

© Коллектив авторов, 2017
УДК 611.814.1/3:616.718.55-001.5-0039:599.323.4

*В.А.Миханов, В.С.Полякова, Е.И.Шурыгина, Е.Е.Мхитарян, К.Н.Мещеряков,
Т.Г.Кожанова, Н.Р.Бакаева*

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНОЙ НЕЙРОСЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ В ПРОЦЕССЕ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА ДЛИННЫХ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ

Кафедра патологической анатомии (зав. — проф. В.С.Полякова), ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

На 35 крысах линии Вистар изучена динамика структурно-функциональных изменений нейросекреторных клеток (НСК) супраоптических ядер гипоталамуса и нейрогипофиза (НГ) на 1-, 3-, 7-, 14-, 21-, 28-е и 61-е сутки после перелома средней трети диафиза большеберцовой кости. НСК гипоталамуса, НГ, а также зону перелома кости исследовали, используя гистологические, гистохимические и морфометрические методы. При заживлении перелома выделены 2 этапа стрессорной активации гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы: на 1–3-и сутки (воздействие на организм перелома кости с развитием посттравматического острого воспаления) и на 14–21-е сутки (пик литической активности хондрокластов с массивным хондроллизом хрящевой мозоли). В начальном периоде остеорепаляции имеются однонаправленные, но асинхронные изменения в гипоталамусе и НГ, сопровождающиеся «истощением» структурно-функциональных резервов НГ на 3-и, а гипоталамуса на 7-е сутки.

Ключевые слова: гипоталамус, нейросекреторные клетки, нейрогипофиз, остеорепаляция

В результате многочисленных работ доказана высокая чувствительность гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы (ГГНС) на воздействия повреждающих факторов различного генеза [1, 2, 5, 8]. Несмотря на то, что все гипоталамические центры функционируют как единая система [4], мелкоклеточные ядра гипоталамуса, в которых вырабатываются статины и либерины, крупноклеточные ядра гипоталамо-нейрогипофизарной системы обеспечивают более специфические изменения гомеостаза, определяя адаптацию в большей степени на уровне органов или их систем. Вместе с тем известно, что в ответ на действие любого стрессора среди гипоталамических структур ведущее значение имеют крупноклеточные супраоптические (СОЯ) и паравентрикулярные ядра [5]. Секретируя окситоцин и вазопрессин, они обеспечивают активацию естественной резистентности организма [7]. Доминирующая роль при этом принадлежит СОЯ [2]. Сведения о структурно-функциональных изменениях в ядрах гипоталамуса и нейрогипофиза (НГ), возникающих на фоне посттравматической регенерации при переломах костей, в литературе отсутствуют.

Цель данной работы — исследование динамики структурно-функциональных изменений нейросекреторных клеток СОЯ гипоталамуса и НГ в ходе репаративной регенерации длинных трубчатых костей.

Материал и методы. Исследование проведено на 40 половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Все исследования на животных были выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза СССР от 13.11.1984 г. № 724), а также было получено одобрительное заключение локального этического комитета при Оренбургском государственном медицинском университете (протокол № 82 от 20.06.2013 г.). Животным подопытной группы под ингаляционным эфирным наркозом в асептических условиях после разреза кожи и мягких тканей левой голени костными кусачками формировали поперечный перелом средней трети диафиза большеберцовой кости с последующим сшиванием кожной раны одноузловым швом. Осуществлена естественная иммобилизация посредством сохранившей целостность малоберцовой кости. Контролем служили интактные крысы. Животных выводили из опыта на 1-, 3-, 7-, 14-, 21-, 28-е и 61-е сутки путём декапитации под эфирным наркозом. Материал для исследования (зона перелома кости, гипоталамус и гипофиз) фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине и после стандартной гистологической проводки заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5,0 мкм окрашивали гематоксилином

Сведения об авторах:

Миханов Василий Александрович (e-mail: vmikhanov@gmail.com), Полякова Валентина Сергеевна (e-mail: profpolyakova@yandex.ru), Шурыгина Елена Ивановна (e-mail: shuryginalena@mail.ru), Мхитарян Елена Евгеньевна (e-mail: k_patanat@orgma.ru), Мещеряков Константин Николаевич, Кожанова Татьяна Геннадьевна, Бакаева Назиля Рифкатовна, кафедра патологической анатомии, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6

Майера — эозином. Для изучения структуры нейросекреторных клеток (НСК) СОЯ и НГ на светооптическом уровне использовали методику окраски по Баргману в модификации А.Л.Поленова [3]. Морфометрический анализ осуществляли в условных полях зрения (п. з.) — цифровых микрофотографиях, полученных с использованием микроскопа МИКМЕД-6 (Россия), фотокамеры ScoreTec DCM-510 (Италия) и программы «JMicroVision 1.2.7» (Швейцария) при исследовании 20 п. з. гистологических срезов под общим ув. 900. Для оценки состояния СОЯ гипоталамуса определяли относительное содержание типов нейросекреторных клеток (НСК) в соответствии со степенью их функциональной активности (1-й А, 1-й Б, 1-й В, 2-й, 3-й) согласно имеющимся сведениям и классификациям [4], а также вычисляли площади (S) их перикарионов и ядрышково-ядерное (ЯЯО) отношение. Определяли относительную объемную плотность (ООП) НСК СОЯ гипоталамуса и нейросекреторных телец (НТ) (характеризующую соотношение площадей, занимаемых НСК СОЯ гипоталамуса или НТ в п. з. гистологического среза, и общей площади анализируемого п. з. гистологического среза — цифровой микрофотографии) по формуле: $ООП (\%) = (S_a/S_t) \times 100$, где ООП — относительная объемная плотность, S_a — суммарная площадь всех выделенных НСК СОЯ гипоталамуса или нейросекреторных телец в анализируемой цифровой микрофотографии гистологического среза, S_t — общая площадь цифровой микрофотографии. При проведении статистической обработки результатов использовали программу Statistica 10.0. Критическим уровнем значимости считали $P < 0,05$.

Результаты исследования. В СОЯ через 1 сут увеличивается число НСК в состоянии повышенной активности (1-й А тип), опустошения (1-й Б тип) и физиологической дегенерации (3-й тип) при синхронном снижении НСК в состоянии депонирования секрета (1-й В тип) и покоя (2-й) (табл. 1). Уже на 3-и сутки в СОЯ происходит уменьшение высокоактивных и опустошенных НСК, при этом значительно повышается число НСК с низкой функциональной активностью, находящихся в состоянии физиологической дегенерации. При световой микроскопии такие НСК при окраске нейросекрета по Баргману выглядят гомогенно темноокрашенными пикноморфными, имеющими угловатую форму тела и пикнотические ядра (рис. 1).

При сравнении с контролем в НГ (рис. 2) происходит почти 20-кратное снижение ООП НТ, а средней площади НТ — в 6 раз.

К 7-м суткам у животных подопытной группы в гипоталамусе происходит еще большее уменьшение (почти в 4 раза по сравнению с контролем) числа НСК, находящихся в состоянии повышенной активности и характеризующихся усиленным синтезом и выведением секрета из перикарионов. При этом размеры перикариона и всех основных структур увеличены (табл. 2). Светлые ядрышки чаще располагаются около ядерной мембраны. При окраске по Баргману такие НСК выглядят светлыми. Число других типов НСК в этот срок изменяется незначительно. По сравнению с 3-и на 7-е сутки в НГ происходит значительное увеличение ООП и средней площади НТ (табл. 3).

На 14-е сутки в гипоталамусе происходит уменьшение содержания НСК в состоянии депонирования, покоя и дегенерации, тогда как НСК 1-го А типа, напротив, увеличивается. Изменение числа НСК сопровождается увеличением средней площади клеток. Также, достигая в этот срок максимальных значений, увеличивается число НСК 1-го Б типа, которые по сравнению с НСК 1-го А типа имеют меньшие размеры перикариона, ядра и ядрышка. Ядра светлые, содержат деконденсированный хроматин. В таких клетках синтез нейросекрета уравновешен его выведением — состояние «умеренной активности» или преобладают процессы выведения нейросекрета — состояние «опустошения». При окраске по Баргману такие НСК выглядят светлыми. В НГ продолжается незначительное увеличение ООП и средней площади НТ.

На 21-е сутки в гипоталамусе на фоне продолжающегося увеличения числа НСК 1-го А типа наблюдается уменьшение НСК 1-го Б типа. При этом происходит незначительное увеличение числа НСК 2-го типа, соответствующих «состоя-

Таблица 1

Относительное содержание типов нейросекреторных клеток (НСК) у крыс в супраоптических ядрах (СОЯ) в разные сроки после перелома средней трети диафиза большеберцовой кости ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Тип НСК	Контроль	Сроки заживления перелома кости, сутки						
		1-е	3-и	7-е	14-е	21-е	28-е	61-е
1-й А	28,5±1,1	34,02±1,3*	18,5±0,9*	7,5±0,3*	28,4±1,2*	32,6±1,3*	52,50±2,4*	30,9±1,0
1-й Б	8,3±0,4	25,77±1,1*	21,0±1,0*	18,8±0,8*	29,1±1,2*	26,1±1,2*	12,5±0,6*	9,2±0,5
1-й В	37,7±1,3	14,3±0,6*	17,3±0,7*	21,2±0,9*	16,5±0,8*	15,2±0,6*	17,5±0,8*	34,1±1,4
2-й	21,1±1,0	15,5±0,7*	24,7±1,1*	31,2±1,3*	16,5±0,8*	17,4±0,8*	12,5±0,6*	21,3±0,1
3-й	4,43±0,22	10,3±0,5*	18,5±0,8*	21,2±1,0*	9,4±0,5*	8,7±0,4*	5,0±0,28	4,57±0,24

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: * различия значимы по сравнению с показателями у животных контрольной группы при $P \leq 0,05$.

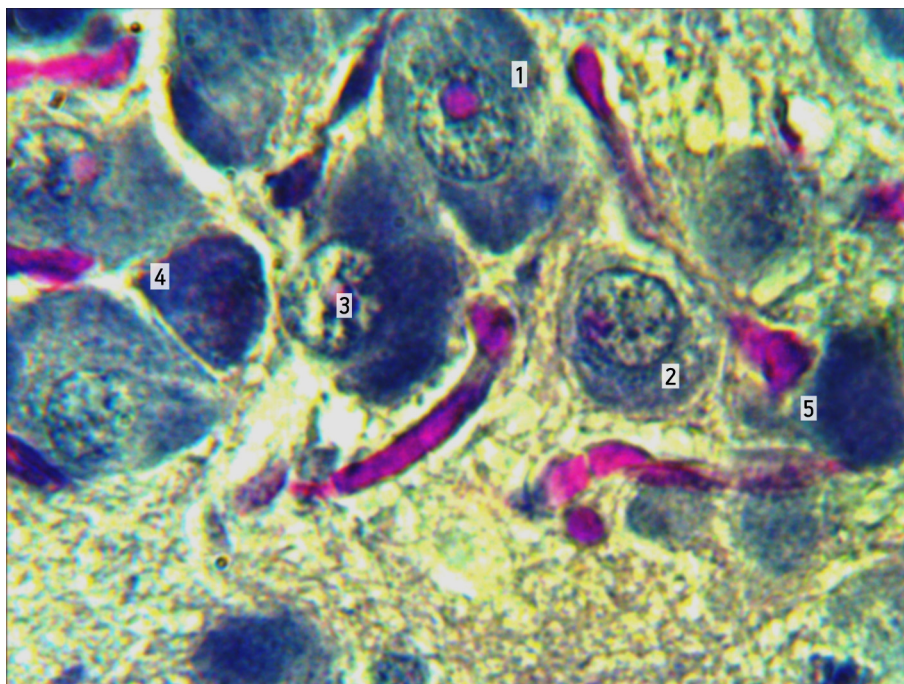


Рис. 1. Супраоптическое ядро гипоталамуса крысы через 3 сут после перелома средней трети диафиза большеберцовой кости.

1 — нейросекреторная клетка (НСК) в состоянии повышенной активности; 2 — НСК в состоянии опустошения; 3 — НСК в состоянии депонирования секрета; 4 — НСК в состоянии покоя; 5 — НСК в состоянии физиологической дегенерации. Окраска нейросекрета по Баргману в модификации Поленова. Об. 90, ок. 15

нию покоя». Они представлены темноокрашивающимися по Баргману НСК с четкими границами перикариона, часто овальной формы, ядрами, богатыми конденсированным хроматином, и плотными ядрышками. В НГ происходит почти 2-кратное снижение средней площади НТ.

На 28-е сутки опыта вся площадь интермедиарной костной мозоли представлена остатками деградирующего хряща и очагами формирования грубоволокнистой костной ткани, состоящими преимущественно из остеобластов. В гипоталамусе на фоне продолжающегося увеличения числа НСК с высокой активностью происходит максимальное снижение количества НСК в состоянии покоя. При этом в НГ после происшедшего снижения начинается рост ООП и средней площади НТ. На 61-е сутки интермедиарная костная мозоль представлена разросшейся грубоволокнистой костной тканью. На месте редуцирующейся эндостальной мозоли формируется костномозговой канал. В гипоталамусе по сравнению с предыдущим сроком значительно уменьшается доля НСК повышенной активности при 2-кратном повышении НСК в состоянии депонирования и покоя и прежней динамике изменений числа НСК 1-го Б и 3-го типа. В НГ наблюдается почти 2-кратное увеличение ООП и средней площади НТ.

Обсуждение полученных данных. Начальные проявления стрессового ответа харак-

теризуются универсальными чертами для любого воздействия: перестройкой обмена веществ и выделением медиаторов стресса [1], что в нашем эксперименте подтверждается «экстренной мобилизацией» резервов ГГНС на 1-е сутки после перелома, проявляющейся усилением секреторной активности НСК гипоталамуса, тогда как на 3-и сутки эксперимента происходит «истощение» структурно-функциональных резервов гипоталамуса, пик которого приходится на 7-е сутки с момента перелома и проявляется максимальным снижением числа НСК в состоянии повышенной активности при максимально выраженном относительном преобладании над ними НСК в состоянии опустошения. В НГ пик «истощения» структурно-функциональных резервов приходится на 3-и сутки и проявляется максимальным снижением ООП и средней площади НТ, тогда как на 7-е сутки в НГ наблюдается значительное увеличение этих показателей. Асимметрия изменений в гипоталамусе и НГ, вероятно, связана с особенностью остеорепаративного процесса в эти сроки. Так, на 3-и сутки в области перелома всё ещё сохраняются признаки экссудативного воспаления с лизисом отломков кости и преобладанием катаболических процессов, что требует «повышенного расхода» окситоцина и вазопрессина и сопровождается структурно-функциональным истощением НГ, приводящим к гиперактивации НСК гипоталамуса, пик которой

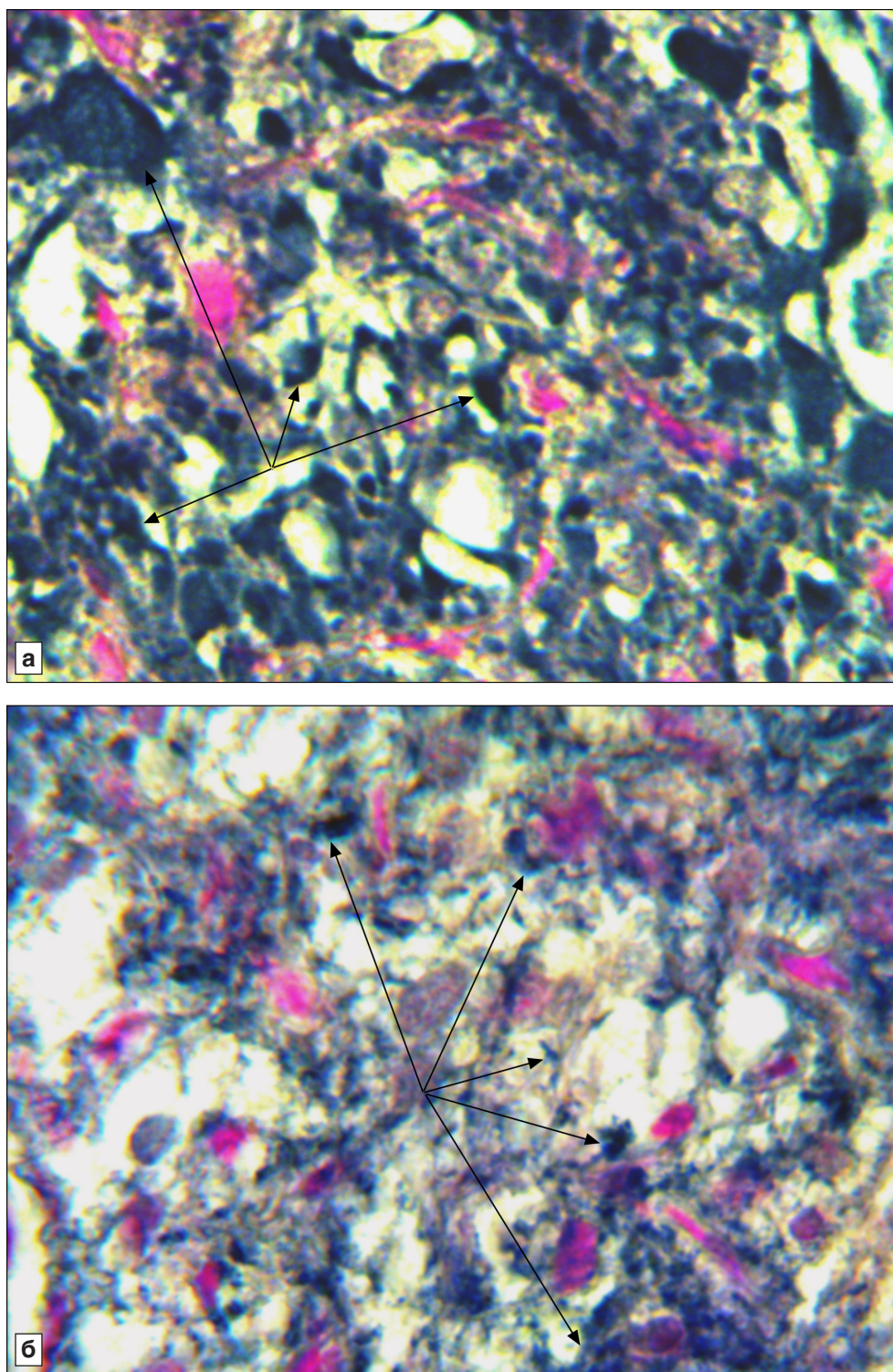


Рис. 2. Нейрогипофиз контрольной (интактной) крысы (а) и на 3-и сутки после перелома средней трети диафиза большеберцовой кости (б).

а, б — нейросекреторные тельца разных размеров (стрелки). Окраска по Баргману в модификации Поленова. Об. 90, ок. 15

из-за избыточной реактивности приходится только на 7-е сутки, тогда как к этому сроку в области перелома уже отсутствуют признаки острого воспаления, резорбция костных отломков не выражена, уменьшается выброс медиаторов воспаления, и происходит торможение экстружии из НТ окситоцина и вазопрессина, что сопровождается

постепенным восстановлением их структурно-функционального состояния.

В гипоталамусе восстановительный процесс начинается только на 14-е сутки, результатом которого являются симметричные изменения в НГ — увеличение средней площади и ООП НТ. Однако на 21-е сутки в НГ происходят прямо

противоположные изменения, проявляющиеся незначительной депрессией ООП и средней площади НТ, отражающие слабовыраженный процесс истощения структурно-функциональных резервов НГ, что по срокам (14–21-е сутки) совпадает с активацией хондрокластов и хондролита хрящевой мозоли в области перелома, а значит активацией первичных медиаторов воспаления, что объясняет усиленную экструдицию нейросекрета из НТ и увеличение количества НСК гипоталамуса в состоянии активного синтеза и выведения [2]. При этом в гипоталамусе происходит уменьшение средней площади НСК, что, по-видимому, является проявлением адаптивной реакции. Данное предположение согласуется с результатами исследований ряда авторов [8], пишущих о том, что одними из больших проявлений адаптивных реакций являются резкое снижение в популяции количества клеток крупных размеров и увеличение эндокриноцитов средней величины.

Вычисление средних показателей ЯЯО позволило выявить его однонаправленное отклонение в исследуемых ядрах НСК по отношению к периодам активного воздействия повреждающего фактора, а именно, их возрастание, в 1-е (воздействие на организм перелома кости с развитием посттравматического острого воспаления — 1–3-и сутки) и на 21-е сутки (пик литической активности хондрокластов с массивным хондролитом хрящевой мозоли — 14–21-е сутки) наблюдения и уменьшение в последующих периодах. Из чего следует, что стимулы, активирующие компенсаторно-приспособительные потенции гипоталамуса, возникали именно на 1–3-и и 14–21-е сутки репаративного остеогенеза, что подтверждает превалирующую роль цитокинового пути активации ГГНС [6, 9, 10].

На 61-е сутки эксперимента происходит восстановление и стабилизация структур ГГНС с максимальным приближением к показателям в контроле, что по сроку совпадает с окончанием консолидации перелома кости и может расцениваться как завершающий этап компенсаторно-приспособительных реакций и восстановление нарушенного гомеостаза.

Итак, в ходе заживления перелома длинной трубчатой кости у крыс можно выделить 2 этапа стрессорной активации компенсаторно-приспособительных потенций ГГНС с соответствующими изменениями в их структурах: на 1–3-и сутки (воздействие на организм перелома кости с развитием посттравматического острого воспаления) и на 14–21-е сутки (пик литической активности хондрокластов с массивным хондролитом).

Таблица 2

Морфометрическая характеристика нейросекреторных клеток (НСК) супраоптических ядер (СОЯ) в разные сроки после перелома средней трети диафиза большеберцовой кости у крыс ($\bar{x} \pm \bar{s}$)

Исследованные показатели	Контроль	Сроки заживления перелома кости, сутки						
		1-е	3-и	7-е	14-е	21-е	28-е	61-е
ООП НСК в СОЯ, %	17,1±0,9	26,4±1,8*	25,9±1,7*	20,4±1,0*	27,3±1,8*	19,8±1,1*	22,0±1,1*	17,9±1,0
Площадь сечения НСК, мкм ²	98±4	108±5*	123±5*	77,8±2,3*	118±5*	75,4±1,9*	82±3*	93±4
яЯО НСК СОЯ	0,141±0,011	0,238±0,018*	0,171±0,014*	0,158±0,012	0,135±0,011	0,20±0,017*	0,183±0,016*	0,147±0,012

Примечание. Здесь и в табл. 3: ООП — относительная объемная плотность (соотношение площадей, занимаемых НСК СОЯ гипоталамуса в поле зрения гистологического среза, к общей площади лизированного поля зрения); ЯЯО — ядрышково-ядерное отношение.

Таблица 3

Морфометрическая характеристика нейросекреторных тел (НТ) нейрогипофиза (НГ) в разные сроки после перелома средней трети диафиза большеберцовой кости у крыс ($\bar{x} \pm \bar{s}$)

Исследованные показатели	Контроль	Сроки заживления перелома кости, сутки						
		1-е	3-и	7-е	14-е	21-е	28-е	61-е
ООП НТ НГ, %	17,4±1,1	14,8±0,9*	0,99±0,08*	8,8±0,6*	11,4±0,9*	10,1±0,7*	13,1±1,0*	17,8±1,1
Средняя площадь НТ НГ, мкм ²	4,9±0,3	1,77±0,13*	0,74±0,05*	2,14±0,16*	2,54±0,18*	1,79±0,13*	3,31±0,22*	5,6±0,4

лизом хрящевой мозоли). В начальном периоде репаративного остеогенеза имеются однонаправленные, но асинхронные изменения в гипоталамусе и НГ, сопровождающиеся «истощением» структурно-функциональных резервов НГ на 3-и, а гипоталамуса на 7-е сутки, что, по нашему мнению, связано с преобладанием скорости экстружии нейросекрета из НТ в просвет капилляров над синтезом нейросекрета в НСК. В связи с этим изменения морфометрических показателей НТ в НГ возникают раньше и выражены в большей степени, чем НСК в гипоталамусе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г., Волкова О.В., Гриневич В.В., Ресненко А.Б. Эволюционные аспекты стрессорной реакции // Вестн. РАМН. 2002. № 6. С. 24–27.
2. Месхидзе Е.Б. Гипоталамо-гипофизарная нейросекреторная система в условиях воспаления (экспериментально-морфологическое исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2008.
3. Подымов В.К. Методика выявления нейросекреторных включений в нервных клетках гипоталамуса // Суд.-мед. экспертиза. 1964. № 1. С. 12–15.
4. Поленов А.Л. Морфофункциональная организация нейросекреторных клеток гипоталамуса // Нейроэндокринология. СПб.: РАН, 1993. Ч. 1. С. 31–70.
5. Стадников А.А. Нейробиологические аспекты регуляции репаративных гистогенезов // Морфология. 1995. Т. 133, вып. 2. С. 16–19.
6. Стадников А.А. Роль гипоталамических нейропептидов во взаимодействиях про- и эукариот: структурно-функциональные аспекты. Екатеринбург: УрО РАН, 2001.
7. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Южаков В.В. и др. Пептидергическая регуляция гомеостаза. СПб.: Наука, 2003.
8. Шевлюк Н.Н., Стадников А.А., Боков Д.А. и др. Гипоталамо-гипофизарно-гонадная система млекопитающих при воздействии на организм дестабилизирующих факторов различной интенсивности // Вестн. ОГУ. 2007. № 78. С. 185–187.
9. Erickson M.A., Banks W.A. Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis // Brain Behav. Immun. 2011. Vol. 25, № 8. P. 1637–1648.
10. Jankord R., Zhang R., Flak J. N. et al. Stress activation of IL-6 neurons in the hypothalamus // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2010. Vol. 299, № 1. P. 343–351.

Поступила в редакцию 14.04.2017

Получена после доработки 13.06.2017

MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES OF THE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAL NEUROSECRETORY SYSTEM IN THE PROCESS OF REPARATIVE OSTEOGENESIS OF LONG TUBULAR BONES

*V.A.Mikhanov, V.S.Polyakova, Ye.I.Shurygina,
Ye.Ye.Mkhitarian, K.N.Meshcheryakov,
T.G.Kozhanova, N.R.Bakayeva*

The dynamics of structural and functional changes of the neurosecretory cells (NSC) of the hypothalamic supraoptic nuclei and of the neurohypophysis (NH) was examined on 35 Wistar rats at Days 1, 3, 7, 14, 21, 28 and 61 after the fracture of the middle third of the tibial diaphysis. Hypothalamic NSC, NH and the zone of bone fracture were studied using histological, histochemical and morphometric methods. During bone fracture healing, 2 stages of stress-induced activation of the hypothalamo-hypophyseal neurosecretory system were distinguished: at Days 1–3 (effects of bone fracture on the organism with the development of posttraumatic acute inflammation) and at Days 14–21 (a peak of lytic activity of chondroclasts with massive chondrolysis of cartilage callus). In the initial period of bone repair, hypothalamus and NH demonstrated unidirectional, but asynchronous changes, which were accompanied by «exhaustion» of structural and functional reserves of NH at Day 3, and those of the hypothalamus — at Day 7.

Key words: *hypothalamus, neurosecretory cells, neurohypophysis, bone repair*

Department of Pathological Anatomy, Orenburg State Medical University