

УДК 612.178.4:616.8-008.64-092.9

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ОБЛАСТЕЙ СА1 И СА3 ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ (МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

© Тверской А.В.<sup>1</sup>, Должиков А.А.<sup>1</sup>, Бобынцев И.И.<sup>2</sup>, Крюков А.А.<sup>2</sup>, Белых А.Е.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра анатомии и гистологии человека

Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород;

<sup>2</sup>кафедра патофизиологии Курского государственного медицинского университета, Курск

E-mail: [ihcdaa@mail.ru](mailto:ihcdaa@mail.ru)

Гиппокамп, являющийся мозговой структурой, обеспечивающей поведенческие механизмы и память, особенно чувствителен к стрессовым воздействиям. Целью данной работы было изучение структурных изменений областей СА1 и СА3 гиппокампа крыс при хроническом иммобилизационном стрессе, используя методы компьютерной морфометрии. Под влиянием хронического иммобилизационного стресса в обеих областях выявлены потери клеточного состава, цитоплазматические и ядерные изменения, подтвержденные методами компьютерной морфометрии. Характер и степень структурных повреждений в областях СА1 и СА3 были сходными. Выявленные морфометрические изменения вероятнее отражают снижение функциональной активности гиппокампальных нейронов под влиянием хронического иммобилизационного стресса.

**Ключевые слова:** хронический стресс, гиппокамп, морфометрия.

## MORPHOLOGICAL CHANGES OF CA1 AND CA3 HIPPOCAMPAL REGIONS IN RATS UNDER CHRONIC IMMOBILIZATION STRESS (MORPHOMETRIC STUDY)

*Tverskoy A.V.<sup>1</sup>, Dolzhikov A.A.<sup>1</sup>, Bobintsev I.I.<sup>2</sup>, Kryukov A.A.<sup>2</sup>, Belykh A.E.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of the Human Anatomy and Histology of Belgorod State National Research University, Belgorod;

<sup>2</sup>Pathophysiology Department of Kursk State Medical University, Kursk

The hippocampus, a cerebral structure important in behavior and memory, is particularly sensitive to chronic stress. The aim of this work was to study the structural changes of CA1 and CA3 hippocampal regions under chronic immobilization stress in rats, using computed morphometrical methods. Under the influence of chronic immobilization stress both CA1 and CA3 regions undergo the neuronal loss, cytoplasmic and nuclear changes, which are detected by computed morphometry. The type and degree of the structural damages in CA1 and CA1 regions were approximately equal. The observed morphometrical changes probably reflect the decreased functional activity of the hippocampal neurons under chronic immobilization stress.

**Keywords:** chronic stress, hippocampus, morphometry.

Гиппокамп является одной из основных структур головного мозга, обеспечивающих реализацию механизмов памяти, поведенческих реакций, в том числе избегания стрессовых, аверсивных воздействий. Он контролирует активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси как глюкокортикоид-зависимыми, так и глюкокортикоид-независимыми путями. Гиппокамп выполняет функцию отбора и фиксации эмоционально значимых событий [1, 2, 4, 15].

Роль изменений гиппокампальных структур при стрессовых воздействиях продемонстрирована в исследованиях, проведенных в 80-х годах прошлого столетия. Были сформулированы 5 доказательств связи стресса и гиппокампа: 1) наличие минерало- и глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе животных и человека; 2) инвертированная U-образная кривая зависимости между уровнями острого стресса и памятью; 3) стресс-модулированная внутренняя возбудимость гиппокампа и активность-зависимая синаптическая пластичность, ассоциированная с обучением и

памятью; 4) зависимость структурных изменений СА3 области гиппокампа от времени и интенсивности хронического стресса и повышения уровня стрессорных гормонов; 5) снижение образования нервных клеток в онтогенезе под воздействием стресса и гормонов. Первые исследования проводились на крысах. В последующем эксперименты на данных и других животных, а также исследования у человека давали противоречивые результаты. В одних работах показано, что хронический стресс или воздействие глюкокортикоидов вызывают гибель гиппокампальных нейронов у крыс [7, 12], землероек [9] и у приматов [13], в других исследованиях данного явления не обнаружено ни у крыс [3, 5, 14], ни у приматов [10] и человека [11]. Таким образом, теория глюкокортикоидного каскада, как основного механизма повреждений гиппокампальных структур при стрессе, не нашла полного подтверждения. В настоящее время показано, что глюкокортикоиды при стрессе играют роль не столько прямого повреждающего фактора, сколько повышают чувствительность гиппо-

кампадных структур к другим воздействиям [6]. Противоречивость имеющихся данных, а также актуальность исследования способов фармакологической коррекции стрессовых повреждений структур головного мозга определили цель данной работы, заключающуюся в морфометрическом исследовании изменений гиппокампа при хроническом иммобилизационном стрессе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на материале 20 крыс-самцов Вистар массой 220-250 г, 10 из которых составили контрольную группу, 10 – экспериментальную, в которой моделировали хронический иммобилизационный стресс. Животные содержались в клетках по 10 особей в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме и контролируемой температуре ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Стрессорное воздействие проводили в промежутки времени с 9 до 14 часов. Модель стресса создавали фиксацией крыс в положении на спине в индивидуальных боксах в течение 2 часов ежедневно на протяжении 5 суток. По окончании стрессорного воздействия животных выводили из эксперимента обескровливанием под эфирным наркозом путем забора крови из правого желудочка сердца. Исследование выполнено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и в соответствии с решением регионального этического комитета.

Головной мозг извлекали из полости черепа полностью и разрезали на четыре участка во фронтальной плоскости: первая линия разреза – на уровне прехиазматической области, вторая – на уровне задней поверхности сосцевидных тел, третьей линией отсекали мозжечок со стволом мозга. Материал фиксировали в 10% растворе формалина иммерсионным способом. Для получения препаратов гиппокампа второй участок заливали в парафин по стандартной методике и изготавливали серийные срезы толщиной 4,0 мкм. Подготовка образцов для гистологического исследования и изготовление микропрепаратов проведены с применением комплекса из сертифицированного оборудования фирмы Leica (Германия). Срезы для стандартного гистологического исследования окрашивали гематоксилином и эозином в автомате для окраски гистологических срезов и мазков (Autostainer XL ST5010; Leica, Германия), а также тионином по Нисслию. Основная часть морфологического исследования выполнена после создания электронной галереи изображений с помощью полуавтоматического сканера

микропрепаратов Mirax Desk (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Германия), а также с помощью микроскопа «Leica DM 4000 B», оснащенного комплексом для видеорегистрации изображений и пакетом программного обеспечения для морфометрии. С помощью программного обеспечения микроскопа «Leica» и программы для просмотра сканированных изображений «PannoramicViewer 1.15» производили морфометрию. Определяли относительное количество нейронов в нескольких полях зрения на полной площади пирамидного и полиморфного слоев областей CA1 и CA3 с последующим пересчетом на  $10000 \text{ мкм}^2$  ( $0.01 \text{ мм}^2$ ), больший и меньший диаметры перикарионов нейронов, их периметры и площади, диаметры ядер и ядрышек, ядерно-цитоплазматическое соотношение. У каждого животного производили по 30 измерений каждого линейного и планиметрического показателя. Перерасчет на указанную площадь произведен в связи с большим удобством сравнения получаемых величин (десятки нейронов). Количественные данные регистрировали в электронных таблицах MS Excel, средствами которой, а также с помощью программы Statistica 6.0 проведена статистическая обработка. Достоверность полученных результатов определяли с помощью критериев Стьюдента (t) и  $\chi^2$  с уровнем достоверности при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У интактных животных области CA1 и CA3 четко определяются топографически и по характерной структуре нейрональных слоев, прежде всего пирамидного. Полученные нами морфологические картины соответствовали описаниям цитоархитектонических особенностей гиппокампа крыс, имеющимся в литературе [8]. Область CA1 образована средними плотно расположенными нейронами, средний минимальный размер которых составляет  $10.57 \pm 0.17 \text{ мкм}$ , максимальный  $16.03 \pm 0.28 \text{ мкм}$ , площадь перикарионов в среднем  $139.24 \pm 4.47 \text{ мкм}^2$ . Область CA3 состоит из крупных редко расположенных нейронов, соответствующие параметры которых в среднем составляют  $12.10 \pm 0.20 \text{ мкм}$ ,  $20.43 \pm 0.29 \text{ мкм}$  и  $190.65 \pm 4.41 \text{ мкм}^2$  (рис. 1). Отличия плотности расположения и количества нейронов в данных областях различимы как визуально, так и определяются при морфометрии. Количество их в области CA1 варьирует от 33.3 до 67.0 на  $10000 \text{ мкм}^2$  (в среднем  $51.2 \pm 4.5$ ), в области CA3 от 13.3 до 20.0 (в среднем  $17.2 \pm 3.2$ ), с достоверными различиями ( $p < 0.05$ ). Диаметры ядер равны в среднем

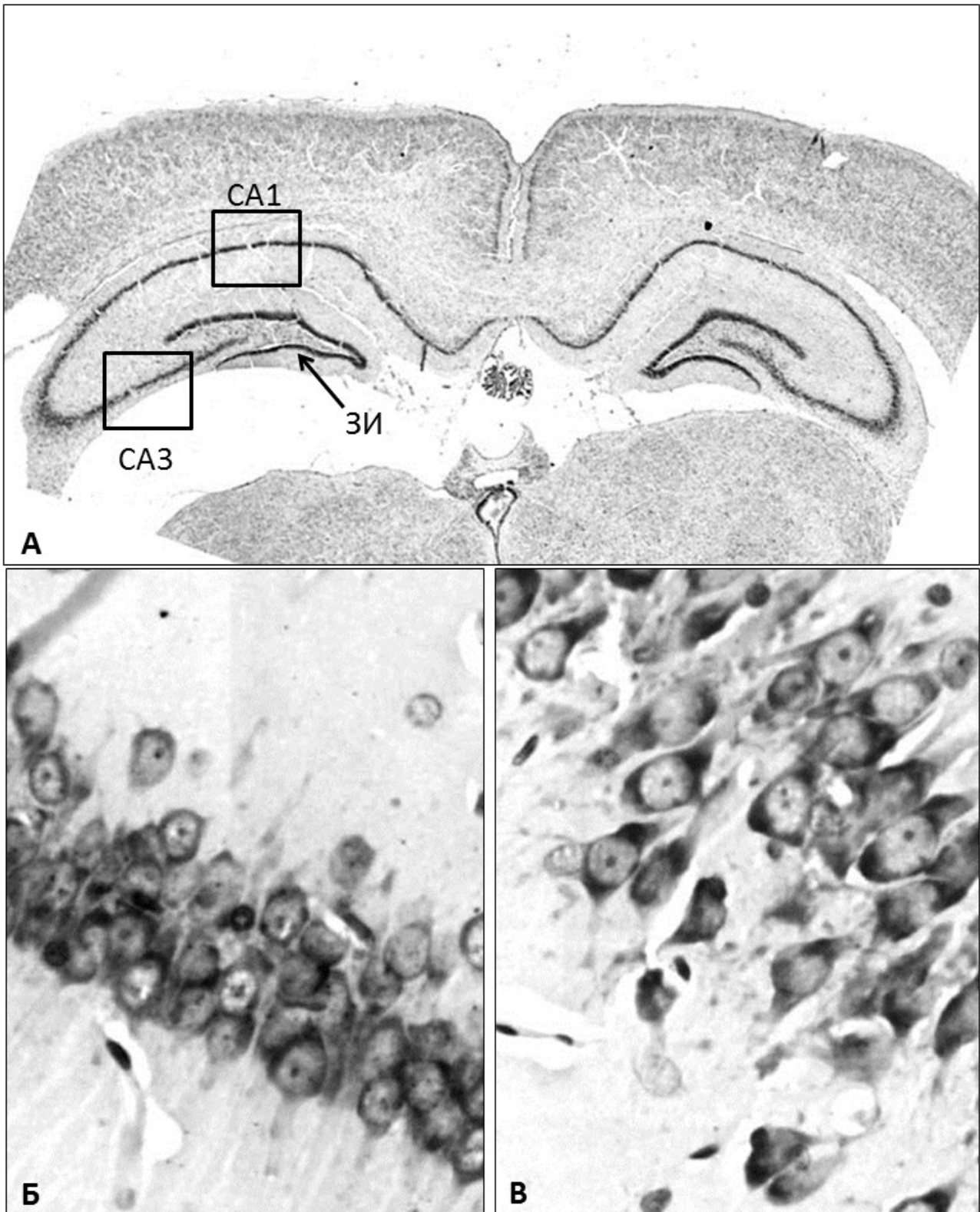


Рис. 1. Общая структура гиппокампа крыс на фронтальном срезе (А) и детали нейрональных слоев областей СА1 (Б) и СА3 (В): А – топография областей и область зубчатой извилины (ЗИ), Б – компактные слои средних нейронов в области СА1, В – рыхлое расположение крупных пирамидный нейронов в области СА3. Окр. тионином по Нисслю. Микрофото. X 20 (А), X 400 (Б, В).

7.36±0.13 мкм у нейронов области СА1, пропорционально были больше (8.85±0.17 мкм) у нейронов области СА3, достоверно не отличаясь. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) также было сходным: 0.32±0.04 и 0.33±0.06. Как показа-

тель функциональной активности нейронов оценивали количество клеток, содержащих два ядрышка в ядре, которое составило 30.0% в области СА1 и 22.0% в области СА3.

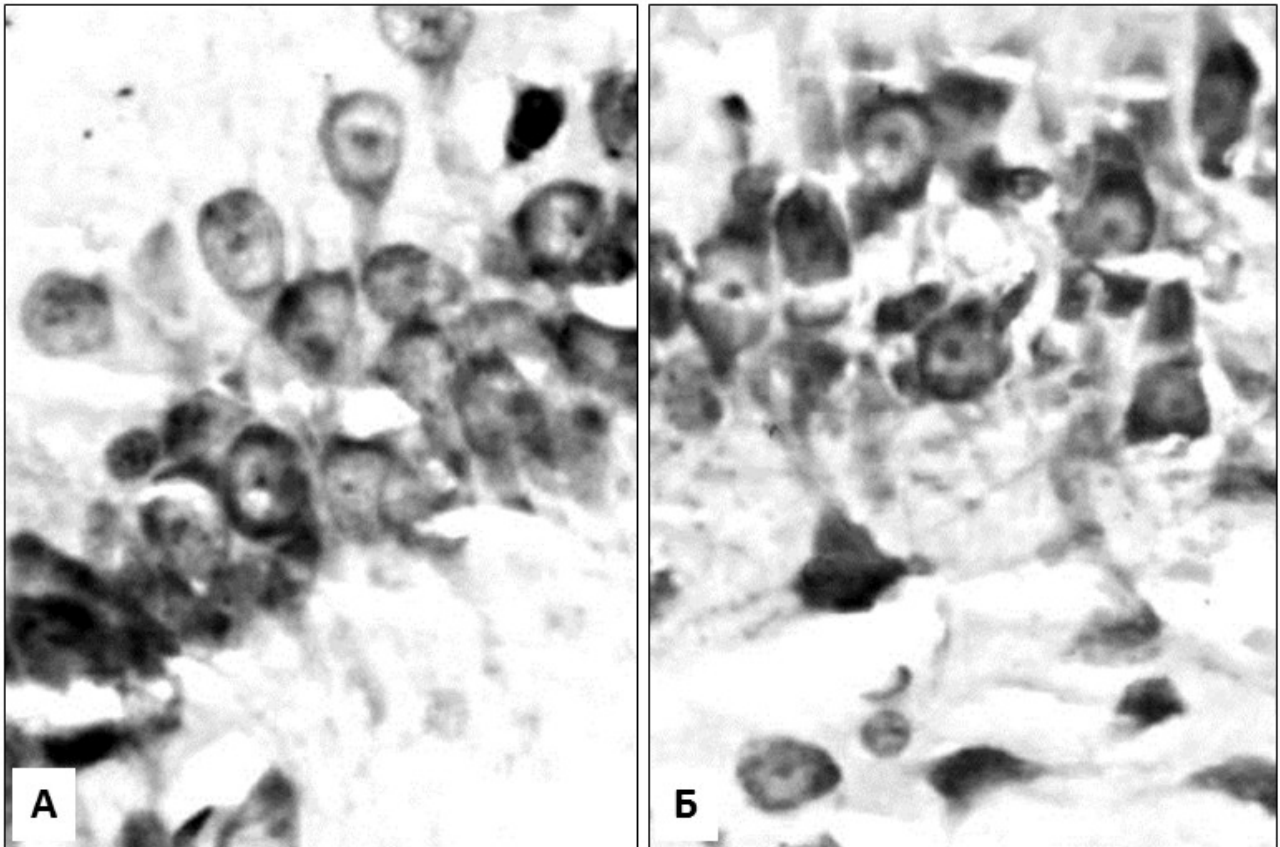


Рис. 2. Морфологические изменения нейронов областей CA1 (А) и CA3 (Б) при хроническом иммобилизационном стрессе: дезорганизация, частичное клеточное опустошение слоев, изменения ядер нейронов преимущественно в виде набухания, полиморфные изменения хроматофильного вещества в виде очагового хроматолиза, глыбчатой конденсации, нечеткость структуры апикальных дендритов пирамидных нейронов области CA3 (Б). Окр. тионином по Нисслию. Микрофото. X 400.

При воздействии иммобилизационного стресса выявлены как качественные, так и количественные изменения нейронов изученных областей гиппокампа крыс. Качественные признаки повреждения представлены типичными картинами дезорганизации нейрональных слоев, явлениями хроматолиза, полиморфными изменениями ядер: как набуханием, так и пикноморфными изменениями (рис. 2). Апикальные дендриты крупных пирамидных нейронов области CA3, четко определяемые непосредственно у перикарионов в норме, у стрессированных животных деформированы, имеют «ампутированный» вид (рис. 2 Б). Наличие стресс-обусловленных повреждений структур гиппокампа подтверждается сдвигами морфометрических параметров нейронов. Уменьшены максимальные размеры перикарионов, в большей степени в области CA3 (до  $17.68 \pm 0.19$  мкм), но без статистических отличий от интактных животных. Однако площадь перикарионов нейронов области CA3 снижена достоверно ( $p < 0.05$ ) до  $164.6 \pm 2.38$  мкм<sup>2</sup>. Тела клеток теряли четкость контуров, деформировались. С учетом того, что наибольший размер совпадает у пирамидных нейронов с осью ориентации апикального дендрита, его уменьшение в совокупно-

сти со сниженной площадью перикарионов может соответствовать описанному в литературе явлению ретракции дендритов при стрессе [6]. Диаметры ядер нейронов области CA1 недостоверно увеличены до  $7.83 \pm 0.09$  мкм, в области CA3, напротив, уменьшены до  $8.16 \pm 0.10$  мкм, ЯЦО при этом не изменялось в сравнении с показателями у интактных животных. Наиболее существенные изменения, отражающие гибель и потери клеточного состава областей CA1 и CA3 гиппокампа, выявлены при подсчете удельного количества клеток. В области CA1 при хроническом иммобилизационном стрессе оно достоверно снизилось до  $33.3 \pm 4.1$  ( $p < 0.05$ ), в области CA3 до  $14.7 \pm 2.7$  на 10000 мкм<sup>2</sup>, не отличаясь от интактного контроля. При наличии синхронных изменений ядер и перикарионов, отражающихся в однонаправленных изменениях их морфометрических параметров, показателем нарушений функциональной активности нейронов является выявленное снижение количества двуядрышковых клеток: в области CA1 оно снизилось до 5.4% ( $p < 0.05$  по критерию  $\chi^2$ ), в области CA3 – 3.8% ( $p < 0.05$  по критерию  $\chi^2$ ). Данный тип изменений с функциональной точки зрения согласуется с изменениями отростков нейронов, отражающихся на планимет-

рических показателях перикарионов, сдвигами в плотности синаптических контактов и снижением активности синаптической передачи с нарушениями межнейрональной интеграции [15].

Таким образом, при хроническом иммобилизационном стрессе, моделируемом по использованной нами методике, в областях CA1 и CA3 гиппокампа, являющихся ключевыми, развиваются признаки повреждения нейронов, проявляющиеся как качественно, так и количественно. Характер и степень изменений в использованной нами модели был сходен в областях CA1 и CA3 гиппокампа. Выявлены признаки потерь нейронального состава изученных областей, отличия от интактных показателей в планиметрических показателях перикарионов, проявления сниженной функциональной активности нейронов на уровне ядерного транскрипционного аппарата. Полученные результаты обосновывают примененный методический подход для морфологического исследования коррекции повреждений структур гиппокампа при стрессе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Умрихин А.Е. Нейромедиаторные гиппокампальные механизмы стрессорного поведения и реакций избегания // Вестник новых медицинских технологий (электронное издание). – 2013. – № 1. – С. 55.
2. Bartsch T., Döhring J., Rohr A., Jansen O., Deuschl G. CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and autothetic consciousness // PNAS. – 2011. – Vol. 108, N 42. – P. 17562-17566.
3. Bodnoff S.R., Humphreys A.G., Lehman J.C., Diamond D.M., Rose G.M., Meaney M.J. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats // J Neurosci. – 1995. – Vol. 15. – P. 61-69.
4. Clark R.E., Broadbent N.J., Larry R. Squire Hippocampus and Remote Spatial Memory in Rats // Hippocampus. – 2005. – 15(2). – P. 260 – 272.
5. Coburn-Litvak P.S., Tata D.A., Gorby H.E., McCloskey D.P., Richardson G., Anderson B.J. Chronic corticosterone affects brain weight, and mitochondrial, but not glial volume fraction in hippocampal area CA3 // Neuroscience. – 2004. – Vol. 124, N 2. – P. 429-438.
6. Conrad C.D. Chronic Stress-Induced Hippocampal Vulnerability: The Glucocorticoid Vulnerability Hypothesis // Rev Neurosci. – 2008. – Vol. 19, N 6. – P. 395-411.
7. Dachir S., Kadar T., Robinzon B., Levy A. Nimodipine's protection against corticosterone induced morphological changes in the hippocampus of young rats // Brain Res. – 1997. – Vol. 748, N 1-2. – P. 175-183.
8. El Falougy H., Kubikova E., Benuska J. The microscopical structure of the hippocampus in the rat // Bratisl. Lek Listy. – 2008. – Vol. 109, N 3. – P. 106-110.
9. Fuchs E., Flügge G., Ohl F., Lucassen P., Vollmann-Honsdorf G.K., Michaelis T. Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus // Physiol Behav. – 2001. – Vol. 73. – P. 285-291.
10. Leverenz J.B., Wilkinson C.W., Wamble M., Corbin S., Grabber J.E., Raskind M.A., Peskind E.R. Effect of chronic high-dose exogenous cortisol on hippocampal neuronal number in aged nonhuman primates // J Neurosci. – 1999. – Vol. 19. – P. 2356-2361.
11. Müller M.B., Lucassen P.J., Yassouridis A., Hoogendijk W.J.G., Holsboer F., Swaab D.F. Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus // Eur J Neurosci. – 2001. – Vol. 14. – P. 1603-1612.
12. Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications for aging // J Neurosci. – 1985. – Vol. 5. – P. 1222-1227.
13. Sapolsky R.M., Uno H., Rebert C.S., Finch C.E. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates // J Neurosci. – 1990. – Vol. 10. – P. 2897-2902.
14. Sousa N., Madeira M.D., Paula-Barbosa M.M. Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study // Brain Res. – 1998. – Vol. 794, N 2. – P. 199-210.
15. The hippocampal book / Edited by: P. Andersen, Morris R., Amaral D., Bliss T., 'O Keefe J. – Oxford University Press, 2007. – 832 p.