

**В.М.Запорожан
О.Л.Холодкова
Д.М.Пихтєєв
А.Л.Щербатюк**

Одеський державний
медичний університет

Ключові слова: нітрит натрію, адрибластин, миші, морфометрія, гіпоталамус.

Надійшла: 25.08.2009

Прийнята: 28.09.2009

УДК: 616.5:001.26:591.4

МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ СУПРАОПТИЧНОГО ТА АРКУАТНОГО ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ЗА УМОВ ВПЛИВУ ШКІДЛИВИХ ЧИННИКІВ

Дослідження проведено у рамках науково-дослідної роботи «Структурно-функціональні особливості статевої системи експериментальних тварин при дії деяких зовнішніх факторів» (держреєстрація № 0105U008885).

Резюме. В статті описаний вплив нітриту натрію та адрибластину на морфофункціональний стан гіпоталамусу самців та самок мишей лінії ICR. Виявлено, що в досліджуваних ядрах експериментальних груп переважають нейрони, що знаходяться у фазі спокою, тоді як в контролі – у фазі накопичення нейросекрету. Індекс секреторної активності нейронів у експериментальних мишей знижувався порівняно з контролем, при чому в групах, яким був введений адрибластин, він знижувався в більшому ступені. Також спостерігалось більш повільне зниження активності нейронів у самок експериментальних тварин порівняно з самцями. Висунуте припущення, що зменшення активності нейронів експериментальних тварин обумовлене виснаженням внаслідок нейро-медіаторної дії адрибластину та нітриту натрію.

Морфологія. – 2009. – Т. III, № 3. – С. 55-59.

© В.М.Запорожан, О.Л.Холодкова, Д.М.Пихтєєв, А.Л.Щербатюк, 2009

Zapozozhan V.M., Holodkova O.L., Pichteyev D.M. Morphometrical indexes of supraoptic and arcuate nucleus of hypothalamus of experimental animals under harmful factors influence.

Summary. Influence of adriblastin and sodium nitrite on morphofunctional state of hypothalamus of male and female mice of ICR line is described in this article. It was observed that neurons in resting phase were prevalent in investigated nuclei of the experimental groups whereas neurons in neurosecret accumulatory phase were prevalent in the control. Index of neurosecretory activity decreased in the experimental mice comparatively to the control, thus in groups which were injected with adriblastin it decreased to a greater degree. In female experimental groups neurosecretory activity decreased more slowly than in male. It is made an assumption that neurosecretory activity decrease of experimental group is conditional on exhaustion in consequence of neuromediator effect of adriblastin and sodium nitrite.

Key words: sodium nitrite, adriblastin, mice, morphometry, hypothalamus.

Вступ

Технічний та промисловий прогрес призводить до того, що на людину оказують шкідливий вплив велика кількість зовнішніх чинників, що надходять до організму з їжею, водою та повітрям. Тому виникає необхідність детального вивчення даної проблеми, оскільки екзогенні хімічні речовини призводять до дестабілізації генофондів популяцій (Куринний А.Т., Масник Л.И., 1987). Це може мати непередбачені наслідки і відобразитися на тривалості життя, загальній реактивності, життєздатності – параметрах, що знаходяться під генетичним контролем. Великий інтерес викликає вивчення чутливості репродуктивної функції, особливо на гормональному рівні, до подразників оточуючого середовища.

Важливо при цьому звернути увагу на стан гіпоталамусу, адже нейроендокринна система відіграє ключову роль у регуляції фундаменталь-

них процесів життєдіяльності організму, регуляції гомеостазу та репродуктивної функції.

Доцільним є вивчення процесів синтезу і виведення нейросекрету в гіпоталамусі, обравши у якості об'єктів дослідження супраоптичне ядро (СОЯ) та аркуатне ядро (АЯ), що секретують гонадотропні релізінг-гормони, а також вазопресин і окситоцин.

Функціональний стан центральної нервової системи пов'язаний з вмістом та співвідношенням в ній нейронів основних структурно-функціональних типів, кожен з яких відповідає визначній фазі циклу нейросекреції: I тип – у фазі спокою після виведення нейросекрету; II тип – у фазі синтезу нейросекреторної речовини; III тип – у фазі накопичення нейросекрету; IV тип – у фазі виведення нейросекрету; V тип – нейрони, що дегенерують. Дані типи нейронів ядер гіпоталамуса добре описані в літературі. Їх

функціональність типова як електрофізіологічними, так і імуногістохімічними методами (Кнорре З.Д. і соавт., 1969; Andrew D., Dudek E., 1984; Насибуллин Б.А., 1991).

Для з'ясування універсальності проявів токсичного ураження при дії факторів різного походження в якості токсикантів ми обрали нітрит натрію та антибіотик адрибластин.

Нітрит натрію являється екзогенним донатором NO, який широко розповсюджений у докільці і надходячи до організму в надмірних кількостях може оказувати і виражену токсичну дію. Пошкоджуюча дія NO є результатом утворення потужного окислювального агенту – пероксинітриту, що виникає в реакції NO^o з активною формою кисню – аніоном супероксиду (O₂^{o-}) (Ванин А.Ф., 1988). Пероксинітрит здатний окислювати SH-групи, ініціювати перекисне окислення ліпідів і пошкоджувати ДНК, а при розпаданні може продукувати інші агресивні оксиданти, як, наприклад, радикал гідроксилу – OH^o (Тэйлор Б.С. і соавт., 1998).

Антибіотик адрибластин має виразні протипухлинні властивості і широко застосовується в онкології. Показано, що останній швидко проникає в клітини пухлини, взаємодіє з молекулою ДНК, порушує синтез нуклеїнових кислот, гальмує мітотичну активність клітин, сприяє утворенню хромосомних аберацій і є імуносупресором (Машковский М.Д., 2000).

Виходячи з наведеного, **метою** нашої роботи стало морфометричне дослідження активності нейросекреції в СОЯ та АЯ гіпоталамусу на тлі впливу нітриту натрію та адрибластину.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на статевозрілих мишах лінії ICR. 10 інтактних самців склали I групу і 10 інтактних самок – II групу. Розчин нітриту натрію вводили 15 самцям (III група) та 15 самкам (IV група) шляхом примусового спавання в концентрації – 0,3 % протягом 10 діб. Адрибластин вводили 15 самцям (V група) та 15 самкам (VI група) внутрішньоочеревинно в сумарній дозі 4 мг/кг дворазово з інтервалом в 7 діб. Виводили тварин з експерименту під легким ефірним наркозом на наступний день від останнього введення токсичного агенту. Після декапітації швидко вилучали головний мозок, поміщали у фіксатор, який являв собою 2,5 % розчин глутаральдегіду. Після добової фіксації робили фронтальні зрізи на рівні хіазми, латеральні зоревих трактів, проводили через спирти зростаючої концентрації і занурювали в низькотемпературну високопластичну безосадкову восково-парафінову суміш. З отриманих блоків виготовляли зрізи завтовшки 3-5 мкм, забарвлювали гематоксиліном-еозином та тіоніном за Нисслем (Тараканов Е.И., 1968). Для виявлення нейросекреторних гранул в нервових клітинах СОЯ та АЯ переднього гіпоталамусу використовували аль-

дегід-фуксиновий метод Гоморі з попереднім окисленням кислим розчином перманганату калія (Щегельська О.А. і др., 2004). Структурні зміни в сенсомоторній корі оцінювали за даними світлової мікроскопії.

Застосовуючи стандартну морфометричну сітку ми підраховували кількість нейронів кожного морфо-функціонального типу в 10-15 полях одного препарату, потім обчислювали відносний вміст нейронів кожного типу.

З метою виявлення стану СОЯ та АЯ гіпоталамусу був введений інтегральний індекс активності I_a, який обчислювали за формулою:

$$I_a = \frac{\text{II тип} + \text{III тип} + \text{IV тип}}{\text{I тип} + \text{V тип}}$$

де II тип, III тип, IV типи - клітини, що секретують, а I тип, V тип - клітини у спокої або ті, що дегенерують.

Результати та їх обговорення

Морфо-функціональні типи нейронів в СОЯ та АЯ гіпоталамусу тварин I і II груп мали наступні структурні ознаки.

Нейросекретуючі клітини I морфо-функціонального типу в СОЯ та АЯ гіпоталамусу характеризувалися найбільшими розмірами тіла, ядра та ядерця, містили поодинокі зерна нейросекрету в цитоплазмі або не мали взагалі. Тіло клітин округле, цитоплазма світла. Часто зустрічалися клітини з кількома ядерцями.

Нейрони II морфо-функціонального типу знаходились в стадії синтезу нейросекреторної речовини, містили невелику кількість зерен, були дещо меншими ніж клітини I типу, часто витягнутої форми з нормохромною цитоплазмою, крупним нормохромним ядром, яке містило одне чи кілька ядерць.

Нейрони III морфо-функціонального типу знаходились в стадії накопичення нейросекрету або являли собою клітини зі зниженою активністю виведення нейросекрету; були наповнені зернами нейросекрету; мали невеликі ядра, нормохромні, зсунені до периферії; ядерця крупні, гіперхромні.

Нейрони IV морфо-функціонального типу знаходились у фазі виведення нейросекрету, мали витягнуту фібробластоподібну форму з центрально розташованим нормохромним ядром витягнутої овальної форми.

Нейрони V морфо-функціонального типу поліморфні з ознаками каріорексису, каріолізису, заходились у фазі дегенерації.

Структурні характеристики морфо-функціональних типів нейронів експериментальних груп принципово не відрізнялись від контролю, за виключенням того, що в них були дещо зменшені ядра, що може вказувати на зниження синтетичної активності. Патологічних змін досліджуваної ділянки нервової тканини в експериментальних групах не виявлено.

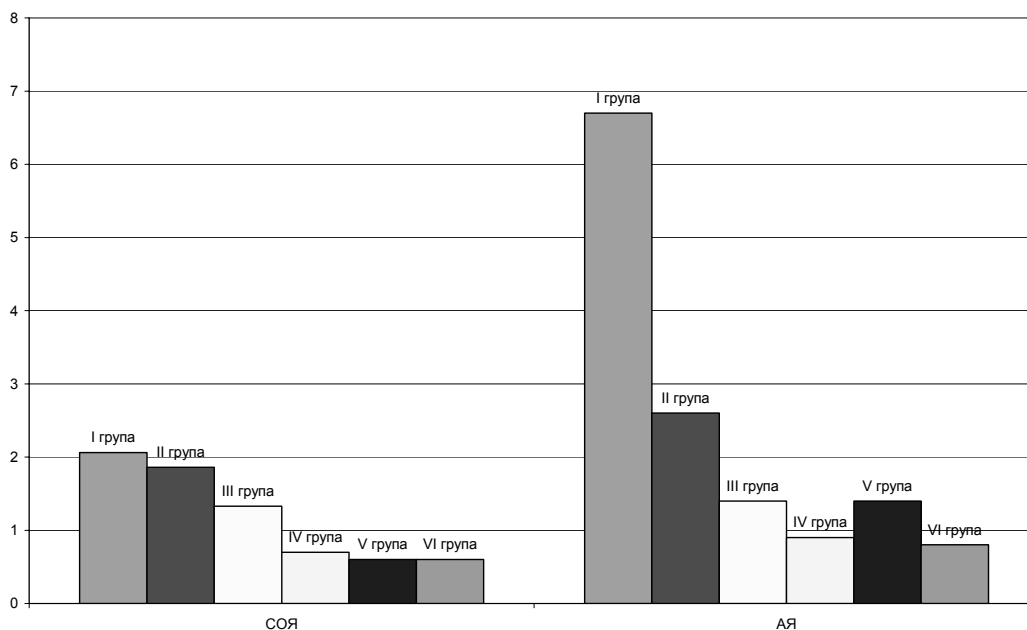


Рис. 1. Індекс секреторної активності нейронів (I_a) СОЯ і АЯ гіпоталамуса експериментальних тварин.

В результаті морфометричних досліджень виявили, що у самців I групи СОЯ та АЯ переважну більшість становлять нейрони II морфо-функціонального типу (табл. 1). I_a становив для СОЯ – 2,06, для АЯ – 6,7 (рис. 1).

Морфометричне дослідження вмісту нейро-

нів в СОЯ і АЯ гіпоталамуса самок II групи показало, що у найбільшій кількості в цій зоні також виявлялися нейрони II морфо-функціонального типу. I_a становив для СОЯ – 1,86, і для АЯ – 2,6.

Таблиця 1
Середній вміст нейросекреторних клітин в СОЯ та АЯ гіпоталамуса експериментальних тварин (%)

Група	СОЯ					АЯ				
	Вміст нейронів кожного типу									
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
I	27,79 ± 0,46	48,76 ± 0,70	13,42 ± 0,75	5,24 ± 0,36	4,91 ± 0,48	7,70 ± 0,46	54,20 ± 0,99	18,30 ± 0,98	14,51 ± 0,86	5,30 ± 0,44
II	32,55 ± 0,65	51,05 ± 0,64	11,07 ± 0,74	3,00 ± 0,30	2,52 ± 0,27	23,15 ± 0,74	48,06 ± 0,85	12,98 ± 1,01	11,25 ± 0,99	4,56 ± 0,66
III	36,83 ± 0,97*	37,92 ± 0,87*	8,32 ± 0,41*	10,92 ± 0,39*	6,12 ± 0,23*	16,63 ± 0,76*	32,31 ± 0,95*	19,91 ± 0,65	6,83 ± 0,54*	24,40 ± 0,90*
IV	53,72 ± 0,91*	31,74 ± 0,79*	6,82 ± 0,47*	3,42 ± 0,31	4,40 ± 0,28*	43,73 ± 0,91*	27,72 ± 0,80*	16,84 ± 0,62*	3,62 ± 0,33*	8,20 ± 0,23*
V	56,33 ± 0,65*	30,70 ± 0,57*	2,11 ± 0,13*	3,41 ± 0,18*	7,50 ± 0,26*	35,73 ± 0,67*	29,40 ± 0,59*	15,32 ± 0,40*	12,84 ± 0,46*	6,84 ± 0,29*
VI	54,82 ± 0,91*	27,11 ± 1,06*	7,31 ± 0,81*	2,40 ± 0,23	8,44 ± 0,35*	41,67 ± 1,00*	25,78 ± 0,70*	14,81 ± 0,44*	3,74 ± 0,23*	14,30 ± 0,42*

Примітка: * - різниця вірогідна по відношенню до контролю.

Незважаючи на те, що у самців III групи також у найбільшій кількості присутні нейрони II морфо-функціонального типу, I_a значно зменшувався і становив для СОЯ – 1,33, для АЯ – 1,4, що на 35,44 та 79,1 % відповідно нижче за показники тварин I групи.

У самок IV групи стан нейронів СОЯ та АЯ гіпоталамуса змінився більш суттєво – перева-

жали нейрони I морфо-функціонального типу; I_a становив для СОЯ – 0,7, для АЯ – 0,9, що складає 37,63 та 34,62 % відповідно по відношенню до контролю.

У тварин V групи був переважний вміст нейронів I типу. I_a становив для СОЯ – 0,6, для АЯ – 1,4, що становить 29,13 та 20,9 % відповідно у порівнянні з інтактною групою.

У тварин VI групи був переважний вміст нейронів I типу. I_a становив для СОЯ – 0,6, для АЯ – 0,8, що становить 32,23 та 30,77 % відповідно від рівня інтактної групи.

Таким чином, виявляється, що в СОЯ та АЯ гіпоталамусу інтактних самок та самців присутні переважно нейрони, які активно синтезують нейросекрет. Тоді як в гіпоталамусі експериментальних тварин – нейрони досліджуваних ядер знаходяться переважно у фазі функціонального спокою.

У всіх групах тварин, що підлягали введенню токсикантів, відбулася зміна функціональної активності нейронів СОЯ та АЯ. Так, I_a достовірно знизився в цих групах, при чому у тварин, що їм був введений адрибластин, I_a нижчий за групи, які отримували NaNO_2 . Так, у тварин V групи I_a СОЯ в 2,2 рази менший за I_a СОЯ III групи, I_a АЯ в цих групах однаковий. У тварин VI групи I_a СОЯ та АЯ на 14,3 % та 11,1 % менший за I_a СОЯ та АЯ IV групи. Таким чином, обидва токсичні агенти, що ми їх застосовували, призвели до зниження нейросекреторної функції досліджуваних ядер, при цьому адрибластин проявив більш токсичну дію на ЦНС порівняно з NaNO_2 . У інтактних самок I_a нижчий за I_a інтактних самців. Після введення як NaNO_2 , так і адрибластину I_a самок в порівнянні з контролем знизився менше ніж у самців. Тобто метаболічний баланс нейронів СОЯ та АЯ самок у відповідь на дію метаболітів токсичних речовин порушився в меншому ступені ніж у самців.

Імуногістохімічні та гістохімічні дослідження деяких авторів (Dorner G. et al., 1968; Думитру І. и соавт., 1981; Swanson Н.Н. et al., 1990; Гурін А.В., 1997) демонструють, що ядра гіпоталамусу містять велику кількість NO-синтезуючих клітин. Надлишкове надходження донаторів NO викликає інгібування окислювального фосфорилування в мітохондріях, розриву ДНК, інгібування ферментів циклу Кребса і утворення надзвичайно токсичних пероксинітритів (Dotella-Luisa J., 1973). Тож NO, маючи властивості вільного радикалу, стимулює нейротоксичний потенціал, що проявляється загибеллю частини нейронів, які секретують. В нашому експерименті це супроводжується зниженням індексу активності нейронів СОЯ та АЯ в III та IV групах тварин. Наслідком такого процесу стає дискоординація дій в гіпоталамо-гіпофізарно-гонадній системі.

Адрибластин відносять до сполук, що безпосередньо інгібують білковий синтез, порушують процеси транскрипції, пошкоджуючи матри-

цю, тобто ДНК. Під його впливом руйнуються ковалентні зв'язки поміж нуклеотидами і модифікуються їх функціональні групи за рахунок утворення комплексів, випадіння або розривів ділянок ланки ДНК. В нормальних тканинах токсичність адрибластину обумовлена утворенням активних форм кисню, зростання їх продукції призводить до зниження вмісту в клітинах відновленого глутатіону, зниженню внутрішньоклітинного окиснювально-відновного потенціалу, і, шляхом низки внутрішньоклітинних механізмів, запускає програму апоптозу клітини. На тлі загальнотоксичних перетворень розвиваються деструктивні зміни як в периферичних, так і в центральних відділах репродуктивної системи. Ядра гіпоталамусу, що є особливо чутливими до будь-яких змін гомеостазу, спочатку реагують підвищеною секреторною активністю, внаслідок чого в крові зростає вміст гонадотропних та інших гормонів, це, в свою чергу, викликає дискоординацію роботи гіпоталамо-гіпофізарної системи. Через деякий термін в органах-мішенях розвивається дистрофічні зміни. Тривале збудження гіпоталамо-гіпофізарної системи зрештою призводить до різкого пригнічення секреторної активності нейронів, що ми і спостерігали в V та VI групах.

Висновки

1. В СОЯ та АЯ гіпоталамусу інтактних тварин переважно присутні нейрони II морфофункціонального типу, а у тварин, що підлягали впливу NaNO_2 та адрибластину – I типу.

2. Індекс секреторної активності нейронів СОЯ та АЯ гіпоталамусу експериментальних тварин, зменшувався порівняно з контролем, причому у тварин, що отримували адрибластин, цей процес був виразніший ніж у тварин, що отримували NaNO_2 .

3. Індекс секреторної активності нейронів СОЯ та АЯ гіпоталамусу інтактних самців вище ніж у інтактних самок.

4. Індекс секреторної активності нейронів СОЯ та АЯ гіпоталамусу самок після введення токсичних агентів зменшується в меншому ступені ніж у самців.

5. Можна припустити, що виразне зменшення секреторної активності нейронів СОЯ та АЯ обумовлене їх виснаженням внаслідок нейромедіаторної дії адрибластину та NaNO_2 .

Перспективи подальших розробок – морфометричне дослідження активності нейросекретції після впливу нітриту натрію та адрибластину на ультраструктурному рівні.

Літературні джерела

Ванин А. Ф. Оксид азота в біології: история, состояние и перспективы исследований / А.

Ф.Ванин // Биохимия. - 1988. - № 7. – С. 867-869.
Гурін А. В. Функциональная роль оксида

азота в центральной нервной системе / А. В. Гурин // Успехи физиологических наук. – 1997. – Т. 28. – № 1. – С. 53-60.

Кнорре З. Д. Гипоталамо-гипофизарная нейросекреторная система в различных фазах нормального эстрального цикла : при постоянной течке и овариоэктомии у крыс / З. Д. Кнорре, А. Л. Поленов, М. В. Прапп // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1969. – Т. 57, № 7. – С. 17-25.

Куринный А. Т. Дестабилизация генофондов под влиянием ксенобиотиков / А. Т. Куринный, Л. И. Масник // Гигиена применения, токсикология пестицидов и полимерных материалов. – 1987. – Вып. 17. – С. 97-99.

Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – [14-е изд., перераб., испр. и доп.]. – М. : ООО “Издательство новая Волна”. – 2000. – 608 с.

Насибуллин Б. А. Структурно-метаболическое типирование нейронов сенсомоторной коры головного мозга крыс / Б. А. Насибуллин. – Деп. в Укр. НИИТИ 14.III.91 № 346 - УК. 91. – 7 с.

Тараканов Е. И. Нейросекретия в норме и патологии / Е. И. Тараканов. – М. : Медицина, 1968. – 219 с.

Технології виділення клітин строми кісткового мозку людини, розмноження *in vitro* та ін-

дукції в нервові клітини та остеобласти : методичні рекомендації / О. А. Щегельська, Ю. Ю. Микulinський, О. А. Омельченко [та ін.]. – Харків : Вірола+, 2004. – 16 с.

Тэйлор Б. С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции. / Б. С. Тэйлор, Л. Х. Аларсон, Т. Б. Биллиар // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 905-923.

Физиология и патофизиология воспроизводства человека / И. Думитру, М. Мэйкэнеску-Джорджеску, М. Ротару [и др.]. – Бухарест: Мед. изд-во, 1981. – 846 с.

David A. Intrinsic inhibition in magnocellular neuroendocrine cells of rat hypothalamus / Andrew David, Dudek Edward // J. physiology. – 1984. – Vol. 353. – P. 171-185.

Dorner G. Differential localization of a male and a female hypothalamic mating centre / G. Dorner, F. Docke, S. Moustafa // J. Reprod. Fertil. – 1968. – Vol. 17. – P. 582-586.

Dotella-Lusia J. Endocrinology of woman / J. Dotella-Lusia. – Philadelphia-London-Toronto, 1973. – 438 p.

Swanson H. H. // Hormones, brain and behaviour in vertebrates. 1. Sexual differentiation, neuro-anatomical agents, neurotransmitters and neuropeptides / H. H. Swanson, E. J. - Houtsmuller, R. Diaz. – Basel : Karger, 1990. – Vol. 8 – P. 240.

Запорожан В.М., Холодкова О.Л., Пихтеев Д.М., Щербатюк А.Л. Морфометрические показатели супраоптического и аркуатного ядер гипоталамуса экспериментальных животных в условиях влияния вредных факторов.

Резюме. В статье описано влияние нитрита натрия и адрибластина на морфо-функциональное состояние гипоталамуса самцов и самок мышей линии ICR. Выявлено, что в исследованных ядрах экспериментальных групп преобладают нейроны, находящиеся в фазе покоя, тогда как в контроле – в фазе накопления нейросекрета. Индекс секреторной активности нейронов у экспериментальных мышей снижался по сравнению с контролем, при этом в группах, которым был введен адрибластин, он снижался в большей степени. Также наблюдалось более медленное снижение активности нейронов у самок экспериментальных групп по сравнению с самцами. Выдвинуто предположение, что уменьшение активности нейронов экспериментальных животных обусловлено истощением вследствие нейромедиаторного действия адрибластина и нитрита натрия.

Ключевые слова: нитрит натрия, адрибластин, мышцы, морфометрия, гипоталамус.