in relation to the previous age group of rats.

Table 3. The age distribution of neurons of SON by area in Wistar male rats (%).

Age	% neurons with area before 220 μm^2	% neurons with area from 251 to 299 μm^2	% neurons with area beyond 300 μm^2
2 month	9	14	77
4 month	5	17	78
6 month	6	44	50
18 month	2	15	83

cell nuclei and nucleoli.

The experimental data were processed with the parametric Student's *t* statistics, considering significant differences in the two groups at $p_{St} < 0,05$. To assess the statistical relationship of the studied parameters it was used the correlation analysis of the EXCEL software package (Microsoft Corp., USA). The presence of the relationship between parameters considered, if the correlation coefficient was greater than 0,5.

Results. Discussion

Considering the age dynamics of morphofunctional state of neurons of SON in Wistar rats it was found that 2- and 4-month period was characterized by relative stability of morphometric parameters of cells and their nuclei on the background of significant 1.5-fold ($p_{St} < 0,05$) increase the area of nucleolus (Table 1) and reduce of heterogeneous RNA content in neuronal structures (in the cytoplasm by 11% ($p_{St} < 0,05$), in the nucleus by 37,5% ($p_{St} < 0,05$), in the nucleolus by 5% ($p_{St} < 0,05$) (Table 2). While in adult 6 month old rats compared with the previous period it was observed the decrease in the area of cell and its core for 22%

($p_{St} < 0,05$), with the area of the nucleolus increased by almost 2-fold ($p_{St} < 0,05$), and the RNA content in all these structures of the neuron was increased by 10% ($p_{St} < 0,05$), 34% ($p_{St} < 0,05$) and 25% ($p_{St} < 0,05$) in cytoplasm, nucleus and nucleolus, respectively. The 18-month old animals showed a significant increase in the area of cytoplasm and nucleus by 21% ($p_{St} < 0,05$) and 22% ($p_{St} < 0,05$), respectively, reduce of the area of the nucleolus by 34% and decrease in the RNA content in the nucleus by 20% ($p_{St} < 0,05$) (Table 1; Table 2).

After examining the age features of distribution of magnocellular neurons of SON by their area we have found that with the growth and development of animals it was observed the change of their relationship in the studied brain structure. While prepubertal and pubertal periods, corresponding to 2 and 4 months of age, were characterized by the predominance of large neurons with an area of beyond than 300 μm^2 , whereas in adults the number of large and medium-sized cells was almost equalized. By the old age it was a decrease in numbers of small and medium-sized neurons with a predominance of large (Table 3).

The revealed age-related changes of linear parameters of neurons and structural changes in supraoptic nucleus indicate the susceptibility of this structure to age-related changes with probable increase of remaining neurons functional activity and development of their partial hypertrophy. While the established reciprocal relationship of morphometric and densitometric characteristics of neurons is probably caused by compensatory mechanisms and is aimed at mobilization of the cell population neurons activity.

Conclusions and prospects for further research

1. During the growth of the animal both the size of neurons of SON and their functional activity undergo significant changes. There was observed an age-related (before puberty) decline of morphometric parameters of the neuron and the cell nucleus, with increased content of RNA.

2. Distribution of neurons in the SON by area up to 6 months of age is characterized by relative stability; there is predominance of large cells. There are further significant structural changes in the nucleus in aged, 18-month old animals: large neurons dominate more and almost all small neurons disappear.

3. In old animals the age-related changes of SON of the hypothalamus manifests with the increase of sizes of the cells and nuclei and structural rearrangements of the nucleus: predominance of large cells and disappearance of small ones which is accompanied with great increase of RNA content in nucleolus.

In further work on the study of the morphofunctional state of the supraoptic nucleus of the hypothalamus it is planned to hold a comparative analysis of morphological and densitometric characteristics of its neurons under various experimental pathologies such as hypertension, gestational diabetes, streptozotocin-induced diabetes.

References

- Абельсон Ю.О. Метаболическое действие нейрогипофизарных гормонов /Ю.О.Абельсон //Успехи физиол. наук.- 1985.- Т.16, №2.- С.33-60.
- Акмаев И.Г. Современные представления о взаимодействиях гипоталамической нейроэндокринной и вегетативной нервной систем в регуляции эндокринной и гомеостатической функций /И.Г.Акмаев //Морфология.- 1992.- Т.102, №3.- С.5-39.
- Акмаев И.Г. Нейро-иммуноэндокринология гипоталамуса /И.Г.Акмаев, В.В.Гриневич.- Медицина, 2003.- 168с.
- Громов Л.А. Нейропептиды /Л.А.Громов.- Киев: "Здоров'я", 1992.- 245с.
- Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the human hypothalamus / [Bisschop P.H., Dekker M.J., Osterthun W., et al.] //J. Neuroendocrinol.- 2013.- Vol.25, №5.- P.425-432.
- Japundzic-Zigon N. Vasopressin and Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem / J.C.Geerling, J.W.Shin, P.C.Chimenti [et al.] //J. Comp. Neurol.- 2010.- Vol.518, №9.- P.1460-1499.
- Navarro A. Hamster supraoptic nucleus - cytoarchitectural, morphometric, and 3-dimensional reconstruction / A.Navarro, J.Tolivia, M.Alvarezuria // J. Auton. Ner.- 1994.- Vol.240, №4.- P.572-578.
- Silverman A.J. Magnocellular neurosecretory system /A.J.Silverman, E.A.Zimmerman //Ann. Rev. Neurosci.- 1983.- Vol.6, №1.- P.357-380.
- Swanson L.W. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivision and the organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence doublelabeling methods /L.W.Swanson, H.G. Kupers / J. Comp. Neurol.- 1980.- Vol.194, №2.- P.555-570.
- Leng G. Identification of oxytocin cells in the rat supraoptic nucleus by their response to cholecystokinin injection /G.Leng, S.Wzy, R.E.J.Dyball //Neurosci. Lett.- 1991.- Vol.122, №2.- P.159-162.
- Lopes-Azevedo S. Mechanism of the cardiovascular responses caused by L-proline microinjected into the supraoptic nucleus of the hypothalamus in unanesthetized rats /S.Lopes-Azevedo, C.Busnardo, F.M.Corrêa //Amino Acids.- 2013.- Vol.45, №4.- P.797-810.
- Marar I.E. Vasopressin, oxytocin, corticotrophin-releasing factor, and sodium responses during fluoxetine administration in the rat /I.E.Marar, J.A.Amico //Endocrine.- 1998.- Vol.8, №1.- P.13-18.

Ганчева О.В.

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ МОРФО-ГІСТОХІМІЧНОГО СТАНУ НЕЙРОНІВ СУПРАОПТИЧНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА У ЩУРІВ-САМЦІВ ЛІНІЇ ВІСТАР

Резюме. У нормальних умовах СОЯ є одним із центральних органів осмотичного контролю, регулює секрецію кортикотропіну та кортизолу наднирниковими залозами, діючи синергічно з кортикотропін - рилізінг - фактором (КРФ) збільшує концентрацію АКТГ, причому, ефект КРФ на стимуляцію АКТГ опосередкований активацією аденилатциклазного механізму, а вазопресину - через активацію протеїнкінази С. Метою роботи було вивчити вікові аспекти морфо-гістохімічного стану нейронів СОЯ гіпоталамуса у щурів-самців лінії Вістар. Дослідження було проведено на 40 щурах-самцях лінії Вістар, розподілених на чотири вікові групи (2, 4, 6 і 18 місяців) по 10 тварин у кожній. Комплекс досліджень СОЯ гіпоталамуса містить у собі вивчення процентного складу клітинної популяції структури, морфо-денситометричний аналіз нейронів, із визначенням площі нейронів, ядра і ядерця, вмісту у них РНК. У ході проведеного дослідження було встановлено, що в процесі росту тварини розміри нейронів СОЯ та їхня функціональна активність перетерплюють істотні зміни. Спостерігається вікове зменшення морфометричних параметрів нейрона і ядра клітини до показників періоду статевого дозрівання, відповідного 6-місячному віку, на фоні збільшення вмісту в них РНК. Розподіл нейронів у супраоптичному ядрі по площі до 6-місячного віку характеризується відносною стабільністю, спостерігається переважання клітин великих розмірів, тоді як у віці 6 місяців сумарна кількість дрібних і середніх нейронів практично стає рівною кількості великих нейронів. У старих, 18-місячних тварин, відбуваються деякі структурні перебудови у СОЯ: починають переважати великі нейрони з практично повним зникненням дрібних і зменшенням кількості середніх до показників 2-місячних щурів.

Ключові слова: супраоптичне ядро, гіпоталамус, щури-самці лінії Вістар, морфо-гістохімічний стан.

Ганчева О.В.

ВОЗРАСТНЫЕ СОБЕННОСТИ МОРФО-ГИСТОХИМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙРОНОВ СУПРАОПТИЧЕСКОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА У КРЫС-САМЦОВ ЛИНИИ ВИСТАР

Резюме. В нормальных условиях СОЯ является одним из центральных органов осмотического контроля, регулирует секрецию кортикотропина и кортизола надпочечниками действуя синергично с кортикотропін - рилизинг - фактором (КРФ) увеличивает концентрацию АКТГ, причем, эффект КРФ на стимуляцию АКТГ опосредуется через активацию аденилатциклазного механизма, а вазопрессина ? через активацию протеинкиназы С. Целью работы было изучить возрастные аспекты морфо-гистохимического состояния нейронов СОЯ гипоталамуса у крыс линии Вистар. Исследование было проведено на 40 крысах-самцах линии Вистар, распределенных на четыре возрастные группы (2, 4, 6 и 18 месяцев) по 10 животных в каждой. Комплекс исследований СОЯ гипоталамуса включал в себя изучение процентного состава клеточной популяции структуры, морфо-денситометрический анализ нейронов, определяли площади нейронов, ядра и ядершка, содержание в них РНК. В ходе проведенного исследования было установлено, что в процессе роста животного размеры нейронов СОЯ и их функциональная активность претерпевают существенные изменения. Наблюдается возрастное уменьшение морфометрических параметров нейрона и ядра клетки к периоду полового созревания, соответствующего 6-месячному возрасту, на фоне увеличения содержания в них РНК. Распределение нейронов в супраоптическом ядре по площади до 6-месячного возраста характеризуется относительной стабильностью, наблюдается преобладание клеток больших размеров, тогда как в 6-месяцев суммарное количество мелких и средних нейронов практически становится равным количеству крупных. У старых, 18-ти месячных животных, происходят некоторые структурные перестройки в СОЯ: начинают преобладать крупные нейроны с практически полным исчезновением мелких и уменьшением количества средних до показателей 2-месячных крыс.

Ключевые слова: супраоптичне ядро, гіпоталамус, крыси лінії Вистар, морфо-гістохімічне состояние.

Стаття надійшла до редакції 07.05.2014 р.

Ганчева Ольга Викторовна (Hancheva Olga Viktorovna) - д. мед. н., професор кафедри патологічної фізіології Запорозького державного медичного університету; +38 0612 34-35-61; gancheva_olga@mail.ru

© Торяник І.І., Колесник В.В.*

УДК: 616.33-413-005.1-005.4-085

Торяник І.І., Колесник В.В.*

ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова НАМН України" (вул. Пушкінська, 14-16, м.Харків, 61057, Україна); *ДУ "Інститут нейрохірургії ім. А.П.Ромоданова НАМН України" (вул. Мануїльського 32, м.Київ, 04050, Україна)

МОРФОЛОГІЧНИЙ ДИЗАЙН ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Резюме. Стаття присвячена вивченню морфологічних особливостей розвитку експериментального емболічного ішемічного інсульту у щурів лінії Вистар. Авторами мікроскопічно, ультрамікроскопічно, із залученням резервів люмінесцентної мікроскопії доведена наявність характерних структурних ознак ішемічного інсульту (гліо-сполучнотканинного рубця, гліальних кист), що виникли внаслідок введення штучних емболів на функціонуючому кровоотці. Приведена морфометрична оцінка отриманих в експерименті змін. Підсумки досліджень узагальнюються панорамним ілюстративним матеріалом.

Ключові слова: експериментальний емболічний ішемічний інсульт, морфологічні зміни, світлооптичне, трансмісійне електронно-мікроскопічне дослідження.

Вступ

Ішемічний інсульт (інфаркт мозку) - гострий розлад мозкового кровообігу з ураженням речовини мозку, порушенням його функції внаслідок погіршення або припинення кровопостачання [Виленский, 2008]. На думку фахівців, інсульт залишається невідкладним станом з більш високою смертністю, ніж при онкологічних захворюваннях [Зозуля, Мошенська, 2009]. За експертними даними, у світі щорічно виявляється 15 млн випадків захворювань на інсульт, 5 млн із яких завершуються летально. Епідеміологічна ситуація з інсульту свідчить на користь того, що переважна більшість смертей, обумовлених згаданою патологією, відбувається у хворих, за віком молодших 70-75 років. Саме цей факт забезпечив інсульту, як причині летальності, другу за значенням позицію серед захворювань у світі [Kennedy, Lees, 2009]. Зазначена проблема, безсумнівно, потребує термінового розв'язання, успішною запорукою якого стає рання та якісна клініко-морфологічна діагностика інсульту. Застосування арсеналу високотехнологічних засобів діагностики надає конкретної відповіді стосовно етіотропної терапії інсульту, способів та строків її виконання [Цимбалюк та ін., 2010]. Врахування останніх факторів сприяє високій вірогідності здійснення ефективного впливу на ділянки ішемічних процесів у корі, відновлення охоплених деструкцією, некрозом зон мозку [Торяник, Колесник, 2010; Sahota, Savitz, 2011]. Саме ці питання, як свідчить проведений аналіз літератури, залишились поза увагою хірургів та нейротрансплантологів [Andriessen et al., 2010]. На сьогодні актуальною залишається проблема вибору найбільш дієвих способів введення клітинних суспензій в організм [Jablonska, Lukomska, 2011; Liman, Endres, 2013]. Фахівцями не досягнута однаковість у розв'язанні питань

доцільності та ефективності лікування ішемічного інсульту. Спеціалісти обговорюють переваги у виборі між його малоінвазивними та травматичними способами [Zhao, Rempe, 2010]. На теперішній час відсутній однозначний погляд, щодо стартових строків терапії. Недостатньо вивченими є найближчі та віддалені наслідки [Moran et al., 2012]. Відкритим залишається питання щодо механізмів лікувального впливу на інсульт. Зважаючи на все зазначене вище, дослідження морфологічних аспектів ішемічного емболічного інсульту в експерименті на самцях щурів лінії Вистар, є актуальним.

Мета дослідження: вивчити морфологічні особливості перебігу експериментального ішемічного емболічного інсульту у щурів лінії Вистар.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження послуговували самці щурів лінії Вистар (n=254), 3-х місячного віку, вагою 160-175 г, інтактні та з модельованим ішемічним інсультом, які утримувались у стандартних умовах віварію. Задля створення моделі ішемічного інсульту у експериментальних тварин застосовували емболію колатеральних гілок загальної сонної артерії правої півкулі головного мозку [Торяник, Колесник, 2010]. Щурів наркотизували кетаміном інтраперитоніально: із розрахунку 125 мг на кг ваги тварини. Емболізацію колатеральних судин проводили за рахунок завісу сульфату барію (ІІ). Спостереження проводили впродовж перших 1, 3, 7, 14, 17, 21 та 28 днів. Тварин виводили з експерименту шляхом надання надмірної дози наркозу та наступної декапітації.

Гістологічні препарати виготовляли за традиційною схемою. Шматочки головного мозку тварин фіксували