

UDK: 611.814.1 + 591.481.2+591.3

Zhurakivska O. Ya.

Age-Related Morphological Changes of Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus

Department of Human Anatomy, Operative Surgery and Topographic Anatomy SHEE "Ivano-Frankivsk National Medical University", Ivano-Frankivsk, Ukraine

Abstract. Ventromedial nucleus of the hypothalamus of 6-12 month old rats contains dark (young) - more functionally active and light - less functionally active neuroendocrine cells, which differ from each other by a number of ultrastructural features. Reorganization of cytoarchitectonics of ventromedial nucleus in the 24-month-old rats takes place together with the reduction of neurons and capillaries on the background of the increase of glial index and expresses the processes of satellitosis. Restructuring of the blood-brain barrier leads to hypoxia of neuroendocrine cells and dystrophic and destructive changes in the neuroendocrine cells. In the same neurons, these processes are irreversible, leading to the formation of "shadow cells".

Key words: ventromedial nucleus, ontogenesis, neuroendocrine cells.

Problem statement and analysis of the latest research.

The problem of formation and functioning of the endocrine glands in the postnatal period of ontogenesis is one of the most interesting chapters of the theory of an individual organisms' development. Particularly noteworthy is the knowledge of the morphological characteristics of the structure of the hypothalamic-hypophyseal system, which is a higher vegetative center and provides humoral regulation of various endocrine glands [3, 6, 9]. It is now confirmed that the age-related changes of the hypothalamus are among the main causes of aging of the organism [2], and the hypothalamus itself is a kind of pacemaker, or the clock of aging. With age, the sensitivity of certain hypothalamic structures to nerve impulses, hormones, neurotransmitters changes, causing the "mistakes" of information as about the state of internal environment of the organism as well as about the regulation of homeostasis [8]. At the same time the inconformity in the supply of «nervous» and «humoral» information leads to violations of adaptation processes in the body and is the main cause of long-term metabolic and functional responses in old age [8, 10].

Aim of the study: Taking into account the above mentioned the aim of our research is to establish the age-related structural changes of the ventromedial nucleus of the hypothalamus.

Materials and methods

Hypothalamus of 15 male Wistar line 6 -, 12 - and 24 months old rats served as the material for the investigation. Nissl-staining method and Gomori's aldehyde fuchsin with additional Heidenhain's azan staining were used for histological examination. For electron microscope study, material pieces were fixed in 2% osmium tetroxide solution, performed and contrasted under generally accepted methods. Ultra thin sections were made, and were studied under the electron TEM-125 K microscope, at an accelerating voltage of 75 kV, followed by photographing at magnifications of 1,200 to 20,000 times. Semi-fine sections, 1micron in thickness, were stained with 1% methylene blue solution. Histological preparations and Semi-fine sections were examined under the light MS 300 (THR) microscope and photographed using Digital camera for microscope DCM 900.

Morphometry was performed on these preparations using the software NIH USA "Image J" in the manual mode taking into account magnifications.

Structural changes at the certain stage of the study were analyzed in 50 fields of view identifying the number density of neurons (NDN), glia (NDG), capillaries (NDC) and glial index (GI) over an area of 0.01 mm² of VMN. The area of the profile fields of neurons, their nuclei and coefficient of form (C / F) of the last and nuclear-cytoplasmic index (NCI) were determined. Neurosecretory process was evaluated by indicators of the volumetric density of neurosecretory granules in neurons ($V_i = P_i / P_t$ [1]). Computer processing of data was performed using Statistical Package Stat.Soft.Inc; Tulsa, OK, USA; Statistica 6.

Results and discussion

In the 6 - and 12-month old rats ventromedial nucleus (VMN) occupies a significant portion of the hypothalamus tuberal area

and is bordered from below and medially by an arched nucleus (AN), medially - by periventricular, from the top - by dorsomedial nuclei and laterally - by lateral hypothalamic area. VMN contains major neuroendocrine cells (NC) in the center and minor - on the periphery. They are round in shape and are often in contact with each other. Nuclei of neurons are large, round; light ones contain dark nucleoli, which are mainly eccentrically located. Chromatin in the nucleus forms radial folds which look like "spokes" and connect nucleolus with the periphery of the nucleus. The cytoplasm contains brightly colored lumps of Nissl granules that either accumulate at the base of the axon or are uniformly distributed and isolated vacuoles. As compared to 6-month-old animals, the 12-month-old animals have the significant increase in the area of the profile fields of neurons, and values of nuclei profile field areas do not change, leading to the reduction of NCI (Chart 1).

Morphometric analysis of cytoarchitectonics of the examined nuclei in 12-month-old animals, as compared with 6-month-old ones, showed significant reduction in the number of neurons due to light-NC (Chart 1) and the GI level increases to 0.74 ± 0.01 (6 mos. - 0.69 ± 0.01 , $p < 0.01$). NDG and NDC are the same in 6 - and 12 - month-old animals.

The electron microscopic study showed a nucleus with diffusely scattered granules of chromatin in the center of NC VMN and electronically dense nucleolus placed eccentrically. Karyolemma has pores and forms slight invaginations. Well developed Golgi complex (GC) is located in light cells near the nucleus, and includes dictyosomes and vesicles. NG formation that has the diameter of (65.42 ± 2.24) nm is observed here. It consists of moderate electron-optical density matrix membrane and light narrow submembrane rim, the latter is not always evident. Separate NGs are found near neurolemma, axon hillock, and the significant amount is observed in the axoplasm. Cisterns of granular endoplasmic reticulum (GER) are solitary. A small number of ribosomes is located on their outer surface, most of which are located in intracisternal hyaloplasm in the form of polysomes. Mitochondria in NC are oval or rod-shaped and have moderate electron-optical density parallel to the oriented cristae. NC dendrites contain light cytoplasm, isolated mitochondria, and a small number of tubes. Spinules are distinguished on their top. NC axoplasm contains a small amount of neurofibrils and neurotubules, mitochondria, HPP and NG cisterns, synaptic vesicles.

Neuroplasm of dark NC has a high electron optical density. A significant portion of the peripheral zone is occupied by HPP, which is represented by oval and elongated cisterns with large number of ribosomes attached to their surface. The neuroplasm contains NG. NC axons in the studied nuclei form axo-somatic and axo-dendritic synapses, which have typical structures.

Volume density of NG in light NC was not significantly different in 6 - and 12-month-old rats and made up $(0.24 \pm 0.02)\%$ and $(0.22 \pm 0.02)\%$, but in the dark NC it was higher and made up $(0.87 \pm 0.03)\%$, $p < 0.01$, $(0.86 \pm 0.04)\%$, $p < 0.01$

Chart 1. Changes in morphometric parameters of NC VMN in postnatal ontogenesis (M \pm m, n=5)

| Animals' age | Nucleus area (nm ²) | C/F of nucleus | Cell area (nm ²) | NCI |
|--------------|---------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|
| 6-months | 79,48 \pm 1,46 | 0,74 \pm 0,01 | 165,88 \pm 4,44 | 0,94 \pm 0,06 |
| 12-months | 79,53 \pm 2,08 | 0,74 \pm 0,02 | 190,79 \pm 6,36* | 0,75 \pm 0,06* |
| 24-months | 64,13 \pm 1,72* | 0,81 \pm 0,01* | 154,91 \pm 4,61* | 0,69 \pm 0,03 |

Note: * - the difference between the indices of VMN compared with the indices of previous observation period, $p < 0.05$

accordingly.

NCs are surrounded by glial cells, which are dominated by protoplasmic and fibrous astrocytes. The former contain clear cytoplasm, large long processes which branch out, penetrating deeply between the structures of neuropil. Fibrous astrocytes contain polygonal-shape nuclei with marginally placed heterochromatin. Their high electron-optical density cytoplasm contains glycogen granules, HPP cisterns, small oval mitochondria and neurofilaments. Oligodendrocytes are rare and contain the moderate electron-optical density cytoplasm, dark round nuclei and mitochondria of irregular configurations. 1-2 branched out cell processes can sometimes be observed as transition of cytolema in the first spiral of the myelin sheath. Microglial cells in the VMN are observed infrequently, with high electron-optical density cytoplasm, dark nuclei, cell organelles which are not numerous.

Hematoencephalic barrier of the studied nuclei is well expressed, and is composed of endothelial cells, basal membrane and processes of protoplasmic astrocytes. The capillaries of somatic type have normal structures.

Peripheral chromatolysis and vacuolization of peripheral parts of the cytoplasm are observed in 24-month-old animals in most light NCs, whereby the edges of cells are often fuzzy, torn. Light-coloured neurons occur as a result of karyopyknosis, significant vacuolization and tigrolysis of neuropil. Such cells have barely noticeable outlines and form the so-called "shadow cells". The phenomena of satylytosis, which are characterized by clusters of glial cells around changed neurons and capillaries and phenomena of neuronophagia are observed. Morphometric analysis of studied NC nuclei showed that the area of the profile of the nuclear field decreases and their c/f increases in 24-month-old animals as compared to 12-month-old ones, (see Chart 1). NDN remains without changes, and the number of vacuolated forms and glial cells increases (see Chart 2). The GI, as compared to 12-month-old animals, increases up to 0.81 ± 0.01 ($P < 0.05$). The obtained morphological criteria of hypothalamus' aging, namely age-related loss of neurons and the severity of satylytosis processes are confirmed by the data of other researchers [4, 5].

Ultrastructure of neurons in the examined age-group of animals suggests the maintenance of high functional activity by these animals at this age. At the same time the initial degenerative processes are observed. In the light NC they are manifested by enlightenment of matrix and destruction of cristae of mitochondria, expansion of GER cisterns and decrease of ribosomes number on their surface, a decrease in the structural components of the CG, the appearance of small vacuoles, lysosomes and lipofuscin granules in their neuropil. The latter is the end-product of lipid peroxidation, which is considered permanent and universal feature of aging [7]. Such restructuring of intracellular organelles results in the decrease of NG volume density, as compared to 12-month-old animals to $(0.18 \pm 0.03)\%$ ($p < 0.05$). In the dark NCs shrinkage and condensation of nuclear chromatin occur. Autophagosomes, lipofuscin granules, multivesicular bodies appear in neuropil. NG bulk density, as compared to 12-month-old animals, decreases to $(0.56 \pm 0.05)\%$ ($p < 0.01$).

Perineuronal processes of astrocytes are often swollen. Oligodendrocytes satellites look usual, with a thin rim of cytoplasm around an oval nucleus, located in pairs. Capillaries of endothelial nuclei form processes which are often observed as binuclear endothelial cells. Vacuoles and polymorphic mitochondria are identified in the cytoplasm, basal membrane is somewhat thickened, double and triple location of satellite cells and swelling of pericapillary astrocytes processes are observed in pericapillary spaces.

Conclusions

1. In sexually mature animals VMN of the hypothalamus

Chart 2. Quantification of cytoarchitectonics of VMN in postnatal ontogenesis ($M \pm m$, $n=5$)

| Animals' age | NDN | NDN | | | | |
|--------------|------------|------------|----------|------------|------------|-----------|
| | | light | dark | vacuolated | NDG | NDC |
| 6-months | 16,9±0,31 | 16,6±0,41 | 0,6±0,22 | 2,1±0,33 | 11,7±0,26 | 1,9±0,11 |
| 12-months | 15,8±0,33* | 14,7±0,36* | 1,1±0,21 | 2,6±0,16 | 11,4±0,34 | 1,4±0,27 |
| 24-months | 15,2±0,22 | 14,1±0,37 | 1,1±0,18 | 3,7±0,33* | 12,5±0,28* | 1,1±0,29* |

Note: * - the difference between the indices of VMN compared with the indices of previous observation period, $p < 0.05$

contains dark (young) - more functionally active and light - less functionally active NCs, which differ from each other in a variety of ultrastructural features. These cells are surrounded by neuroglia, but in some places are in direct contact with each other. VMN blood supply takes place with the help of somatic type capillaries, the walls of which, together with the processes of astrocytes, form the hematoencephalic barrier.

2. Reorganization of VMN cytoarchitectonics occurs in 24-month-old animals with the reduction of NC and capillaries against growth of GI and expresses satylytosis processes. Restructuring of the blood-brain barrier leads to hypoxia of NC and dystrophic-destructive changes in them. In some neurons, these processes are irreversible, leading to the formation of "shadow cells".

Perspectives in this research area

Further studies of VMN structure at various diseases are perspective and will help to reveal the main pathogenetic mechanisms of age neurohumoral regulation violation of internal organs.

References

1. Avtandilov G.G. Medical morphometry: manual / Avtandilov G.G. - M.: Medicine, 1990. - 384.
2. Anisimov V.N. Epiphysis, biorhythms and the aging process / V.N. Anisimov // Advances of Physiological Sciences. - 2008. - T. 39, № 4. - P. 40-65..
3. Valov S.D. Influence of humoral factors of nonapeptidergetic hypothalamic centers on the histo- and organotypic potency of digestive glands of different genesis in cultural conditions by F.M. Lazarenko / S.D. Valov, A.A. Stadnikov // Morphology. -2005. -T. 128.-N 6. - P. 50-54.
4. Maslowski S.Y. The features of cell relations in the entorhinal area of the human brain / S.Y. Maslowski, N.E. Piryatinskaya // Medicine today and tomorrow. - 2008. - № 2. - P. 97-100.
5. Myhalskyi S.A. Change in the number of neurons and glial cells in the ventromedial nucleus and lateral hypothalamus of rats during aging / S. Myhalskyi, T. Yu. Kvititskaya-Ryzhova // Biological mechanisms of aging: III Intern. symposium, May 1998: Abstracts. - Kharkov, 1998. - P. 53.
6. Becquet D. Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment / D. Becquet, C. Girardet, F. Guillaumond // Glia. - 2008. - V. 56, № 3. - P. 294-305.
7. Effects of calorie restricted diet on structural characteristics of adult and old rats / Kvititskaya-Ryzhova T.Yu., Sturina A.S., Mikhalsky S.A. [et al.] // Advances in Gerontology. - 2000. - T. 5. - P. 63.
8. Everitt A.V. Neuroendocrine function and aging / A.V. Everitt // Adv. Exp. Med. Biol. - 1980. - V.129. - P. 233-242.
9. Hypothalamic control of mitogen-induced proliferative responses and luteinizing hormone-releasing hormone levels in thymus and peripheral blood of rat fetuses / L.A. Zakharova et al. // Neuroimmunomodulation. - 2005. - №12(2). - P.85-91.
10. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats / S. G. Bouret, J. N. Gorski, C. M. Patterson [et al.] // Cell Metab. 2008. - Vol. 7, № 2. - P. 179-185.

Жураківська О. Я.

Вікові морфологічні зміни вентромедіального ядра гіпоталамуса

Кафедра анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», м. Івано-Франківськ, Україна

Резюме. У статевозрілих 6-12 місячних шурів вентромедіальне ядро гіпоталамуса містить темні (молоді) – більш функціонально

активні і світлі – менш функціонально активні нейроендокринні клітини, які відрізняються багатьма ультраструктурними ознаками. У 24-місячних шурів відбувається перебудова цитоархітекtonіки вентромедіального ядра в бік зменшення нейронів і капілярів на фоні зростання гліального індексу та виражених процесів сателітозу. Перебудова гемаоенцефалічного бар'єру призводить до гіпоксії нейроендокринних клітин та дистрофічно-

деструктивних змін у них. В окремих нейронах ці процеси носять незворотній характер, що призводить до утворення «клітин-тіней».

Ключові слова: *вентромедіальне ядро, онтогенез, нейроендокринні клітини.*

Надійшла 02.06.2014 року.

УДК 616.12-009.72:577.115.3:615.273.53

Завальська Т.В.

Вплив антиагрегантної терапії на жирнокислотний спектр фосфоліпідів мембран тромбоцитів у хворих на нестабільну стенокардію

Кафедра внутрішньої медицини № 4 (зав. каф. – проф. В.Г. Лизогуб)
Національного медичного університету імені О.О. Богомольця

Резюме. **Актуальність.** Вивчення патогенезу, лікування та профілактики нестабільної стенокардії (НС) перебуває в центрі уваги кардіологів, що пов'язано з великою частотою виникнення ускладнень у хворих з цією патологією. **Мета дослідження:** вивчення жирнокислотного спектру (ЖКС) фосфоліпідів (ФЛ) мембран тромбоцитів у хворих на НС.

Результати дослідження. Обстежено 51 хворого на НС. За допомогою газохроматографічного аналізу визначався ЖКС ФЛ мембран тромбоцитів до та після лікування. Базисна терапія 29 пацієнтів включала клопідогрель і аспірин. За наявності протипоказів до прийому аспірину 22 пацієнта отримували лікування, яке включало клопідогрель. ЖКС ФЛ мембран тромбоцитів у хворих на НС після базисного лікування, яке включало клопідогрель, достовірно змінився за більшістю жирних кислот (ЖК), порівняно з показниками до лікування, але вміст тільки однієї, олеїнової ЖК, нормалізувався. Необхідно відзначити, що після лікування, яке включало поєднання клопідогрелю з аспірином у ФЛ мембран тромбоцитів хворих на НС нормалізується відносний вміст пальмітинової, олеїнової, лінолевої і арахідонової ЖК. За рахунок нормалізації відносного вмісту пальмітинової і стеаринової ЖК нормалізувався відносний вміст суми насичених жирних (НЖК), а за рахунок нормалізації відносного вмісту лінолевої і арахідонової ЖК нормалізувався відносний вміст суми ненасичених жирних кислот (ННЖК).

Висновки. 1. Застосування комбінації аспірину з клопідогрелем у лікуванні хворих на НС приводить до позитивної динаміки і нормалізації переважної кількості ЖК ФЛ мембран тромбоцитів.

2. Поєднання антиагрегантної терапії з різними механізмами дії у хворих на НС ефективно впливає на зворотність патофізіологічних процесів і на позитивний розвиток захворювання в цілому.

Ключові слова: *нестабільна стенокардія, жирні кислоти, тромбоцити, клопідогрель, аспірин.*

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Вивчення патогенезу, лікування та профілактики НС, яка входить до симптомокомплексу «Гострий коронарний синдром», постійно перебуває в центрі уваги кардіологів. Це пов'язано з великою частотою виникнення ускладнень у цієї категорії хворих. [2, 9]. Розвиток інфаркту міокарда в осіб з НС, як правило, є результатом атеротромбозу та свідченням недостатньої ефективності антитромбоцитарної терапії [6,7]. Незважаючи на існування певних схем лікування, актуальним залишається пошук ефективніших варіантів терапії НС. З огляду на відкриття численних альтернативних шляхів активації тромбоцитів значну цікавість дослідники виявляють до препаратів групи антиагрегантів з різними механізмами дії [1, 3, 4, 5, 8], комбінації цих препаратів при гострому коронарному синдромі. Проте остаточно не вивчено вплив антиагрегантів на всі патогенетичні ланки дестабілізації коронарного кровообігу, зокрема на обмін вищих

жирних кислот (ЖК).

Мета дослідження: вивчення жирнокислотного спектру (ЖКС) фосфоліпідів (ФЛ) мембран тромбоцитів у хворих на НС.

Матеріал і методи дослідження

Обстежено 51 хворого на НС віком від 55 до 69 років (середній вік склав $61,6 \pm 7,5$ роки) і 18 клінічно здорових людей (контрольна група (КГ)). Діагноз НС встановлювали на підставі загальноприйнятих критеріїв, що запропоновані експертами ВООЗ [2]. В обстеження не включали хворих із серцевою недостатністю ІБ та ІІІ стадії, миготливою аритмією, супутніми захворюваннями в стадії декомпенсації, онкологічними захворюваннями, захворюваннями опорно-рухового апарату.

Як об'єкт дослідження використовували тромбоцити сироватки крові хворих. Із відібраних тромбоцитів екстрагували ліпіди за методом Фолча (1957). Газохроматографічний аналіз ЖК ФЛ мембран тромбоцитів здійснювали за допомогою газового хроматографа «Цвет – 500» з іонізаційним детектором в ізометричному режимі. Ідентифікували такі ЖК: С14:0 – міристинова кислота, С15:0 – пентадеканова кислота, С16:0 – пальмітинова кислота, С17:0 – маргарінова кислота, С18:0 – стеаринова кислота, С18:1 – олеїнова кислота, С18:2 – лінолева кислота, С18:3 – ліноленова кислота, С20:4 – арахідонова кислота. З них міристинова (С14:0), пентадеканова (С15:0), маргарінова (С17:0), пальмітинова (С16:0), стеаринова (С18:0) – насичені жирні кислоти (НЖК), олеїнова (С18:1) – ненасичена жирна кислота (ННЖК), лінолева С18:2, ліноленова (С18:3), арахідонова (С20:4) – поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК).

Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження показали, що в ЖКС ФЛ мембран тромбоцитів хворих на НС, порівняно з КГ, виявлено достовірне зменшення відносного вмісту суми НЖК на 32,9% ($p < 0,01$). На відміну від здорових осіб у ФЛ мембран тромбоцитів хворих з'являються міристинова (С14:0), пентадеканова (С15:0) і маргарінова (С17:0) НЖК; достовірно зменшується відносний вміст пальмітинової (С16:0) ЖК на 52,1% ($p < 0,01$), стеаринової (С18:0) – на 77,3% ($p < 0,01$). Результати досліджень наведено в таблиці 1.

У хворих на НС у ЖКС ФЛ мембран тромбоцитів з'являється ліноленова (С18:3) ЖК, яка відсутня у здорових осіб. Порівняно з КГ у хворих на НС у ФЛ мембран тромбоцитів достовірно знижується відносний вміст олеїнової (С18:1) ННЖК на 34,7% ($p < 0,01$), достовірно підвищується відносний вміст лінолевої (С18:2) ПНЖК на 63,9% ($p < 0,01$), арахідонової (С20:4) ПНЖК – на 14,6% ($p < 0,05$), відносний вміст суми ННЖК – на 26,8% ($p < 0,01$), відносний вміст суми ПНЖК – на 37,3% ($p < 0,01$).