

© Коллектив авторов, 2008
УДК 612.014:611.814.3:616.8-008.615

*М.Ю. Капитонова¹, С.Л. Кузнецов², В.В. Хлебников³, В.Л. Загребин³,
З.Ч. Морозова³ и Ю.В. Дегтярь*

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИПОФИЗА В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

¹ Медицинский факультет (декан — проф. Кхалид Юсофф) Университета технологии МАРА (г. Шах Алам, Малайзия); ² кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — чл.-кор. РАМН, проф. С.Л. Кузнецов) Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова; ³ кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — проф. М.Ю. Капитонова) Волгоградского государственного медицинского университета

С применением количественной иммуногистохимии произведена оценка особенностей активации гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы на уровне ее центрального звена — аденогипофиза — в растущем организме при хроническом действии психоэмоциональных стрессоров различной силы. Крыс линии Спрейг-Дули в возрасте 30 сут подвергали действию «мягкого» или «жесткого» иммобилизационного стресса на протяжении 7 сут ежедневно по 5 ч. По окончании последнего сеанса стресса животных декапитировали, эндокринные железы (гипофиз, надпочечники) извлекали, взвешивали, заливали в парафин; срезы окрашивали гематоксилином—эозином, а также иммуногистохимически моноклональными антителами к адренкортикотропному гормону (АКТГ) и ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) с последующим автоматическим анализом изображения. Исследование показало, что стресс-ассоциированная гиперплазия кортикотропоцитов у крыс перипубертатного возраста была в большей степени обусловлена дифференцировкой существующих незрелых клеток-предшественников, чем клеточной пролиферацией.

Ключевые слова: гипофиз, надпочечники, иммуногистохимия, хронический иммобилизационный стресс.

Ведущим механизмом стрессовой реакции организма является активация гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС) с развитием широкого спектра физиологических последствий, включающих усиление выделения кортикостероидов и подавление иммунных функций; при этом центральную роль в работе ГГАС, активируемой во время стресса, играет адренкортикотропный гормон (АКТГ) [1, 4, 13, 15]. Стресс воздействует на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось (ГГНО) путем активации нейросекреторных клеток мелкоклеточной фракции паравентрикулярного ядра гипоталамуса, секретирующего кортикотропин-рилизинг-фактор, который, попадая в портальную систему гипофиза, стимулирует выработку кортикотропоцитами аденогипофиза АКТГ, в свою очередь стимулирующего выработку кортикостерона в коре надпочечников [11, 18, 19]. Особое значение для организма имеет стресс, перенесенный на ранних стадиях онтогенеза и оказывающий существенное влияние на состояние здоровья на протяжении всей жизни. Перенесенный в грудном периоде, он способен изменять все последующие стрессовые реакции, вплоть до глубокой старости [6, 17]. В этой связи особенно актуальным представляется изучение особенностей стресс-ассоциированной активации компонентов ГГАС на ранних этапах постнатального онтогенеза, до сих пор не получивших адекватного отражения в литературе.

Информация о влиянии различных видов стресса на нейроэндокринную систему растущего организма остается ограниченной и противоречивой [9, 14]. В связи с этим целью настоящего исследования — выявление фенотипически определенных параметров активации ГГАС на уровне ее центрального звена — аденогипофиза — в препубертатном возрасте при хроническом действии психоэмоциональных стрессоров различной силы.

Материал и методы. Исследование выполнено на 48 крысах Спрейг-Дули в возрасте 30 сут, которые были разделены на 3 группы по 16 особей в каждой: 1-я группа — контрольная, 2-я и 3-я группы — экспериментальные. Животных содержали в стандартных виварных условиях при температуре 20±2 °С с доступом к воде и пище *ad libitum*. Крыс 2-й группы ежедневно на протяжении 7 сут по 5 ч в день подвергали действию хронического «мягкого» иммобилизационного стресса, моделируемого помещением в перфорированный пластиковый пенал меняющегося объема с раздвижными входами [20]. Животные 3-й группы испытывали действие «жесткого» иммобилизационного стресса путем иммобилизации на доске с растянутыми конечностями [8]. Крыс 1-й группы содержали в отдельном помещении вне аудиовизуального контакта с экспериментальными животными. По окончании последнего экспериментального воздействия животных под анестезией декапитировали, у них извлекали и взвешивали эндокринные железы (гипофиз и правый надпочечник как наиболее подверженный постстрессовым реакциям [5]).

Парафиновые срезы гипофиза, фиксированного формалином, окрашивали гематоксилином—эозином. Срезы гипофиза каждого 2-го произвольно отобранного блока каждой группы

Динамика массы тела и некоторых относительных органомерических параметров эндокринной системы крыс в норме и при хроническом стрессе ($\bar{x} \pm s_x$)

Группа крыс	Масса тела, г	Относительная масса гипофиза, ‰	Относительная масса надпочечника, ‰
Контрольная (1-я)	77,1±2,7	0,05±0,01	0,11±0,01
«Мягкий стресс» (2-я)	71±3	0,07±0,01	0,14±0,01*
«Жесткий стресс» (3-я)	67,4±2,7*	0,11±0,01***	0,16±0,01**

* Различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0,05$.

** При $P < 0,01$.

*** При $P < 0,001$.

животных дополнительно окрашивали иммуногистохимически моноклональными антителами против АКТИГ (клон 02А3, синтетический иммуноген, конъюгированный с IgG цыпленка) — маркера кортикотропических (ДАКО, М3501, Дания) и PCNA (клон PC10) — ядерного антигена пролиферирующих клеток (Serotec, США, MCA1558). Окрашивание проводили стрептавидин-биотин-пероксидазным методом с подавлением эндогенной пероксидазы, обработкой блокирующей неиммунной сывороткой для предотвращения фонового окрашивания, высвобождением эпитопов антигенов (кроме окрашивания на PCNA) по стандартным методикам [12] в соответствии с рекомендациями производителей химерагентов.

Для оценки удельной площади и численной плотности иммунореактивных клеток был применен цифровой автоматический анализ изображения с помощью программы Image-Pro+, сопряженной с программой Excel, проводили также корреляционный анализ для вариационно-статистической обработки данных с определением средней арифметической, среднеквадратического отклонения, ошибки репрезентативности, значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования. Обнаружено, что хронический стресс существенно влияет на динамику как массы тела, так и на массу эндокринных желез (гипофиза и надпочечника), а также на относительную массу последних, которая в условиях возрастного увеличения массы тела позволяет выявить истинную гипертрофию органов, не связанную с общим увеличением абсолютных органомерических параметров внутренних органов (таблица).

Масса тела снижалась у животных 2-й экспериментальной группы не значимо по сравнению с таковой у контрольной группы, и лишь в 3-й группе это снижение достигало уровня значимости. Гипертрофия гипофиза имела место в обеих экспериментальных группах при оценке абсолютной массы железы, в то время как при оценке относительной массы ее увеличение по сравнению с таковой в контрольной группе было значимо лишь в 3-й экспериментальной группе.

Напротив, истинная гипертрофия надпочечников по оценке относительного показателя их массы отмечалась в обеих экспериментальных

группах (см. таблицу), в то время как абсолютная масса органа значимо увеличивалась по сравнению с таковой в контрольной группе только в 3-й экспериментальной группе.

Анализ гистологических срезов гипофиза контрольных животных показал, что в нем отчетливо контурировались передняя и задняя доли, разделенные промежуточной долей (рис. 1, а). В аденогипофизе были различимы хромофильные и хромофобные эндокриноциты, последние располагались мелкими группами, их ядра находились очень близко друг от друга. На долю этих клеток приходилось менее половины всех аденоцитов. Среди хромофильных эндокриноцитов преобладали ацидофильные, расположенные главным образом по ходу кровеносных сосудов. Базофильные эндокриноциты — самые большие среди аденоцитов, они имели округлую или треугольную форму, их ядра крупнее и светлее, чем ядра ацидофильных, с 1–2 ядрышками, цитоплазма иногда выглядела пенистой.

После «мягкого» хронического стресса в аденогипофизе крыс отмечалось расширение и полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, имели место некоторая гипертрофия и гиперплазия базофильных эндокриноцитов, более выраженные в «базофильном клине», чем в «латеральных крыльях»¹ передней доли гипофиза.

После «жесткого» иммобилизационного стресса изменения в аденогипофизе значительно отличались от тех, что выявлялись при «мягком стрессе». Наряду с прогрессирующими микроциркуляторными нарушениями, у животных отмечали гипертрофию и гиперплазию базофильных эндокриноцитов, имело место формирование псевдофолликулов и микрокист, заполненных гомогенным или пенистым содержимым, причем микрокисты и псевдофолликулы встречались одинаково часто как в «базофильном клине» аденогипофиза, так и в его «латеральных крыльях» (см. рис. 1, б).

¹ Авторы используют не номенклатурные термины, но встречающиеся как в отечественной, так и иностранной литературе [3].

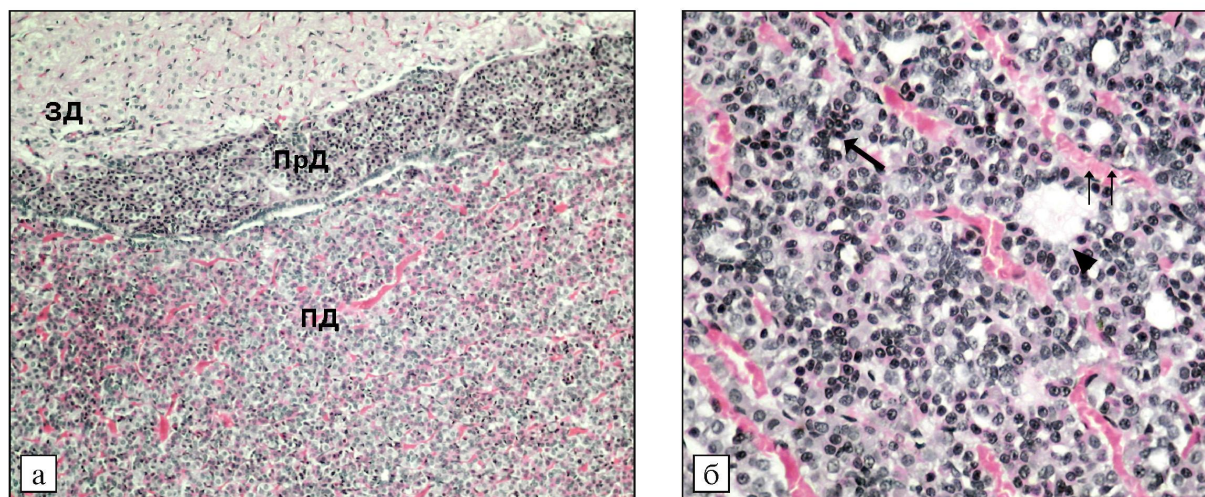


Рис. 1. Гипофиз 36-дневных контрольных крыс (а) и крыс, подвергавшихся действию «жесткого» иммобилизационного стресса (б).

а — общий вид гипофиза; б — гнездная гиперплазия аденоцитов (стрелка), многочисленные кисты (наконечник стрелки) и псевдофолликулы (две стрелки). Полнокровные кровеносные капилляры. ПД — передняя доля; ПрД — промежуточная доля; ЗД — задняя доля. Гематоксилин—эозин. Ув.: а — 40; б — 100.

При иммуногистохимической реакции на АКТГ в передней доле гипофиза обнаружены многочисленные иммунореактивные клетки, образующие группы и лежащие поодиночке, несколько более густо расположенные в «латеральных крыльях», чем в центральной части передней доли гипофиза; по форме они чаще всего треугольные или звездчатые с 2–3 тонкими отростками, встречались также клетки веретенообразной или округлой формы (рис. 2, а).

При реакции на PCNA выявляется ядерный антиген пролиферирующих клеток, поэтому окрашенными в клетках аденогипофиза оказываются лишь ядра. Концентрация иммунопозитивных клеток (см. рис. 2, б) несколько выше по периферии «латеральных крыльев», чем в центральной части pars distalis. При «мягком» хроническом иммобилизационном стрессе реакция на АКТГ в аденогипофизе выявила увеличение количества и гипертрофию иммунореактивных клеток по сравнению с возрастным контролем. Имело место изменение контуров клеток: они становились более ровными, придавая клеткам почти правильную округлую или овальную форму, отростки клеток становились короче и толще. Степень гипертрофии иммунореактивных аденоцитов и их относительное содержание были выше в группе животных, подвергнутых «жесткому» иммобилизационному стрессу. При «мягком» иммобилизационном стрессе число конгломератов клеток и количество клеток в конгломератах было ниже, чем при «жестком» стрессе (см. рис. 2, а, в). Реакция на PCNA выявила значительное увеличение числа иммунопозитивных аденоцитов при мягком стрессе

по сравнению с возрастным контролем (см. рис. 2, б, г), причем участки гиперплазии иммунореактивных клеток в основном локализовались в «латеральных крыльях» передней доли гипофиза, в то время как при «жестком» стрессе уровень пролиферации аденоцитов был подвержен меньшим изменениям, чем при «мягком» стрессе.

Таким образом, иммуногистохимическая оценка аденокортикотропоцитов при «мягком» и «жестком» хроническом стрессе позволяет проследить зависимость уровня эндокринных изменений от характеристик стрессора и предсказать возможную динамику адаптационных изменений ГГАС растущего организма. Более точная характеристика адаптационных изменений в гипофизе была получена при цифровом анализе иммуногистохимических параметров аденогипофиза при различных видах стресса с определением удельной площади иммунореактивных клеток. Оценивали и численную плотность клеток, однако оба параметра дали сходные результаты в силу особенностей клеточного состава аденогипофиза. Установлено, что при хроническом стрессе удельная площадь АКТГ-позитивных клеток значительно возрастает в обеих экспериментальных группах, причем во 2-й группе — более чем в 1,5 раза, а в 3-й группе — почти в 2 раза. Между экспериментальными группами различия по указанному показателю были не значимы (рис. 3).

Для того, чтобы выяснить, связано ли отмеченное увеличение удельной площади кортикотропоцитов, наряду с усиленной дифференцировкой клеток, также с измененным уровнем пролиферации аденоцитов, мы произвели количественное

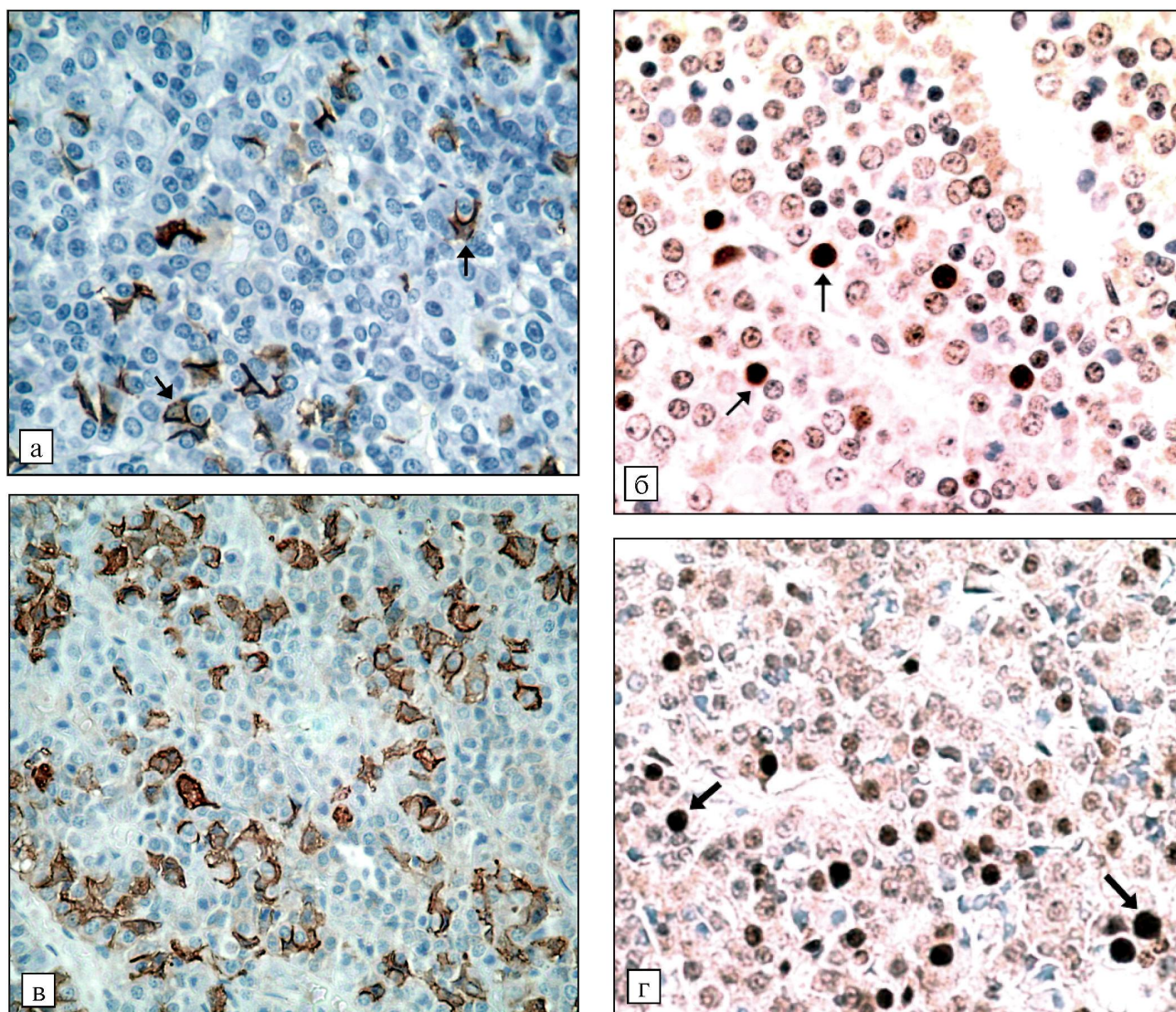


Рис. 2. Гипофиз 36-дневных контрольных крыс (а, б) и крыс, подвергшихся действию «жесткого» (в) и «мягкого» (г) иммобилизационного стресса.

а — АКТГ-позитивные аденоциты, располагающиеся поодиночке и образующие немногочисленные группы (стрелки); б — РСНА-позитивные аденоциты (стрелки) немногочисленны, имеют ярко окрашенное ядро; в — АКТГ-позитивные аденоциты округлой или полигональной формы образуют скопления; г — РСНА-позитивные аденоциты (стрелки) равномерно распределены по «латеральным крыльям» аденогипофиза. а, в — иммуногистохимическая реакция на аденокортикотропный гормон (АКТГ); б, г — реакция на ядерный антиген пролиферирующих клеток (РСНА). Ув.: а — 200; б, г — 400; в — 100.

определение уровня экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток — РСНА на серийных срезах гипофиза. При «мягком» стрессе было отмечено значимое увеличение экспрессии маркера пролиферации аденоцитами, причем оно было больше, чем при «жестком» стрессе, при котором величина удельной площади иммунореактивных ядер не достигала уровня значимости различий по сравнению с возрастным контролем (см. рис. 3). Таким образом, сравнение динамики иммуногистохимических изменений в аденогипофизе при различных видах хронического психоэмоционального (иммобилизационного) стресса показало, что параллелизм между меняющимися при «мягком» и «жестком» стрессе показателями экспрессии

маркеров АКТГ и РСНА отсутствует. Если при «мягком» стрессе имеет место сопоставимый рост показателей удельной площади АКТГ- и РСНА-иммунореактивных клеток, то при «жестком» стрессе на фоне еще более возрастающей гиперплазии кортикотропоцитов уровень роста пролиферативной активности аденоцитов оказывается ниже, чем при «мягком» стрессе. Это позволяет сделать заключение, что механизмы гиперплазии кортикотропоцитов при активации ГГАС различаются при разных видах стресса, при этом при «жестком» стрессе она оказывается в большей степени связанной с дифференцировкой аденоцитов, а не их пролиферацией.

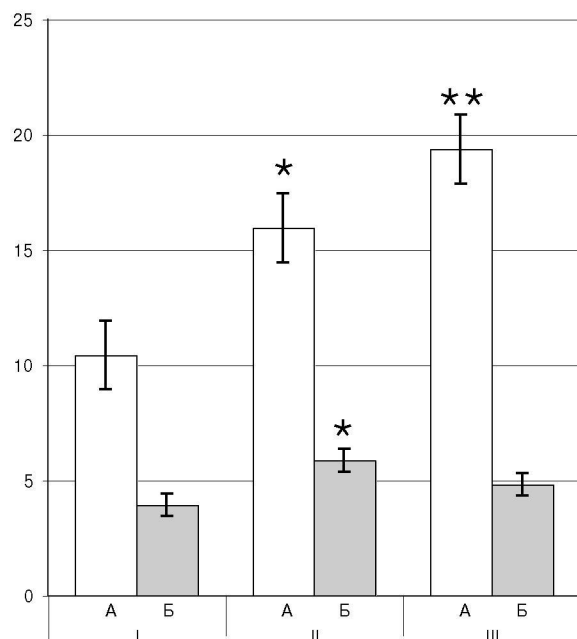


Рис. 3. Удельная площадь иммунореактивных аденоцитов гипофиза крыс в норме и при хроническом стрессе.

По оси абсцисс: I — контроль (1-я группа); II — крысы, подвергшиеся действию «мягкого» иммобилизационного стресса (ИС) (2-я группа); III — крысы, подвергшиеся действию «жесткого» ИС (3-я группа); А — АКТГ-иммунореактивные аденоциты; Б — PCNA-иммунореактивные аденоциты; по оси ординат — удельная площадь (%); различия по сравнению с контролем значимы: одна звездочка — при $P < 0,05$; две звездочки — при $P < 0,001$; вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

Корреляционный анализ изменений в аденогипофизе и надпочечниках при хроническом иммобилизационном стрессе выявил наличие значимой положительной корреляционной связи между удельной площадью АКТГ-позитивных клеток при «жестком» иммобилизационном стрессе и степенью гипертрофии надпочечников ($r=0,72$; $P < 0,05$). Определение корреляционной зависимости между степенью гипертрофии гипофиза и уровнем экспрессии АКТГ и PCNA аденоцитами pars distalis показало, что между относительной массой гипофиза и PCNA-иммунореактивностью положительная корреляционная связь была слабой и незначимой. В то же время между степенью гипертрофии гипофиза и уровнем экспрессии АКТГ аденоцитами передней доли гипофиза имела место прямая значимая корреляционная связь ($r=0,77$; $P < 0,01$).

Обсуждение полученных данных. В литературе сохраняются противоречия в понимании значения каждого компонента ГТАС в адаптации всей системы к стрессовым воздействиям. Одни исследователи показывают, что содержание АКТГ в крови отражает силу стрессорного воздействия [16], другие — демонстрируют, что

повышение содержания АКТГ, независимо от силы и характера стресса, имеет краткосрочный и преходящий характер, в то время как содержание кортикостероидов повышается стойко и сохраняется на протяжении всего периода действия стрессора [7, 19]. Исследование, проведенное нами с применением цифрового иммуногистохимического анализа, показало, что в противоположность этому на ранних стадиях постнатального онтогенеза хроническое действие сильного стрессора определенной продолжительности не вызывает истощения резервных возможностей аденокортикотропоцитов, и даже к исходу 7-х суток от начала действия стрессора уровень экспрессии АКТГ кортикотропоцитами передней доли гипофиза сохраняется повышенным по сравнению с возрастным контролем, а это повышение пропорционально силе стрессового воздействия.

В настоящем исследовании нам было важно оценить, каков потенциал адаптации ГТАС на уровне аденогипофиза к действию хронического стресса при различной силе стрессорного воздействия. Наши данные не подтверждают наблюдений других исследователей, которые выявили угнетение пролиферации аденоцитов pars distalis при хроническом стрессе и связанным с ним увеличением концентрации кортикостероидов в крови [2, 10], а не ее усиление, как в наших экспериментах. Это несовпадение результатов может быть связано с различиями возраста животных, природы стрессорных раздражителей и методических подходов: в своем исследовании мы использовали не подсчет клеток в состоянии митоза, а определение удельной площади и численной плотности PCNA-иммунореактивных клеток, что является весьма чувствительным критерием реального пролиферативного потенциала клеток; кроме того, примененный нами имидж-анализ предполагает более высокую точность и воспроизводимость цифровых данных по сравнению с другими методами морфометрического исследования.

«Мягкий» иммобилизационный стресс, по нашим данным, вызывает большее увеличение пролиферативной активности аденоцитов. Это наблюдение свидетельствует о том, что существует определенный предел увеличения пролиферативной активности аденоцитов, и при действии стрессоров избыточной силы наступает своеобразное истощение пролиферативного потенциала клеток.

Итак, адаптационные изменения в аденогипофизе крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза проявляются гипертрофией гипофиза, связанной с гипертрофией и гиперплазией кортикотропоцитов, уровень которых связан с силой

стрессорного воздействия. По данным количественного иммуногистохимического исследования, стресс-индуцированная гиперплазия кортикотропоцитов у крыс перипубертатного возраста в большей степени связана с дифференцировкой существующих незрелых клеток-предшественников и в меньшей степени — с клеточной пролиферацией. В перипубертатном возрасте у крыс существует сильная положительная значимая корреляционная связь между уровнем экспрессии АКТГ в аденогипофизе и степенью гипертрофии надпочечников.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г., Волкова О.В., Гриневич В.В. и Ресненко А.Б. Эволюционные аспекты стрессорной реакции. Вестн. Росс. акад. мед. наук, 2002, № 6, с. 24–27.
2. Перт В.К. Суточные и сезонные изменения пролиферативной активности в органах гипофиз-адреналовой системы в норме и при формалиновом стрессе: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Тарту, 1990.
3. Пурсанов А.А. Морфофункциональные эквиваленты реакции аденогипофиза на ограничение двигательной активности. Арх. анат., 1985, т. 84, вып. 10, с. 83–88.
4. Судаков К.В. Новые акценты классической концепции стресса. Бюл. exper. биол., 1997, т. 123, № 2, с. 124–130.
5. Шалыпина В.Г., Бедров Я.А., Ордян Н.Э. и др. Характеристика основных параметров гормональной функции коры надпочечников и ее модификация в онтогенезе у крыс. Журн. эволюц. биохим., 2001, т. 37, № 2, с. 134–138.
6. Dent G.W., Smith M.A. and Levine S.B. The ontogeny of the neuroendocrine response to endotoxin. Brain Res. Dev. Brain Res., 1999, v. 117, № 1, p. 21–29.
7. Jasnow A.M., Drazen D.L., Huhman K.L. et al. Acute and chronic social defeat suppresses humoral immunity of male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). Horm. Behav., 2001, v. 40, № 3, p. 428–433.
8. Kvetnansky R. and Mikulaj L. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. Endocrinology, 1970, v. 87, № 4, p. 738–743.
9. Lehmann J., Russig H., Feldon J. and Pryce C.R. Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. Pharmacol. Biochem. Behav., 2002, v. 73, № 1, p. 141–145.
10. Nolan L.A., Thomas C.K. and Levy A. Enhanced anterior pituitary mitotic response to adrenalectomy after multiple glucocorticoid exposures. Eur. J. Endocrinol., 2003, v. 149, № 2, p. 153–160.
11. Martí O., Harbuz M.S., Andrés R. et al. Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomised rats: potentiation by chronic stress. Brain Res., 1999, v. 821, p. 1–7.
12. Polak J.M. and Van Noorden S. Introduction to immunohistochemistry, 3rd edition, Oxford, Bios Scientific Publishers, 2003.
13. Sanchez M.M., Aguado F., Sanchez-Toscano F. and Saphier D. Neuroendocrine and immunocytochemical demonstrations of decreased hypothalamo-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation. Endocrinology, 1998, v. 139, № 2, p. 579–587.
14. Severino G.S., Fossati I.A., Padoin M.J. et al. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of female. Physiol. Behav., 2004, v. 81, № 3, p. 489–498.
15. Tafet G.E. and Smolovich J. Psychoneuroendocrinological studies on chronic stress and depression. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2004, № 1032, p. 276–278.
16. Tan Z. and Nagata S. PVN c-fos expression, HPA axis response and immune cell distribution during restraint stress. J. Y. Univ. Occup. Environ. Health, 2002, v. 24, № 2, p. 131–149.
17. Van Voorhees E. and Scarpa A. The effects of child maltreatment on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Trauma Violence Abuse, 2004, v. 5, № 4, p. 333–352.
18. Viau V. and Sawchenko P.E. Hypophysiotropic neurons of the paraventricular nucleus respond in spatially, temporally, and phenotypically differentiated manners to acute vs. repeated restraint stress. J. Comp. Neurol., 2002, v. 445, № 4, p. 293–307.
19. Viveros-Paredes J.M., Puebla-Perez A.M., Gutierrez-Coronado O. et al. Dysregulation of the Th1/Th2 cytokine profile is associated with immunosuppression induced by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in mice. Int. Immunopharmacol., 2006, v. 6, № 5, p. 774–781.
20. Wang J., Charboneau R., Barke R.A. et al. Mu-opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. J. Immunol., 2002, v. 169, № 7, p. 3630–3636.

Поступила в редакцию 07.11.07
Получена после доработки 27.01.08

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE HYPOPHYSIS UNDER NORMAL AND STRESS-ASSOCIATED CONDITIONS

*M.Yu. Kapitonova, S.L. Kuznetsov, V.V. Khlebnikov,
V.L. Zagrebin, Z.Ch. Morozova and Yu.V. Degtyar*

Quantitative immunohistochemical investigation was undertaken to detect the peculiarities of the activation of the hypothalamic-hypophyseal-adrenocortical system at the level of its central unit – the adenohypophysis – in the growing organism under the conditions of chronic exposure to psycho-emotional stressors of varying intensities. Sprague-Dawley rats aged 30 days were exposed to either «mild» or «severe» chronic restraint stress for 5 hours during seven consecutive days. After the last exposure to stress, rats were decapitated, the endocrine glands (pituitary and adrenal glands) were removed, weighed, and embedded in paraffin; histological sections were stained with hematoxylin and eosin. Sections of hypophysis were also stained immunohistochemically using the monoclonal antibodies against adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) with subsequent image analysis. The results of the study suggest that the stress-related hyperplasia of corticotropocytes in the hypophyseal pars distalis of the peripubertal rats was mainly associated with differentiation of the immature precursor cells of the hypophysis rather than with the increased cell proliferation.

Key words: *hypophysis, adrenal glands, immunohistochemistry, chronic restraint stress.*

Medical Faculty of the of the International Technological University (UiTM), Shah Alam, Malaysia; Department of Histology, Embryology and Cytology, Moscow I.M. Sechenov Medical Academy; Department of Histology, Embryology and Cytology, Volgograd State Medical University.