

УДК 611.814.2—018.82—053.9—086:615.217.22:621.385.833

Н. А. Межиборская

### ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ НЕЙРОНОВ МАМИЛЛЯРНЫХ ЯДЕР СТАРЫХ ЖИВОТНЫХ НА ВВЕДЕНИЕ АДРЕНАЛИНА

Возрастные морфологические [4, 8, 10, 15, 16] и ультраструктурные [5, 13] особенности, неравномерные нарушения регуляторной функции ядер гипоталамуса и большое значение этих сдвигов в развёртывании процесса старения целостного организма [1—3, 7] хорошо известны. Четко показано, что выраженность функциональных нарушений отдельных ядер гипоталамуса при старении не всегда соответствует глубине морфологических изменений, регистрируемых у интактных старых животных. При этом сведения о структурных проявлениях реакции нейронов, гипоталамуса старых животных на различные экспериментальные воздействия, позволяющие выявить и оценить резервные возможности этих образований в поздние возрастные периоды, недостаточны [13].

Проведенные нами исследования, продемонстрировавшие нарастание дистрофических процессов и, в частности, изменения свойств белковых молекул нейронов заднего отдела гипоталамуса (особенно, мамиллярных ядер) интактных старых крыс позволили нам сделать предположение о сужении диапазона приспособительных возможностей изученных образований при старении [4, 5].

В задачу настоящего исследования входила морфофункциональная оценка состояния нейронов мамиллярных ядер старых животных в условиях экспериментальной нагрузки.

#### Методика исследований

Объектом исследования служил мозг 90 самцов белых крыс двух возрастных групп: взрослых (6—8 мес) и старых (28—30 мес).

В качестве центрального адреномиметика применяли адреналин, хорошо проникающий через гемато-энцефалический барьер именно в области заднего отдела гипоталамуса [18]. Адреналин вводили внутримышечно из расчета 50 мкг на 100 г массы животного. Доказано, что введенный таким способом адреналин вызывает выраженные изменения структуры и энзимохимического состава нейронов некоторых вегетативных ядер продолговатого мозга и сердечных ганглиев [6]. Контрольным животным вводили внутримышечно физиологический раствор из расчета 1 мл на 100 г массы. Крыс забивали одномоментной декапитацией через 30 мин, 2 ч и 6 ч после введения препарата.

Функциональное состояние нейронов оценивали на основании сопоставления результатов цитохимического исследования (цитоспектрофотометрия РНК [17] и тиогрупп [4, 11]; выявление моноаминов — МА [12] и моноаминоксидазы — МА [14] на срезах замороженной ткани) и данных электронной микроскопии. Ультратонкие срезы изучали в микроскопе JEM-100В при ускоряющем напряжении 60 кВ.

#### Результаты исследований и их обсуждение

Через 30 мин после введения адреналина у взрослых животных концентрация SH-групп в нейронах изученной области заметно нарастает. Так, в крупных нервных клетках мамиллярного латерального ядра (ML) концентрация SH-групп выше на 40 % в цитоплазме и на 13 % в ядре (по сравнению с интактными и контрольными животными того же возраста). При этом концентрация —S—S связей несколько снижается. Повышается незначительно концентрация цитоплазматической РНК (рис. 1). Усиливается интенсивность окрашивания зерен:

формаза, особен  
тенсивность свече  
диальной части ма  
На ультрастр  
числа рибосом — F  
ской сети — ЦС).  
себя внимание усл  
в большинстве ней  
ставлен комплекс  
тельно расположе  
численных гладки  
разбросанными по  
плазме (рис. 2, а)  
рии (М) с хороше  
ными, тесно уп  
кристами и умерен

Рис. 1. Изменение конц  
(косая штриховка) SH  
крестиком) и S—S (т  
цитоплазме нейронов  
латерального ядра кры  
возраста после введени  
По вертикали — оптическая  
горизонтالي — время после  
ва — взрослые, справа — ста

матриком. Часты  
включения (Л). Яд  
за глубоких инваги  
го увеличение площ  
ловии сохранения с  
тивной клетке) сп  
между ними. Ядры

Таким образом,  
через 30 мин после  
активности нейрон  
таты цитохимически  
групп, интенсивност  
ные, полученные в  
чение числа активн  
ложнение контуров  
ядерной мембране р

У старых крыс  
мечено усиление фу  
ядер, однако по сра  
раста реактивные и  
центрация SH-групп  
17 %, т. е. прирост  
вотных в тот же сро  
падает. В ядре ста  
тиогрупп не обнару  
стимуляцию отмечен  
вотных [9]. Интенс  
бая. Статистически д  
нению с исходным у  
обнаружено (рис. 1).

Количество зерен  
лах нервных клеток

формаза, особенно в волокнах, окружающих нейроны; нарастает интенсивность свечения МА в терминалях на телах нейтронов ML и медиальной части мамиллярного медиального ядра (ММm).

На ультраструктурном уровне отмечается некоторое нарастание числа рибосом — Р (как свободных, так и на цистернах цитоплазматической сети — ЦС). Канальцы ЦС несколько расширены. Обращает на себя внимание усложнение структур аппарата Гольджи (АГ), который в большинстве нейронов представлен комплексами параллельно расположенных многочисленных гладких мембран, разбросанными по всей цитоплазме (рис. 2, а). Митохондрии (М) с хорошо выраженными, тесно упакованными кристами и умеренно плотным

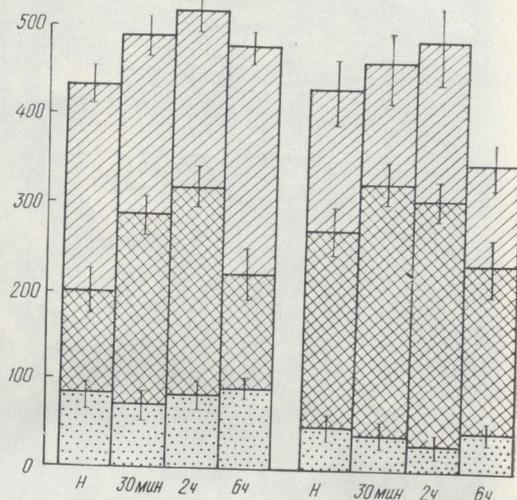


Рис. 1. Изменение концентрации РНК (косая штриховка) SH (штриховка крестиком) и S—S (точки групп в цитоплазме нейронов мамиллярного латерального ядра крыс различного возраста после введения адреналина. По вертикали — оптическая плотность, по горизонтали — время после введения; слева — взрослые, справа — старые животные.

матриком. Часты первичные лизосомы (ПЛ). Встречаются липидные включения (Л). Ядра клеток приобретают неправильные очертания из-за глубоких инвагинаций ядерной мембраны. Достигаемое за счет этого увеличение площади соприкосновения ядра и цитоплазмы (при условии сохранения структуры активно функционирующего ядра в активной клетке) способствует интенсификации обменных процессов между ними. Ядрышки крупные, часто эксцентрично расположенные.

Таким образом, у взрослых животных под влиянием адреналина, через 30 мин после его введения наступает усиление функциональной активности нейронов мамиллярных тел, о чем свидетельствуют: результаты цитохимических исследований (нарастание концентрации SH-групп, интенсивности реакции на MAO и свечения МА), а также данные, полученные в электронном микроскопе (расширение ЦС, увеличение числа активных М, гиперплазия АГ, нарастание числа ПЛ; усложнение контуров ядер и наличие крупного ядрышка, его близкое к ядерной мембране расположение).

У старых крыс через 30 мин после введения адреналина, также отмечено усиление функциональной активности нейронов мамиллярных ядер, однако по сравнению с интактными животными того же возраста реактивные изменения в них менее демонстративны. Так, концентрация SH-групп в цитоплазме крупных нейронов ML нарастает на 17 %, т. е. прирост ее более чем вдвое меньший, чем у взрослых животных в тот же срок. Концентрация —S—S связей при этом несколько падает. В ядре статистически достоверных изменений концентрации тиогрупп не обнаруживается. Меньший прирост SH-групп в ответ на стимуляцию отмечен и в нейронах другой локализации у старых животных [9]. Интенсивность реакции на РНК в части клеток очень слабая. Статистически достоверных сдвигов в ее концентрации (по сравнению с исходным уровнем у интактных крыс того же возраста) не обнаружено (рис. 1).

Количество зерен формаза (активность MAO) нарастает в телах нервных клеток и по ходу волокон. Усиливается свечение МА тер-

миналей на телах нервных клеток. Однако и эти изменения у старых животных менее демонстративны.

К аналогичным результатам привели и наблюдения в электронном микроскопе — у старых крыс признаки повышения функциональной

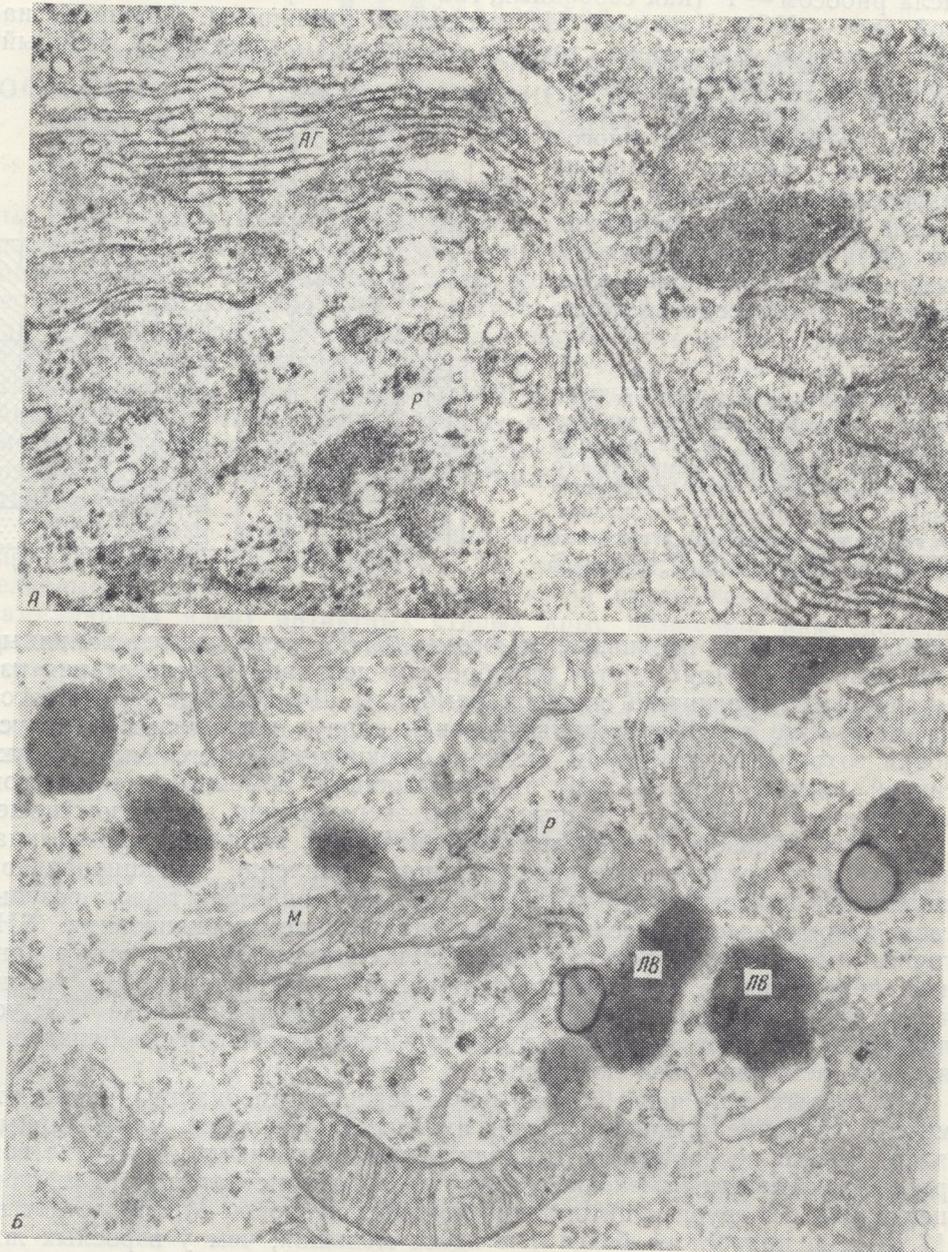


Рис. 2. Нейроны мамиллярного латерального ядра через 30 мин после введения адреналина.

А — взрослая крыса; Б — старая крыса, АГ — комплекс Гольджи; ЛВ — липофуциновые включения; М — митохондрии; Р — рибосомы.  $\times 50\,000$ .

активности нервных клеток (в сравнении с возрастной нормой) менее выражены, поскольку нейроны интактных старых животных характеризуются признаками напряжения клетки — усложнение контуров ядер, краевое расположение крупных ядрышек; гиперплазия АГ за счет пластинчатого его компонента, гипертрофия отдельных М [5]. Обращает

на себя внимание нейронах старых крыс.

Менее выражены гистохимические и ультраструктурные изменения в нейронах старых крыс введением адреналина. Они свидетельствуют о возможности снижения резервных возможностей нервных клеток.

Через 2 ч после введения адреналина у взрослых крыс выявляются реактивные изменения нейронов изучаемой области: концентрация плазматической РНФ на 15%, SH-групп в плазме — на 51%, а в сыворотке — на 15% по сравнению с исходным уровнем. В этом отношении концентрация свободных SH-групп достоверно отличается от уровня у старых животных (рис. 3). Наличие липофуциновых включений, свидетельствующих о высокой активности ферментов, с чем, по всей вероятности, связано возвращение к исходному уровню МА.

На электронном уровне в телах нейронов отмечено обилие мелких мембранных кристаллов и ультраструктурно плотным матриксом свободных Р, цистерн, цистерной ЦС и АГ. Ядра причудливой формы, многочисленные глыбы с инвагинациями и выростами. Ядрышки крупные, эллипсоидно-округло-рично расположенные, мембрана нежная, диффузно и равномерно распределенная по всему ядру. Доля плотного хроматина незначительна.

Рис. 3. Нейроны мамиллярного латерального ядра старых крыс через 2 (А) и 6 ч (Б) после введения адреналина. Обозначены те же структуры, что и на рис. 4.  $\times 50\,000$ .

Обнаруженные в исследуемой области изменения органелл клеток свидетельствуют о нарушении контуров ядер, сдвиге краевых ядерных положенных ядрышек в направлении на воссоздание.

на себя внимание обилие Л и липофусциновых включений (ЛВ) в нейронах старых крыс через 30 мин после введения (рис. 2, б).

Менее выраженные (по сравнению со взрослыми животными) цитохимические и ультраструктурные проявления повышения функциональной активности нейронов старых крыс в ответ на введение адреналина свидетельствуют о возрастном снижении резервных возможностей нервных клеток.

Через 2 ч после введения у взрослых крыс сохраняются реактивные изменения нейронов изученной области: концентрация цитоплазматической РНК выше на 15 %, SH-групп в цитоплазме — на 51 % и в ядре — на 15 % по сравнению с исходным уровнем. При этом концентрация —S—S-связей достоверно не отличается от уровня у интактных животных (рис. 1). Яркие, многочисленные зерна формазана свидетельствуют о высокой активности MAO, с чем, по всей вероятности, связано возвращение к исходному уровню MA.

На электронограммах в телах нейронов отмечается обилие мелких М с четкими кристами и умеренно плотным матриксом, свободных Р, цистерн зернистой ЦС и АГ. Ядра клеток причудливой формы с многочисленными глубокими инвагинациями и выпячиваниями ядерной мембраны, ядрышки крупные, эксцентрично расположенные, хроматин нежный, диффузный, равномерно распределен по всему ядру. Доля плотного хроматина незначительна.

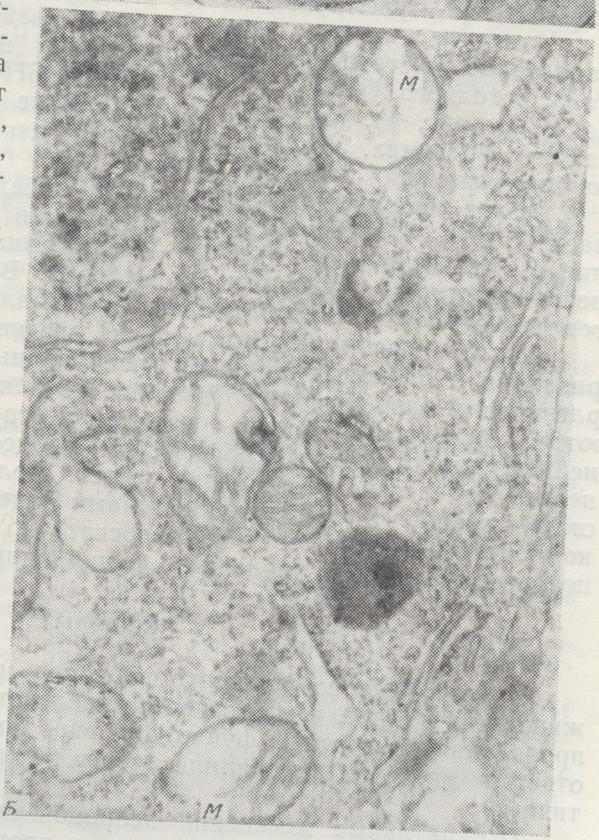


Рис. 3. Нейроны мамиллярного латерального ядра старых крыс через 2 (А) и 6 ч (Б) после введения адреналина. Обозначения те же, что и на рис. 4. X 50 000.

Обнаруженные у взрослых крыс реактивные изменения нейронов исследуемой области (высокая концентрация РНК, SH-групп, активные контуры ядер, состояние хроматина, крупное, периферически расположенное ядрышко) свидетельствуют об усиленном синтезе белка, направленном на восстановление его исходного уровня.

У старых крыс через 2 ч после введения также обнаруживаются признаки восстановительных процессов, правда, менее выраженные: повышенная концентрация MAO, нормализация уровня МА; нарастающие концентрации цитоплазматической РНК на 13 %, сохранение высокой концентрации SH-групп в цитоплазме — на 11 % выше, чем у интактных животных (рис. 1).

При этом следует отметить, что интенсификация обменных процессов у старых животных связана в основном с увеличением размеров отдельных органелл — гипертрофией М и образованием так называемых «мегамитохондрий» (размеры отдельных М —  $2090 \times 370$  нм) — рис. 3, а. Однако в функциональном плане такой путь менее эффективен (чем увеличение числа мелких М, как это имеет место у взрослых животных), так как кристы в крупных М либо единичные, либо вовсе не определяются, матрикс их часто просветлен и они быстрее подвергаются деструкции.

В отличие от взрослых животных у старых крыс не только менее выражены восстановительные процессы, но уже в эти сроки (2 ч после введения) нарастают дистрофические явления, проявляющиеся в уменьшении числа органелл в цитоплазме некоторых клеток, дальнейшем накоплении Л, ЛВ и аутофагических вакуолей, резком набухании М.

Через 6 ч после введения у взрослых животных состояние ядер заднего отдела гипоталамуса близко к исходному (по всем изученным показателям — рис. 3).

У старых животных через 6 ч после введения отмечено дальнейшее нарастание дистрофических процессов и падение всех показателей ниже исходного уровня: в цитоплазме — SH-групп — на 13 %, РНК — на 17 % (рис. 1). Активность MAO также снижается как в клетках, так и в волокнах. Убывает и интенсивность свечения МА терминалей на телах больших нейронов.

Резкое просветление цитоплазмы, обеднение ее органеллами, в частности М, дальнейшая редукция крист в последних (рис. 3, б), обилие ЛВ и вторичных лизосом — характерные черты ультраструктуры нейронов старых животных в эти сроки. В части клеток цитоплазма гомогенизируется, органеллы в ней не выявляются.

Таким образом, через 6 ч после введения адреналина возрастные различия в реакциях нейронов мамиллярных ядер наиболее демонстративны: у взрослых животных все изученные показатели возвращаются к исходному уровню, тогда как у старых крыс отмечается дальнейшее нарастание дистрофических процессов, и восстановительный период вследствие этого затягивается. Полученные данные свидетельствуют о том, что обнаруженных нами ранее у интактных старых крыс компенсаторных процессов [5] недостаточно для сохранения структуры нейронов в условиях усиленного функционирования.

### Выводы

1. Резервные возможности нейронов мамиллярных ядер у старых животных меньше, чем у взрослых, вследствие чего морфологические проявления повышения функциональной активности нервных клеток в ответ на введение адреналина (через 30 мин) у них менее демонстративны.

2. Реактивные изменения нейронов старых животных характеризуются нарастанием дистрофических процессов в изученных клетках (через 2 и 6 ч после введения адреналина), а также меньшей выраженностью (по сравнению со взрослыми крысами) процессов, направленных на восстановление исходного уровня метаболизма.

3. Дальнейшее нарастание дистрофических процессов (падение изученных показателей ниже исходного уровня через 6 ч после введения) свидетельствует о сужении диапазона компенсаторных реакций

у старых животных од восстановления ных к 6 ч после в

HISTOCHEMISTRY OF MAMILLA

Cytochemical and rats revealed lower re (28-30 months) as compared with less marked morphological changes 30 min after adrenalectomy. More delayed restorative processes were observed in old rats.

Institute of Gerontology USSR, Kiev

1. Безруков В. В. Об старении. — В кн.: старческом возрасте
2. Дильман В. М., Основы физиологии и механизмы старения и с. 336—341.
3. Маньковский Н. Б. по геронтологии. М.
4. Межиборская Н. О. нного гипоталамуса
5. Межиборская Н. А. ных ядер. — Докл. А
6. Ступина А. С., Давристик MAO в ткани зерпина. — В кн.: Л
7. Фролькис В. В. Репу
8. (Фролькис В. В., Безруков В. В., Дупленко 1972, 7, N 3, p. 169—
9. Хорьков Л. К. Сульфо
10. Buttlar-Brentano K. supraopticus und par
11. J. Hirnforsch., 1954, N
12. Cafruni E., Di Stefano
13. sulfhydryl groups. —
14. El-Badawi A., Schenk
15. simultaneous demonstration. — J. Histochem.
16. Hasan M., Glees P., the guinea pig: effect
17. 1974, 9, N 4, p. 153—1
18. Hlenner G. G., Helen
19. MAO activity by tetra
20. p. 591—600.
21. Hsu H. K., Peng M.
22. tology, 1978, 24, N 6,
23. Machado-Salas J., Sch
24. lamus of the old mouse
25. Ritter C., Di Stefano
26. ribonucleic acid. — J. F
27. Weil-Malherbe H., Ax
28. Science, 1959, 129, NB

Институт геронтологии АМН СССР, Киев

у старых животных. Следствием этого является более затяжной период восстановления у старых крыс (заканчивающийся у взрослых животных к 6 ч после введения).

N. A. Mezhiborskaya

HISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL PECULIARITIES  
OF MAMILLARY NUCLEI NEURON REACTIONS TO ADRENALINE  
ADMINISTRATION IN OLD ANIMALS

Summary

Cytochemical and electronmicroscopic examinations of the brain of 90 albino male rats revealed lower reserve capacities of the mamillary nuclei neurons in old animals (28-30 months) as compared with those of adult rats (6-8 months). This results in a less marked morphological manifestations of increased functional activity of nerve cells 30 min after adrenalin administration. The enhancement of dystrophic processes and a more delayed restoration period indicate a narrowing of the range of the adaptive reactions in old rats.

Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences,  
USSR, Kiev

Список литературы

1. Безруков В. В. Об изменении гипоталамической регуляции внешнего дыхания при старении. — В кн.: Дыхание, газообмен и гипоксические состояния в пожилом и старческом возрасте. Киев, 1975, с. 63—67.
2. Дильман В. М., Остроумова М. Н., Благодонская Я. В. и др. Эlevationный механизм старения и возрастной патологии. — Физиология человека, 1975, 1, № 1, с. 336—341.
3. Маньковский Н. Б. Диэнцефальная регуляция и старение. — В кн.: Руководство по геронтологии. М.: Медицина, 1978, с. 339—355.
4. Межиборська Н. О., Ліберман Л. М. Цитохімія білків і тіогруп у нейронах заднього гіпоталамуса білого щура. — Доп. АН УРСР. Сер. Б, 1971, № 6, с. 551—552.
5. Межиборская Н. А. Ультраструктурные проявления старения нейронов мамиллярных ядер. — Докл. АН УССР. 1980, Сер. Б, № 9, с. 73—77.
6. Ступина А. С., Давиденко И. П., Зимбалевская Ч. М. Гистохимическая характеристика MAO в тканях молодых и старых крыс при введении адреналина и резерпина. — В кн.: Лекарственная терапия в пожилом и старческом возрасте. Киев, 1968, с. 182—187.
7. Фролькис В. В. Регулирование, приспособление, старение. — Л.: Наука, 1970.—430 с.
8. (Фролькис В. В., Безруков В. В., Дуленко Ю. К., Генис Е. Д.) Frolikis V. V., Bezrukov V. V., Duplenko Y. K., Genis E. D. The hypothalamus in aging. — Exp. Geront., 1972, 7, N 3, p. 169—184.
9. Хорьков Л. К. Сульфгидрильные группы в головном мозгу молодых и старых животных в связи с условно-рефлекторной деятельностью. — Уч. зап. Ставропол. мед. ин-та, 1965, т. 15, с. 74—80.
10. Buttlar-Brentano K. von. Zur Zelengeschichte des Nucleus basalis, tuberomamillaris, supraopticus und paraventricularis unter normalen und pathologischen Bedingungen. — J. Hirnforsch., 1954, N 4/5, S. 337—346.
11. Cafruni E., Di Stefano H., Faran A. Cytophotometric determination of protein bound sulphhydryl groups. — J. Histol. and Cytol., 1958, N 2, p. 354—364.
12. El-Badawi A., Schenk E. A. Histochemical method for separate consecutive and simultaneous demonstration of acetylcholinesterase and norepinephrine in criostat section. — J. Histochem. and Cytochem., 1967, 15, N 10, p. 580—591.
13. Hasan M., Glees P., El-Ghazzawi E. Age-associated changes in the hypothalamus of the guinea pig: effect of dimethylaminoethyl p-chlorophenoxyacetate. — Exp. Geront., 1974, 9, N 4, p. 153—159.
14. Hlenner G. G., Helen J., Burtner G., Brown G. The histochemical demonstration of MAO activity by tetrazolium salts. — J. Histochem. and Cytochem., 1957, 5, N 6, p. 591—600.
15. Hsu H. K., Peng M. T. Hypothalamic neuron number of old female rats. — Gerontology, 1978, 24, N 6, p. 434—440.
16. Machado-Salas J., Scheibel M. E., Scheibel A. B. Morphologic changes in the hypothalamus of the old mouse. — Exp. Neurol., 1977, 57, p. 102—111.
17. Ritter C., Di Stefano H., Faran A. A method for the cytophotometric estimation of ribonucleic acid. — J. Histochem. and Cytochem., 1961, 9, N 1, p. 97—102.
18. Weil-Malherbe H., Axelrod J., Tomchick R. Blood brain barrier for adrenaline. — Science, 1959, 129, NB 357, p. 1226—1233.

Институт геронтологии  
АМН СССР, Киев

Поступила в редакцию  
24.12.80