

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СЕЗОНА ГОДА, ПОЛА И ТОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА БЕЛЫХ КРЫС

Котельникова С. В., Швецова Н. Г., Котельников А. В.

ФГБОУ ВПО Астраханский государственный технический университет, Астрахань, Россия (414025, г. Астрахань, ул. Татищева, 16) kotas@inbox.ru

В четыре сезона года (весна, зима, лето, осень) у самцов и самок белых крыс моделировали токсический стресс ежедневным введением per os 2 мг хлорида кадмия ($\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$) на 100 г массы тела в течение 15 дней. Методом морфометрии на срезах были измерены и рассчитаны объемы ядрышек нейроцитов супрахиазматического, аркуатного, вентрамедиального, супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса белых крыс. Проведен дисперсионный анализ объемов ядрышек по трем факторам: сезон года, пол животного, токсический стресс. Выявлено, что для функционального состояния крупноклеточных ядер супраоптического и паравентрикулярного наиболее значимым фактором является сезон года. Для мелкоклеточных ядер (аркуатного, супрахиазматического и вентрамедиального) значимость отдельных факторов сезона, пола и стресса сравнима с их взаимозависимым влиянием. Следовательно, реакция этих ядер на токсический стресс опосредуется сезоном года и полом животного.

Ключевые слова: гипоталамус, сезон года, синтетическая активность, крысы.

THE ANALYSIS OF INFLUENCE OF YEAR'S SEASON, SEX AND TOXIC STRESS ON A FUNCTIONAL CONDITION OF SOME HYPOTHALAMIC NUCLEI OF WHITE RATS

Kotelnikova S. V., Shvetsova N. G., Kotelnikov A. V.

Astrakhan state technical university, Astrakhan, Russia (414025, Astrakhan, Tatischev's street, 16) kotas@inbox.ru

During four seasons of year (the spring, winter, summer, autumn) at males and females of white rats modelled toxic stress daily introduction per os 2 mg of cadmium chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$) on 100 g weights of a body within 15 days. With the morphometric method on microscopic sections measured and calculated the cells' nucleoli' volumes of suprachiasmaticus, arcuatus, ventromedialis, supraopticus and paraventricularis hypothalamic nuclei of white rats. The dispersive analysis of nucleoli' volumes with three factors was lead: a season of year, a sex of an animal, toxic stress. It is revealed, that for a functional condition magnacellular supraopticus and paraventricularis nuclei the most significant factor is a season of year. For microcellular nuclei (arcuatus, suprachiasmaticus and ventromedialis) the importance of separate factors of a season, a sex and a stress also is significant, as well as their interdependent influence. Hence, reaction of these nuclei on toxic stress is mediated by a season of year and a sex of an animal.

Keywords: hypothalamus, a season of year, synthetic activity, rats.

Гипоталамическая регуляция обеспечивает тонкую настройку адаптационного, репродуктивного и метаболического гомеостаза организма под существующие экологические условия, важнейшим из которых является сезон года. Входящий сигнал (изменение продолжительности светового дня) воспринимается циркадианным водителем ритма в СХЯ, приводя к изменениям синтеза мелатонина в эпифизе, терморегуляции, архитектуры сна, а также оказывая влияние на разные феномены, такие, как настроение, продуктивность и гормональная секреция [9]. Реакция организма на сезонные перестройки не одинакова у организмов разного пола, что, очевидно, диктуется различным гормональным фоном самцов и самок.

Поступление в организм чужеродных веществ, в частности, тяжелых металлов, приводит к развитию компенсаторных реакций, задействующих энергетические резервы организма, тесно зависящие от сезона года. Так, повреждающий эффект кадмия, инициирующего в

клетках организма свободнорадикальное окисление [5, 6], зависит от фотопериода: накопление и токсичность кадмия в короткий фотопериод (8 ч освещения) выше, чем в длинный (16 ч) [10].

Несмотря на тесную взаимосвязь всех гипоталамических центров, функционирующих как единая система, интенсивно обменивающаяся всей получаемой информацией, представляет интерес изучение степени участия различных гипоталамических центров в сезонных перестройках организма.

Для анализа выбрали следующие ядра гипоталамуса: супрахиазматическое (СХЯ), ответственное за взаимодействие с пинеальной железой и циркадианные ритмы, аркуатное (АЯ) и вентромедиальное (ВМЯ), как ядра, вовлеченные в организацию энергетического баланса организма [8], а также крупноклеточные супраоптическое (СОЯ) и паравентрикулярное (ПВЯ) ядра, осуществляющие регуляцию водно-солевого обмена [7].

Цель работы: методом трехфакторного дисперсионного анализа оценить долю влияния факторов: сезона года, пола животных и токсического стресса на функциональную активность СХЯ, АЯ, ВМЯ, СОЯ и ПВЯ гипоталамуса белых крыс.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 104 белых крысах, самцах и самках. Животные содержались в стандартных условиях вивария, при естественном освещении, самцы и самки раздельно. В четыре сезона: зиму (январь), весну (апрель), лето (июнь) и осень (октябрь) у животных моделировали токсический стресс ежедневным введением $per os$ 2 мг хлорида кадмия ($Cd Cl_2 \cdot 2,5H_2O$) на 100 г массы тела в течение 15 дней. Общая доза составила 30 мг на 100 г массы тела, что составляет $1/3$ от LD_{50} . Показано, что при кишечном поступлении всасывается около 5 % введенного кадмия [1].

Эксперименты выполнены с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными. По окончании эксперимента извлекали гипоталамус, фиксировали его в жидкости Буэна и осуществляли заливку в парафин в соответствии со стандартными методиками. Функциональную активность ядер гипоталамуса оценивали по объемам ядрышек их нейросекреторных. Срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином, фотографировали при увеличении 900^x и измеряли два перпендикулярных диаметра ядрышка нейроцитов. Полученные величины переводили в мкм с помощью объективного микрометра и рассчитывали объем нуклеол по формуле эллипсоидовращения:

$$V = (\pi/6) * d_1 * d_2^2,$$

где d_1 и d_2 – взаимно перпендикулярные диаметры ядра или ядрышка (d_1 – наибольший диаметр, d_2 – наименьший диаметр).

Морфометрический критерий является достаточно надежным и информативным, так как «ядрышковый аппарат» значительно изменяется в различные периоды функциональной активности нервных клеток и представляет собой морфологическое выражение процессов синтеза. Также есть данные, свидетельствующие о возможности использования ядрышек в качестве биомаркеров токсических внешних воздействий. Кроме того, ядрышки являются одним из наиболее устойчивых компонентов клеток к постмортальным изменениям.

Для определения локализации гипоталамических ядер мозга использовался атлас мозга крысы [3]. Для дисперсионного анализа полученных измерений [4] выделено 3 фактора: фактор «сезон» в соответствии с поставленными экспериментами имел 4 градации, фактор «пол» – 2 градации и фактор «токсический стресс» – 2 градации, т.е. животные, подвергавшиеся воздействию кадмия и контрольные особи.

Результаты и их обсуждение. Из всех изученных нейроэндокринных центров наименьшая сила влияния организованных в комплекс факторов на формирование дисперсии объемов ядрышек нейроцитов характерна для СХЯ – 9,16 %, хотя именно этот нервный центр является наиболее вероятным претендентом на роль сезонного осциллятора (табл. 1). Низкий «отклик» СХЯ на изучаемые факторы может быть следствием наличия большого количества субпопуляций нейросекреторных клеток в данном нервном центре [2], и роль триггера по отношению к сезонным перестройкам организма может осуществляться только одной из субпопуляций СХЯ.

Таблица 1. Сила влияния фактора на факториальное разнообразие объемов ядрышек нейроцитов мелкоклеточных ядер гипоталамуса белых крыс, %

<i>Факторы</i>	<i>СХЯ</i>	<i>АЯ</i>	<i>ВМЯ</i>
Сезон	2,5±0,09***	10,9±0,14***	10,1±0,14***
Пол	0,3±0,03**	0,009±0,046	0,7±0,05***
Кадмий	0,6±0,03***	0,2±0,05*	0,06±0,048
Сезон+пол	0,09±0,092	1,0±0,14***	0,9±0,14***
Пол+кадмий	0,07±0,031	0,2±0,05*	1,3±0,05***
Сезон+кадмий	4,2±0,09***	3,0±0,14***	1,3±0,14***
Сезон+пол+кадмий	1,4±0,09***	2,8±0,14***	12,2±0,14***

Примечание (здесь и в табл. 2)

* – достоверность силы влияния по Фишеру, * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

При анализе распределения дисперсий объемов ядрышек нейроцитов СХЯ очевидно, что на долю сочетаний факторов, отражающих их взаимовлияние, приходится в 1,7 раз больше силы влияния, чем на долю отдельных факторов сезона, пола и токсического стресса. При этом наибольшую роль в формировании дисперсии признака играет сочетание «сезон+кадмий», на которое приходится 4,2 % (p<0,001). Учитывая также относительно высо-

кую долю сезона как индивидуального фактора, формирующего дисперсию признака (2,5 %, $p < 0,001$), можно отметить его ведущую роль по отношению ко всем исследованным факторам, что обуславливает модуляцию реакции нейроцитов СХЯ в ответ на токсический стресс сезонными ритмами.

В АЯ комплекс исследуемых факторов отвечает за формирование 18,1 % всей дисперсии признака, причем доли влияний сочетаний факторов и их индивидуальное воздействие сравнимы: 11,1 % против 7 %. Сезон имеет особое значение для АЯ, его доля значительна как при учете силы влияния отдельных факторов (10,9 %, $p < 0,001$), так и при анализе их взаимосвязанности. Все сочетания, включающие сезон года, достоверны: «сезон+кадмий» – 3 %, «сезон+пол» – 1 %, и «сезон+пол+кадмий» – 2,8 %.

Влияние сезона на АЯ гипоталамуса вполне объяснимо. Этот нервный центр участвует в формировании энергетического и теплового баланса организма, контролируя не только приход энергии за счет синтеза орексигенных и анорексигенных факторов, но и ее расход как составная часть центра теплопродукции. Очевидно, что влияния и других факторов на функциональную активность АЯ, в том числе токсического стресса, будет опосредовано сезоном года.

Для ВМЯ организованные в комплекс факторы формируют 26,6 % всей дисперсии объема нуклеол его нейронов. Также как и для СХЯ, доля дисперсии признака, формируемой за счет сочетания факторов, составляет величину в 1,4 раз большую, чем сила влияния отдельно взятых факторов сезона, пола и токсического стресса. Максимальное разнообразие формируется под действием сочетания «сезон+пол+кадмий» – 12,2 %, что указывает на тесную взаимосвязь изменения функциональной активности ядра животных разного пола в ответ на воздействие хлоридом кадмия с сезоном года.

Несмотря на взаимозависимость исследуемых факторов, индивидуальная сила влияния сезона года также составляет значительную величину – 10,1 % ($p < 0,001$). ВМЯ входит в центр насыщения и посредством регулирования приема пищи участвует в снабжении организма энергетическими резервами. В разные сезоны расход энергии меняется как в связи с непосредственно воспринимаемыми колебаниями температуры и освещенности, так и в реализации наследственно закрепленных внутренних ритмов, возникших как результат приспособления организма к смене сезонов.

Таблица 2. Сила влияния фактора на факториальное разнообразие объемов ядрышек нейроцитов крупноклеточных ядер гипоталамуса белых крыс, %

<i>Факторы</i>	<i>СОЯ</i>	<i>ПВЯ</i>
Сезон	22,9±0,08***	18,5±0,12***
Пол	0,006±0,027	2,2±0,04***
Кадмий	1,8±0,03***	0,08±0,04
Сезон+пол	1,6±0,08***	2,0±0,12***

Пол+кадмий	0,001±0,027	0,3±0,04*
Сезон+кадмий	0,4±0,08**	0,6±0,12**
Сезон+пол+кадмий	0,5±0,08***	5,6±0,12***

Как для СОЯ, так и для ПВЯ организованные в комплекс факторы отвечают за формирование значительной доли дисперсии исследуемого признака, соответственно 27,2 и 29,2 % (табл. 2). При этом доля влияния сочетаний факторов мала для обоих нервных центров: 2,5 % в СОЯ и 8,5 % в ПВЯ.

Из действующих индивидуально оцениваемых факторов наибольшую силу влияния имеет сезон года, за его счет формируется 22,9 % дисперсии объемов нуклеол в СОЯ и 18,5 % в ПВЯ ($p < 0,001$ для обоих). Крупноклеточные зоны СОЯ и ПВЯ – место синтеза гормонов вазопрессина и окситоцина, одной из функций которых является поддержание водно-солевого баланса, который также чувствителен к сезонным колебаниям температуры и потреблению энергии.

Заключение

Таким образом, для крупноклеточных ядер СОЯ и ПВЯ наиболее велико влияние сезона как отдельно взятого фактора, в то время как для мелкоклеточных пептидэргических ядер гипоталамуса взаимовлияние изученных факторов либо сравнимо с их индивидуальным влиянием (АЯ), либо больше индивидуального влияния (СХЯ и ВМЯ). В таком случае реакция нейроэндокринного центра на токсический стресс будет опосредоваться сезоном года и полом животного.

Список литературы

1. Абдурахманов Г. М., Зайцев И. В. Экологические особенности содержания микроэлементов в организме животных и человека. – М.: Наука, 2004. – 187 с.
2. Замощина Т. А., Мелешко М. В., Матвеевко А. В. Электролитическое повреждение правого супрахиазматического ядра и циркадианные ритмы температуры тела и горизонтальной активности крыс в тесте «открытое поле» // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – Т. 111, № 1. – С. 68-72.
3. Оленев С. Н. Конструкция мозга. – Л.: Медицина, 1987. – С. 67-126.
4. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышэйш. школа, 1973. – С. 187-229.
5. Матолінець О. М. Вікові особливості антиоксидної системи у тварин з кадмієвим токсикозом // Медична хімія. – 2000. – Т.2, №1. – С.44-47.
6. Нейко Є. М., Губський Ю. І., Ерстенюк Г. М. Інтоксикація кадмієм: токсикокінетика і механізм біоцидних ефектів (огляд літератури і власних досліджень) // Журн. АМН України. – 2003. – Т.9, №2. – С. 250-260.

7. Raggenbass M. Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 583, № 2-3. – P. 243-254.
8. Schwartz M.W. Central nervous system control of food intake / M.W. Schwartz, S.C. Wood, D. Jn. Porte, R. J. Seeley, D. G. Baskin // *Nature.* – 2000. – Vol. 404. – P. 661–671.
9. Wirz-Justice A. How to measure circadian rhythms in humans.// *Medicographia.* – 2007. – Vol. 29. – P. 84–90.
10. Włostowski T., Krasowska A., Bonda E. Joint effects of dietary cadmium and polychlorinated biphenyls on metallothionein induction, lipid peroxidation and histopathology in the kidneys and liver of bank voles // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2008. – Vol. 69, № 3. – P. 403-410.

Рецензенты:

Кондратенко Елена Игоревна, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой биохимии, биофизики и молекулярной биологии ГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет», г. Астрахань.

Горст Виктор Рудольфович, доктор биологических наук, профессор кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», г. Астрахань.