

УДК 616.441-008.64-053-06:616.831:57.012.4.:57.084/.085

В.А. Петренко, Л.О. Стеченко, Т.П. Куфтирева, С.М. Чухрай, Р.С. Довгань

## УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ З ВРОДЖЕНИМ ГІПОТИРЕОЗОМ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця (м. Київ)

Робота виконана в рамках держбюджетної теми Інституту проблем патології НМУ імені О.О.Богомольця: „Вплив вродженого та набутого гіпотиреозу на стан центральної та периферійної нервової системи щурів та можливість його фармакологічної корекції”, № держреєстрації 0109U001804.

**Вступ.** Гіпотиреоз, який розвивається при нестачі гормонів щитоподібної залози, широко розповсюджений не лише в Україні, а й усьому світі. Частота синдрому значно зросла після аварії на ЧАЕС і продовжує поширюватися не лише серед дорослого населення у вигляді набутого (аутоімунного або післяопераційного) гіпотиреозу, а і дітей як вроджена форма цього захворювання [1]. Роль гормонів, які виробляє щитоподібна залоза, змінюється з віком. В період пренатального та раннього постнатального періодів онтогенезу ці гормони мають важливе значення у формуванні скелету і нервової тканини, в першу чергу головного мозку, а їх дефіцит призводить до гальмування розумового та фізичного розвитку дитини [2]. Дослідження, присвячені проблемі гіпотиреозу, особливо вродженого, проводилися, головним чином, в клінічних умовах, тоді як механізми його розвитку досі не повністю з'ясовані.

У зв'язку з вищезазначеним, **метою дослідження** було вивчити особливості змін ультраструктури кори головного мозку щурів в динаміці розвитку вродженого гіпотиреозу, починаючи з ювенільного віку і до статевої зрілості.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проведено на 6 групах щурів лінії Вістар: 1-3 групи (віварійний контроль) - інтактні 7, 45 та 100 добові шури (15 тварин); 4-6 групи - 7, 45 та 100 добові тварини, яким моделювали стан вродженого гіпотиреозу (15 тварин). Відповідність утримання, догляду за тваринами та проведення наукових дослідів етичним вимогам положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1985) встановлена комісією з біоетики Національного медичного університету імені О. О. Богомольця.

Вроджений гіпотиреоз моделювали шляхом пригнічення функції щитоподібної залози введенням тиреостатика – мерказоліла. Препарат вводили перорально на протязі усього експерименту щоденно у дозі 20 мг/кг спочатку вагітним самкам, починаючи з 14 доби перинатального розвитку, потім піддослідні тварини отримували його з молоком матері, а в подальшому - при самостійному харчуванні.

Рівень вільного тироксину в плазмі крові визначали при вилученні тварин з експерименту імуноферментним методом на приборі «Sunrise RC» фірми TEKAN.

Електронномікроскопічно досліджувалася сенсорномоторна кора півкуль головного мозку, яку фіксували у 2,5% розчині глютарового альдегіду на фосфатному буфері з дофіксацією в 1% розчині чотирьох окису осмія. Подальша обробка матеріалу проводилася згідно загальноприйнятій методиці. Препарати досліджували під електронним мікроскопом TEM – 125K.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Ультраструктурний аналіз показав, що структурні компоненти кори ГМ у 7 добових інтактних щурів знаходяться на різних стадіях дозрівання. Нейрони містять ядро з ознаками функціональної активності: рівномірно розподілений по каріоплазмі хроматин, великі за розмірами 1-2 ядерця. В цитоплазмі розташовуються каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі, полісоми, дрібні

за розміром мітохондрії з добре збереженими зовнішніми мембранами та кристами, спостерігаються також пероксисоми, незначне число лізосом. Нейрони по периметру тіла утворюють щільні контакти з відростками інших нервових клітин. Подекуди вони контактують на значній протяжності з олігодендроцитами. Астроцити мають електроннопросвітлену цитоплазму, в якій розташовуються функціональне ядро, мітохондрії витягнутої або овальної форми, в залежності від площини зрізання, невеликі за розмірами каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі. В астроцитах, розташованих периваскулярно, через незначну кількість органел цитоплазма має більш електроннопрозорий вигляд. Спостерігаються гліальні клітини на стадії мітозу, що свідчить про активні проліферативні процеси в корі ГМ. Нейропіль представлений нервовими відростками, які різняться за розмірами та вмістом, головним чином нейрофібрилярних структур та секреторних пухирців. Нервові закінчення містять дрібні пухирці, заповнені матеріалом помірної електронної щільності. Особливістю будови нейропіля в цей віковий період є відсутність мієлінових нервових волокон. Кровоносні мікросудини вистелені ендотеліальними клітинами, в яких переважають органели біосинтетичного плану при незначній кількості мікропіноцитозних везикул, що характерно для гемомікросудин у нервовій системі, особливо головному мозку, де функціонує гематоенцефалічний бар'єр.

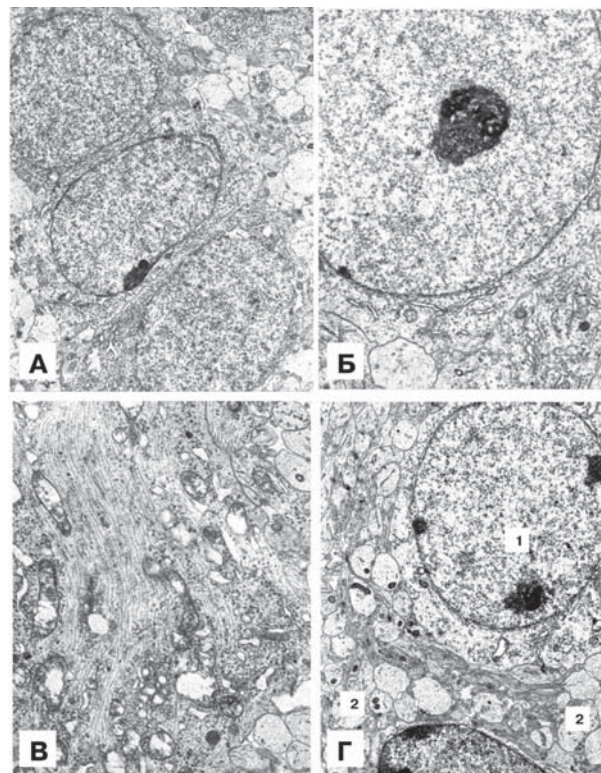


Рис. 1. Кора головного мозку 45 добових щурів з ВГТ.

А – Малодиференційовані нервові клітини. Б – Нейрон. В – Дендрит. Г – Олігодендроцит (1). Нейропіль (2). Електронномікроскопічне фото. Зб.: А –8000; Б-12000; В-16000; Г-8500.

У 7 добових щурів з ВГТ ультраструктура кори ГМ має деякі відмінності від вікового контролю. Наявність ланцюжків мало диференційованих клітин, що контактують між собою латеральними поверхнями і не розійшлися між собою (рис. 1А), свідчить про затримку процесів стратифікації у гіпотиреоїдних щурів. В нейронах зменшена кількість полісом, мітохондрій, каналців гранулярної ендоплазматичної сітки, внаслідок чого вони мають більш електроннопрозору цитоплазму (рис. 1Б), ніж нейрони у віковому контролі.

В аксонах, в ділянках відходження їх від тіла нейрона, де розташовуються і органели біосинтетичного плану, і велика кількість нейротрубочок та нейрофібрил, подекуди спостерігаються гіпертрофовані мітохондрії з локальним лізісом матрикса та крист (рис. 1В). В гліальних клітинах не відмічається виразних відмінностей від вікового контролю, за винятком зменшення кількості органел в ядровмісних ділянках окремих астроцитів. В нейропілі в нервових відростках та їх закінченнях дещо зменшена кількість секреторних пухирців, нейрофібрил. Відсутні в корі ГМ, як і у інтактних щурів, мієлінові волокна (рис. 1Г).

У 45 добових щурів з ВГТ в корі ГМ відмінності ультраструктури її компонентів від вікового контролю набувають більшої виразності, у порівнянні з 7 добовими щурами. Мозаїчність ультраструктури нейронів обумовлена, в першу чергу, їх електронною щільністю. Нейрони з помірно електронною щільністю містять електроннопрозорі ядра, незначну кількість фрагментованих каналців гранулярної ендоплазматичної сітки, мітохондрій з локальним лізісом матриксу, пероксисоми, лізосоми (рис. 2А). Звертає на себе увагу наявність в цитоплазмі вакуолярних утворень неправильної гофрованої форми, які подекуди розташовуються біля плазматичної мембрани, зливаючись з нею. Такі ж утворення спостерігаються і в ядрі (рис. 2Б). Ще однією особливістю нейронів у даний віковий період є проникнення ділянок цитоплазми у вигляді довгих смужок глибоко в ядро. Такі впливання заповнені полісомальними комплексами (рис. 2В). Їх присутність, скоріш усього, спрямована на компенсацію знижених біосинтетичних процесів при тривалому дефіциті гормонів щитоподібної залози, про що свідчить невелика кількість органел та ультраструктура ядер із зменшеними за розміром ядерецями. Останні розташовуються переважно біля каріолеми, що не характерно для ядер нейронів інтактних тварин.

Інші нейрони мають підвищену електронну щільність цитоплазми і ядер різного ступеня виразності, що відображає стадії апоптозних змін клітин (рис. 2А, Г). Чим більша клітинна ущільненість, тим виразніше зміни органел: гіпертрофія мітохондрій з лізісом їх матриксу та крист, розширення каналців ендоплазматичної сітки. Фрагментація клітин відбувається, коли розширення набувають найвищого ступеня.

Знають дистрофічно-деструктивних змін і гліальні елементи кори – олігодендроцити та астроцити. Для олігодендроцитів характерним є присутність ядер з маргінальним розташуванням гетерохроматину та невелике число органел. Крайнім проявом змін в олігодендроцитах є пікноз ядра, набряк органел та цитоплазми з майже повним їх лізісом (рис. 2Г). Це ж стосується і астроцитів та їх відростків, особливо розташованих периваскулярно.

Нейропілі варіює за електронною щільністю, внаслідок підвищеної кількості нейрофібрилярних структур в одних нервових волокнах та набряку і лізису – в інших (рис. 2Г). Синаптичні закінчення повсюдно зазнають електронного ущільнення, їх синаптична щільна заповнена щільним матеріалом, а мембрани потовщені так, що їх не можливо розрізнити. Необхідно відмітити, що дуже рідко в корі ГМ 45 добових щурів із ВГТ спостерігаються мієлінові волокна.

Просвіт кровоносних капілярів заповнений дрібнодисперсним матеріалом. Спостерігаються ендотеліальні

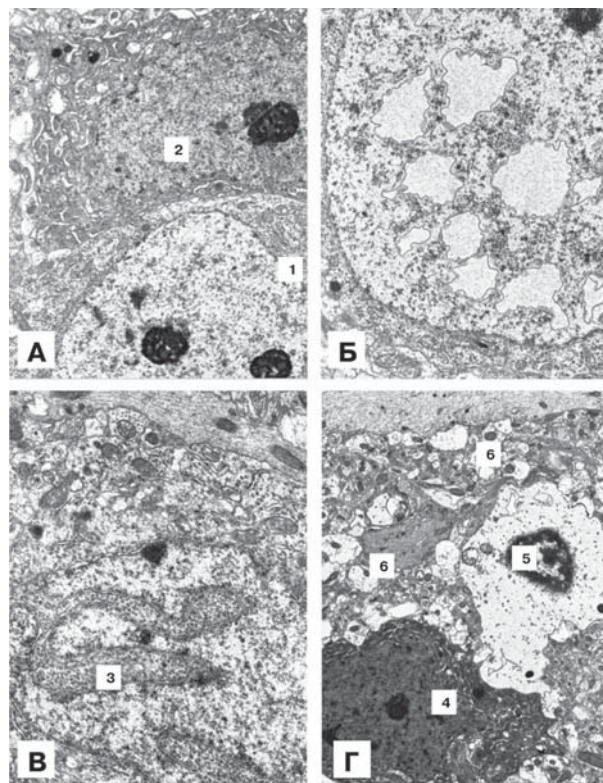


Рис. 2. Кора головного мозку 45 добових щурів з ВГТ.

- А – Електроннопросвітлений (1) та електронноущільнений (2) нейрони.  
 Б – вакуолярні утворення в ядрі нейрона.  
 В – інвагінації цитоплазми з полісомами (3) в ядро нейрона.  
 Г – Електронноущільнений нейрон (4). Олігодендроцит (5).  
 Нервові відростки (6).  
 Електронномікроскопічне фото.  
 Зб.: А – 8000; Б – 12000; В – 12000; Г – 9500.

клітини з пікнотично зміненими ядрами та локальним лізісом цитоплазми.

У 100 добових щурів з ВГТ структурні компоненти кори ГМ зберігають мозаїчність ультраструктури, притаманну і 45 добовим гіпотиреоїдним щурам. Спостерігаються світлі та темні нейрони, але кількість темних нейронів, у порівнянні з попереднім строком гіпотиреозу, зменшена. Враховуючи те, що темні клітини – це різні стадії проапоптичного стану, а також наявність у 45 добових щурів з ВГТ значної кількості темних нейронів на заключних стадіях розпаду, можна припустити, що зменшення числа темних нейронів у 100 добових гіпотиреоїдних щурів обумовлено, з одного боку загинеллю частини клітин, а з іншого – гальмуванням апоптозу. Більшість темних нейронів мають пікноморфно змінене ядро, яке розташовується ексцентрично. Практично всі органели знаходяться на різних стадіях деструкції – мітохондрії, каналці ендоплазматичної сітки та комплексу Гольджі розширені. Вони набувають вигляд вакуолей, які подекуди зливаються, так що важко розрізнити їх між собою (рис. 3А).

Світлі нейрони, які є функціонально активними, містять центрально розташовані ядра з невеликими ядерецями, незначну кількість фрагментованих каналців гранулярної ендоплазматичної сітки, полісом. В той же час комплекс Гольджі та мітохондрії дещо гіпертрофовані. Канальці комплексу Гольджі переважно витягнуті, локально розширені. Мітохондрії мають добре структуровану зовнішню мембрану, кристи з нерівномірно розширеним міжкристним простором. Звертають на себе увагу витягнуті уздовж



ядра, гіпертрофовані МХ, які зливаються з каріолемою настільки, що не можливо розрізнити їх мембрани (рис. 3Б). Очевидно, це є проявом адаптаційних процесів, обумовлених функціонуванням в умовах стійкого дефіциту гормонів щитоподібної залози, які, як відомо, необхідні для активації генної транскрипції.

Ультраструктурна організація клітин макроглії – олігодендроцитів та астроцитів – суттєво не відрізняється від того, що спостерігається у попередній термін спостережень. В олігодендроцитах зменшена кількість органел метаболічного плану (рис. 3В). Астроцити мають електронопроросвітлену цитоплазму в тілі і відростках, внаслідок набряку та лізису цитоплазми (рис. 3Г). Не спостерігається підсилення дистрофічно-деструктивних процесів, у

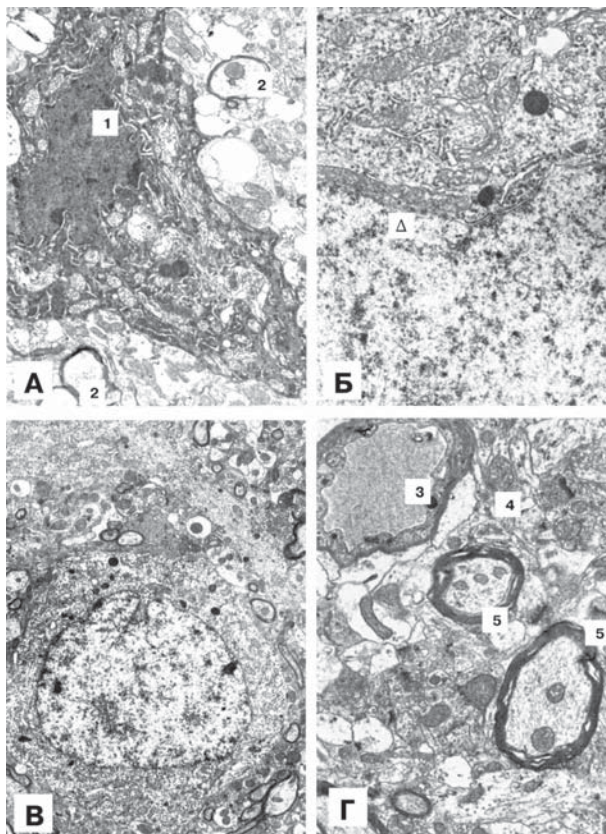


Рис. 3. Кора головного мозку 100 добових щурів з ВГТ.

А - Темний нейрон (1). Мієлінові волокна (2).

Б - Контакт мітохондрії з ядром у світлому нейроні (Δ).

В - Олігодендроцит. Г - Кровоносний капіляр (3).

Відростки астроцитів (4). Мієлінові волокна (5).

Електронномікроскопічне фото.

36.: А – 8000; Б – 17000; В-6500; Г-8500.

порівнянні з 45 добовими гіпотиреоїдними щурами, і в нейропілі. Кількість мієлінових волокон менша, ніж у віковому контролі. Подекуди в мієлінових оболонках спостерігаються ділянки розходження мезаксонів, а в більш крупних волокнах – їх розпушеність, деструктурованість (рис. 3 А, В, Г).

Просвіт кровоносних капілярів заповнений коагульованою плазмою, в той же час ендотеліоцити не мають ознак виразних деструктивних змін. Вони містять мітохондрії, ендоплазматичну сітку, комплекс Гольджі, полісоми, незначну кількість мікропіноцитозних пухирців, що притаманно їм в контролі. Базальна мембрана без виразних потовщень (рис. 3Г).

## Висновки.

1. У головному мозку ювенільних щурів з вродженим гіпотиреозом морфо-функціональних змін зазнають нейральні та гліальні елементи головного мозку, ультраструктурна організація яких відрізняється від вікового контролю. Відмічається затримка стратифікації та клітинної диференціації. Це проявляється наявністю мало диференційованих нейронів, що не розійшлися пошарово. В нейропілі відсутні мієлінові волокна, в нервових відростках зменшена кількість нейрофібрил та нейротрубочок, а в синаптичних закінченнях – пухирців.

2. Із збільшенням строку спостережень до 45 днів зміни в структурах головного мозку набувають більшої виразності. Для нейронів характерним є поява клітин, змінених за темним типом, що є проявом проапоптозних змін. В світлих нейронах суттєво зменшена кількість органел метаболічного плану на фоні присутності ядер з ознаками зниженої транскрипційної активності. Це ж стосується і клітин макроглії головного мозку, що мають незначну кількість органел в цитоплазмі, яка дещо набрякла. Опосередкованим доказом зниження функціональної активності олігодендроцитів є незначна кількість мієлінових волокон у щурів з вродженим гіпотиреозом в цей період.

3. У 100 добових щурів з вродженим гіпотиреозом в корі головного мозку зберігається мозаїчність структурних компонентів. Як і в попередній термін експерименту, спостерігаються світлі та темні нейрони. Кількість апоптозно змінених темних нейронів незначна, що може бути обумовлено, з одного боку, загибеллю частини клітин, а з іншого – гальмуванням апоптозу. Світлі нейрони мають ознаки функціональної активності. В гліальних елементах та нейропілі не відмічається підсилення дистрофічно-деструктивних процесів, у порівнянні з 45 добовими гіпотиреоїдними щурами. Впливає нестача гормонів щитоподібної залози і на процеси мієлінізації, про що свідчить значно менша, ніж у віковому контролі, кількість мієлінових волокон. Таким чином, в цей віковий період вродженого гіпотиреозу в головному мозку на фоні деструктивно-дистрофічних виражені і адаптаційні процеси.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати будуть використані при розробці нових схем фармакологічної корекції вад розвитку центральної нервової системи при вродженому гіпотиреозі та оцінці ефективності застосованих препаратів.

## Список літератури

1. Абрамова Н.А. Синдром гипотиреоза / Н.А.Абрамова// Эндокринология. Национальное руководство.- М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.- С. 488-496.
2. Иржак Л.И. Общие и специфические эффекты тироксина/ Л.И.Иржак.- Действие тироксина на физиологические функции. - Сыктывкар, 1997.- С. 67 -77.

УДК 616.441-008.64-053-06:616.831:57.012.4.:57.084/.085

## УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ З ВРОДЖЕНИМ ГІПОТИРЕОЗОМ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ

Петренко В.А., Стеченко Л.О., Куфтирева Т.П., Чухрай С.М., Довгань Р.С.

**Резюме.** Методом електронної мікроскопії досліджено 7, 45 та 100 добові інтактні щури та щури, яким моделювали стан вродженого гіпотиреозу (ВГТ). Встановлено, що при розвитку ВГТ морфо-функціональні зміни в корі головного мозку відмічаються вже у ювенільних (7 добових) щурів. Це проявляється наявністю мало диференційованих нейронів, що не розійшлися пошарово, і свідчить про затримку стратифікації та клітинної диференціації. Із збільшенням строку спостережень до 45 днів зміни в структурах головного мозку набувають більшої виразності. Для нейронів характерна поява клітин, змінених за темним типом, що є проявом проапоптозних змін. На пізніх етапах розвитку ВГТ (100 днів) у головному мозку на фоні кількісного зменшення їх структурних компонентів виражені адаптаційні процеси.

**Ключові слова:** головний мозок, щури, вроджений гіпотиреоз, електронна мікроскопія.

УДК 616.441-008.64-053-06:616.831:57.012.4.:57.084/.085

## УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С ВРОЖДЕННЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Петренко В.А., Стеченко Л.А., Куфтырева Т.П., Чухрай С.Н., Довгань Р.С.

**Резюме.** Методом электронной микроскопии исследованы 7, 45 и 100 суточные интактные крысы и крысы, которым моделировали состояние врожденного гипотиреоза (ВГТ). Установлено, что при развитии ВГТ морфо-функциональные изменения в коре головного мозга отмечаются уже у ювенильных (7 суточных) крыс. Это проявляется наличием мало дифференцированных нейронов, которые не разошлись послойно, и свидетельствует о задержке стратификации и клеточной дифференциации. С увеличением срока наблюдений до 45 суток изменения в структурах головного мозга приобретают большую выразительность. Для нейронов характерно появление клеток, измененных по темному типу, что является признаком проапоптозных изменений. На поздних этапах развития ВГТ (100 суток) в головном мозге на фоне количественного уменьшения их структурных компонентов выражены адаптационные процессы.

**Ключевые слова:** головной мозг, крысы, врожденный гипотиреоз, электронная микроскопия

UDC 616.441-008.64-053-06:616.831:57.012.4.:57.084/.085

## ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF RAT BRAIN WITH CONGENITAL HYPOTHYROIDISM IN AGING ASPECT

Petrenko V., Stechenko L., Kuftyreva T., Chuhray S., Dovhan R.

**Summary.** The method of electron microscopy study 7, 45 and 100 daily intact rats and rats that modeled the condition of congenital hypothyroidism (CHT). Established that the development CHT morpho-functional changes in the cerebral cortex appear already in the juvenile (7 day old) rats. It shows the presence of differentiated neurons was not dispersed layer with, and shows a delay of stratification and cell differentiation. With increasing observation period to 45 days the changes in brain structures become more expressive. For the typical appearance of neuronal cells, modified by a dark type, which is a manifestation proapoptoznyh changes. At later stages of development CHT (100 days) in the brain against the background of the quantitative decrease in their structural components expressed adaptive processes.

**Key words:** brain, rats, congenital hypothyroidism, electron microscopy.

Стаття надійшла 31.03.2011 р.

УДК 616.126.3 – 089.844

М.В. Петрова

## ДЕВИТАЛИЗАЦИЯ ТКАНЕЙ КСЕНОЛОГИЧНЫХ СЕРДЕЧНЫХ КЛАПАНОВ С СОХРАНЕНИЕМ ИХ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ

Государственное учреждение «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака Национальной академии медицинских наук Украины» (г. Донецк)

Исследование выполнено в рамках плановой научно-исследовательской работы «Изучить возможности биомодификации артериальных ксенографтов в эксперименте» (№ госрегистрации 0111U 002052).

**Вступление.** Ежегодно в мире проводится около 275 000 операций по протезированию сердечных клапанов. В качестве одного из наиболее перспективных материалов для сердечно-сосудистой хирургии врожденных и приобретенных пороков сердца рассматриваются биологические трансплантаты на основе ксенологичного материала (ксенографты). В отличие от механических клапанов они позволяют избежать антикоагулянтной терапии и обладают потенциалом к ремоделированию в организме реципиента, что особенно важно в тех случаях, когда необходимо обеспечить не только поддержание и обновление структуры трансплантата, но и его рост [6].

В последние годы активно разрабатываются методы обработки трансплантатов, обеспечивающие гибель клеток донора. Считается, что такой подход будет способствовать уменьшению иммунного ответа и повышению долговечности трансплантатов клапанов сердца [2, 3, 5, 7]. Увеличение долговечности и самообновление графта также зависят от того, насколько быстро тканеобразующие клетки реципиента проникнут в матрикс донорского клапана, образуют там популяцию и приступят к созданию собственного матрикса [2]. Максимального сокращения необходимого для этого времени можно добиться при условии заселения трансплантата аутоклетками реципиента еще на стадии культивирования.

Используемые в мировой практике методы девитализации клапанов можно разделить на две основные группы: с использованием веществ, вызывающих некроз и методы, нацеленные на индуцирование апоптотической гибели клеток [2]. Некрозирующими методами позволяют достичь эффекта девитализации за относительно

непродолжительный период времени. Однако существует риск некоторого повреждения матрикса под действием лизосомальных ферментов, что, в дальнейшем, может привести к кальцификации ткани. Исходя из этого, мы предположили, что предпочтительней будет использование веществ, инициирующих апоптотическую гибель клеточной составляющей трансплантата.

**Цель исследования.** Девитализирование ксеногенных графтов сердечных клапанов, а также последующая оценка их адгезивности для клеточного материала.

**Объект и методы исследования.** Исследование проводили с использованием сердечных клапанов 6-месячных свиней. Образцы, принимавшие участие в исследованиях, были подвержены воздействию апоптоз-вызывающего раствора в течение 2-х суток. В качестве такового использовался раствор ЭДТА (Sigma, США) в концентрации 10 мМ. По истечении заданного времени экспозиции образцы тщательно отмывались в среде с содержанием солей в концентрации близкой к физиологической. С целью проверки запуска апоптоза часть образцов подвергалась гистологическому анализу (окраска гематоксилин-эозином).

С целью оценки сохранения адгезивных свойств, девитализированные графты инкубировали с фетальными фибробластами человека, выделенными и культивированными в соответствии с общепринятой методикой [4]. Перед инкубацией культура фибробластов была окрашена витальным флуоресцентным красителем PKH 67 Green (Sigma, США) и ресуспендирована в культуральной среде. Степень адгезивности девитализированной ткани сердечных клапанов оценивалась на 5-е сутки инкубации с использованием флуоресцентного микроскопа.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Апоптоз имеет свои отличительные морфологические признаки, как на светоптическом, так и на ультраструктурном