

УДК 611.928:616.631.11-08-092.4/9

**СТРУКТУРНІ ЗМІНИ СКЛАДОВИХ ЧАСТИН ПРОСТОЇ РЕФЛЕКТОРНОЇ ДУГИ У ЩУРІВ ІЗ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ НІКОТИНАМІДОМ****Кривко Ю.Я.***Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, м. Львів***Ключові слова:** нейрони, нервові волокна, морфологія, стрептозототин-індукований діабет, нікотинамід.

**Вступ.** Механізми розвитку діабетичної сенсорно-моторної нейропатії постійно привертають увагу дослідників, оскільки це ускладнення є однією з ведучих причин інвалідності і смертності при діабеті [3,7]. Однак, просторово-часова послідовність структурних пошкоджень нейронів, сполучених синапсами в рефлекторні дуги, ступінь їх вираженості в різноманітних утворах нервової системи, стадійність розвитку патологічного процесу, взаємозв'язок нейрональних, гліальних, макро- і мікроциркуляторних порушень залишаються невивченими. Особливий інтерес у цьому плані складає питання про те, чи не здійснюється розвиток діабетичної нейропатії власними, притаманими самій ушкодженій нервовій структурі ендогенними механізмами.

**Мета дослідження.** Вивчити структурні зміни складових частин простої рефлекторної дуги у щурів зі стрептозототиніндукованим діабетом і можливості їх корекції нікотинамідом.

**Матеріали та методи.** У досліді використовували щурів-самців лінії Вістар з масою тіла 120-130 г. Експериментальний цукровий діабет викликали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозототину фірми "Sigma" з розрахунку 7 мг на 100 г маси тіла (приготованому на 0,1 моль цитратному буфері, рН = 4,5). Розвиток цукрового діабету протягом 2-4 тижнів контролювали за зростанням рівня глюкози в крові, яку вимірювали глюкозооксидазним методом. Дослідження проводили на тваринах з рівнем глюкози понад 15 ммоль на 1л. Нікотинамід в дозі 200 мг на 1 кг маси тіла вводили щоденно протягом 2 та 4 тижнів тваринам з розвинутою гіперглікемією (4, 6, 7, 9, 10 експериментальні групи). В роботі використано 10 груп тварин: 1) 5 інтактних контрольних щурів; 2) 10 щурів з цукровим діабетом, що

розвивається (4 тижні після введення стрептозототину); 3) 10 щурів з цукровим діабетом, що розвинувся (6 тижнів після введення стрептозототину); 4) 10 щурів з цукровим діабетом, що розвивається (4 тижні після введення стрептозототину), котрим потім впродовж 2 тижнів вводили нікотинамід; 5) 10 щурів з цукровим діабетом, що розвинувся (8 тижнів після введення стрептозототину); 6) 10 щурів з цукровим діабетом, що розвинувся (6 тижнів після введення стрептозототину), котрим потім впродовж 2 тижнів вводили нікотинамід; 7) 10 щурів з цукровим діабетом, що розвивається (4 тижні після введення стрептозототину), котрим потім впродовж 2 тижнів вводили нікотинамід; 8) 10 щурів з цукровим діабетом, що розвинувся (6 тижнів після введення стрептозототину), котрим потім впродовж 4 тижнів вводили нікотинамід; 9) 10 щурів з цукровим діабетом, що розвинувся (8 тижнів після введення стрептозототину), котрим потім впродовж 2 тижнів вводили нікотинамід; 10) 10 щурів з цукровим діабетом, що розвинувся (8 тижнів після введення стрептозототину), котрим потім впродовж 4 тижнів вводили нікотинамід;

Матеріал з чутливих вузлів IV – V поперекових спинномозкових нервів, передніх рогів відповідних сегментів спинного мозку та із сідничого нерва брали після евтаназії тварин під нембуталовим наркозом і обробляли за загальноприйнятою методикою електронномікроскопічного аналізу. Напівтонкі та ультратонкі зрізи отримували на ультратомах LKB і Reichert. Напівтонкі зрізи фарбували толуїдиновим синім, вивчали і фотографували в мікроскопі МБІ-6. Ультратонкі зрізи контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю, вивчали і фотографували в електронному мікроскопі ЕМБ-100Б і ЕМБ-100БР.



**Результати дослідження та їх обговорення.** На четвертому і шостому тижні експерименту у щурів з цукровим діабетом, що розвивається і цукровим діабетом, що розвинувся, котрі не отримували нікотинамід (2 і 3 експериментальні групи), нами була відмічена виражена тенденція до ущільнення цитоплазми і ядра рухових нейронів передніх рогів спинного мозку, а також нейронів чутливих вузлів спинномозкових нервів, котрі набувають вигляд “темних” нейронів.

На восьмому тижні експерименту у щурів з цукровим діабетом, що розвинувся, котрі не отримували нікотинамід (5 експериментальна група) було зареєстровано зморщування та фрагментацію на апоптозні тіла окремих (головним чином дрібних) “темних” нейронів чутливих вузлів. У цих щурів в крупних і, особливо, в дрібних “темних” нейронах передніх рогів спинного мозку відмічені типові апоптозні зміни:

втрата синапсів, відокремлення нейрона від сусідніх нервових структур, ущільнення ядра, конденсація і зморщування цитоплазми.

В апоптозних нейронах передніх рогів спинного мозку матрикс цитоплазми стає дрібногранулярним і вона набуває вигляд вузьких темних перемичок, розділених системою крупних світлих порожнин (Рис.1). Ці порожнини деформують гомогенне ядро і осмофільну цитоплазму, сприяючи їх фрагментації і розділенню нейрона на апоптозні тіла. Характерною особливістю цієї фрагментації є збереження цілісності цитоплазматичної і ядерних мембран, завдяки чому апоптозні тіла мають вигляд острівців мембраноз’язаних сегментів, частина котрих містить фрагменти ядра (Рис.2).

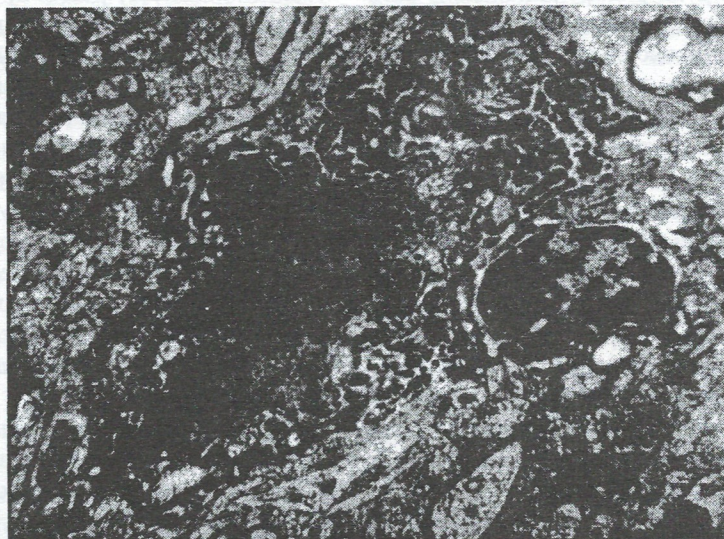


Рис. 1. Апоптозозмінений дрібний мотонейрон переднього рогу поперекового сегменту спинного мозку щура на 8 тижні розвитку стрептозоточиніндукованого діабету. x 5000.



Рис. 2. Фрагментація дрібного апоптозного мотонейрона переднього рога поперекового сегмента спинного мозку щура на 8 тижні розвитку стрептозоточиніндукованого діабету. x 5000.



Найбільш ранні, відмічені нами в ході дослідження, структурні зміни рухових і чутливих нейронів пов'язані із деструкцією мітохондрій, котрі вже на четвертому тижні експерименту (2 експериментальна група) відрізняються різним ступенем пошкодження матриксу, крист, внутрішньої мембрани (до перетворення цієї органели у вакуолу). На шостому тижні, крім цього, з'являються дефекти і розриви зовнішньої мембрани мітохондрій (3 експериментальна група).

Суттєвими є також структурні зміни синапсів у передніх рогах спинного мозку. У тварин 2 експериментальної групи в одних синаптичних контактах спостерігається збільшення числа активних зон (пресинаптичних ущільнень), підвищення їх осміофілії, потовщення постсинаптичної мембрани і підвищення осміофілії постсинаптичних ущільнень, концентрація пресинаптичних пухирців біля пресинаптичної мембрани, що вказує на структурно-функціональну активність синапса. В інших синаптичних контактах відзначено збільшення протяжності мембранної поверхні терміналей, відповідальних за проведення нервового імпульса, накопичення і склеювання пресинаптичних пухирців з втратою їх контурів, деколи ущільнення і зморщування пухирців, деколи об'єднання пухирців.

У тварин з цукровим діабетом, що розвинувся (3 і 5 експериментальні групи) поряд з незміненими синапсами визначаються синапси з вираженими структурними змінами. В одних синапсах відмічено збільшення числа пресинаптичних пухирців, в інших – набухання пресинаптичних частин, зникнення або агрегація пресинаптичних пухирців, в третіх – підвищення або різке зниження електронної щільності аксоплазми і наявність в ній мієліноподібних тіл. Слід відзначити, що поява мієліноподібних тіл, що вказують на значну перебудову ліпопротеїдного комплексу цитоплазми аксона, є ознакою незворотніх, дегенеративних пошкоджень синапсів.

Структурні зміни чутливих і рухових нейронів закономірно відображаються на провідниковому апараті простої рефлекторної дуги. Мієлін в сидничому нерві щурів з розвинутим діабетом (5 експериментальна група) набуває повстиноподібного вигляду. Мієлінова оболонка в нервових волокнах розшаровується, вакуолізується, сепарується від осьових циліндрів, деколи розпадається на фрагменти, що мають вигляд різноманітних клубків. В цитоплазмі осьових циліндрів відзначається зниження кількості мікротрубочок, агрегація нейрофіламентів в центральній частині. Навіть при поверхневому обстеженні щурів 5 експериментальної групи визначається їх млявість, м'язева слабкість, атонія м'язів, фібрилярні м'язеві посіпування.

У тварин з розвинутим цукровим діабетом та цукровим діабетом, що розвивається (загальна тривалість експерименту не більше 8 тижнів), котрим вводили нікотинамід (4, 6, 7 експериментальні групи) характерних апоптозних змін ядра і цитоплазми чутливих і рухових нейронів не виявлено. Зміни цих нейронів і їх синапсів в цілому вказують на підвищену структурно-функціональну активність і не виходило за межі та-

ких, що є характерними для компенсаторних або компенсаторно-приспосувальних реакцій.

У тварин з розвинутим цукровим діабетом (загальна тривалість життя більше 8 тижнів), котрим вводили нікотинамід в пізні терміни (9 і 10 експериментальні групи) морфологічна картина у вивчених нервових утворах не відрізнялась від такої без введення препарату (5 група).

Парадоксальною була картина дії нікотинамиду на тварин 6 і 8 експериментальних груп. В 6 експериментальній групі були щурі (6 тижнів після введення стрептозотоцину), котрим потім на протязі 2 тижнів вводили нікотинамід і ефект був позитивним. У 8 експериментальній групі були щурі (6 тижнів після введення стрептозотоцину), котрим потім на протязі 4 тижнів вводили нікотинамід без помітного позитивного ефекту. Ці дані могли б свідчити про те, що 10 тижнів (і більше) розвитку стрептозотоцинового діабету (нелікованого інсуліном) призводять до суттєвих порушень структур нервової системи. Однак, можливі і інші інтерпретації, на котрих ми зупинемось нижче.

Протягом останніх десятиліть в біології та медицині сформувались чіткі уявлення про генетично запрограмовану смерть клітин (апоптоз), яка суттєво відрізняється від їх некрозу [1,8]. В нормі апоптоз є одним із важливих регуляторних механізмів, приймає участь в забезпеченні гомеостазу в організмі і має, таким чином, адаптивне біологічне значення. Неконтрольований апоптоз набуває патологічного значення і є важливим компонентом деяких нейродегенеративних захворювань [9,10].

Дослідження В.А. Левицького [5] показали, що в нормі у собак протягом постнатального періоду онтогенеза апоптоз відіграє важливу роль у кількісних і якісних змінах структурних компонентів простої рефлекторної дуги. В той же час в літературі є вказівки на те, що гіперглікемія при цукровому діабеті індукує апоптоз нейронів чутливих вузлів спинномозкових нервів [11,12]. Що стосується інших компонентів рефлекторної дуги (і в першу чергу рухових нейронів), то питання про посилення їх апоптозу при діабеті залишається на теперішній час поза полем зору дослідників.

В межах застосованих методів та об'єктів дослідження отримані нами дані вказують на те, що перші морфологічні свідчення розвитку діабетичної нейропатії проявляються у зміні ультраструктури мітохондрій чутливих і рухових нейронів, а також синапсів між ними.

Мітохондріальна дисфункція в чутливих нейронах описана в останній час як суттєвий компонент розвитку діабетичної нейропатії, хоча і оцінюється неоднозначно. Так, О.П. Костюк [2] розглядає дисфункцію мітохондрій і ендоплазматичної сітки як елементи дисфункції механізму внутрішньоклітинної сигналізації в нервовій клітині. В той же час S. Srinivasan et al. [12] визнавали деструкцію мітохондрій частиною апоптозного каскаду, виділяють фази у розвитку апоптозу нейронів: 1) премітохондріальну; 2) мітохондріальну; 3) постмітохондріальну. Отримані нами дані



вказують на безсумнівний зв'язок деструкції мітохондрій з дезорганізацією синапсів і розвитком апоптозу. Разом з тим відомо [1], що ізольована втрата синапсів також індукує апоптоз. В межах застосованих нами методів важко вирішити питання, що є причиною, а що наслідком в *circulus vitiosus*, котрий призводить до розвитку діабетичної нейропатії. Однак, безсумнівно є те, що ключові події відбуваються на 4 тижні експеримента і пов'язані зі структурними порушеннями мітохондрій і синапсів. На це вказують експерименти з нікотинамідом, введення котрого після 4-6 тижнів виявилось неефективним.

Результати нашого дослідження вказують на нікотинамід як на інгібітор апоптозу нейронів при стрептозотозинному діабеті. Разом з тим питання про те, що є причиною розвитку апоптозу в даній моделі діабета (гіперглікемія чи безпосередньо стрептозотозин), на наш погляд є доречним. Актуальність цього питання визначається тим, що воно зовсім не є висвітлене у сучасній літературі. Відомо, що і гіперглікемія [3,7] і стрептозотозин [6] викликають окислювальний стрес, котрий індукує і стимулює апоптоз нейронів [9,12]. Опосередковано на користь наявності двох механізмів (або навіть двох хвиль) в розвитку апоптозу нейронів (і в розвитку самої діабетичної нейропатії) при стрептозотозиніндукованому діабеті свідчать 6 і 8 експериментальні групи. Чому введення нікотинамїду щуром цих груп на протязі 2 тижнів дає ефективний результат, а введення його протягом 4 тижнів не є ефективним? Логічним поясненням цього парадоксу може бути те, що після 8 тижнів експерименту включається новий додатковий фактор (хвиля), пов'язаний, можливо, не з короткочасною дією стрептозотозину, а з довготривалою дією гіперглікемії.

Даний випадок, що обговорюється, може бути пояснений в рамках концепції ендегенезу патологічних процесів [4]. Патологічні процеси в клітинах, органах і тканинах починаються, як відомо з пошкодження цих утворів патогенними впливами. Однак саме ушкодження (в даному випадку викликане введенням стрептозотозину) не являє собою розвиток патологічного процесу, воно відіграє роль причини і обов'язкової умови цього розвитку. Розвиток здійс-

нюється власними, притаманними самій пошкодженій структурі, ендегенними механізмами. При цьому слід пам'ятати, що в даному випадку пошкодженою структурою є ланцюг сполучених синапсами нейронів. В зв'язку з викладеним виникає питання про значення в розвитку діабетичної нейропатії іншого (постійно діючого фактора), котрим є гіперглікемія. В загальному плані патогенетичне значення продовжуючої дії патогенного агента заключається в тому, що воно посилює патологічні зміни і порушує саногенетичні механізми, що обмежують і пригнічують розвиток патологічного процесу. Особливістю перебігу діабетичної нейропатії є включення апоптозного каскаду, котрий викликає загибель не просто одного нейрона, а порушення функціонування, як мінімум, одного нейронного ланцюга з його провідниковим апаратом. Логічно зробити заключення про те, що в даній вивченій моделі діабетична нейропатія має ендегенну природу і може розвиватись проградієнтно навіть при дії такого лікувального препарату як нікотинамід.

В заключенні слід підкреслити як важливість нікотинамїду для профілактики та лікування діабетичної нейропатії, так і важливість вирішення питання про індивідуальність дози, термінів та тривалості його призначення конкретним хворим. Рациональним та обгрунтованим є застосування нікотинамїду в комплексі з інсуліном, коли зниження гіперглікемії та зняття наслідків окислювального стресу будуть послідовно взаємопов'язані.

**Висновки.** Головним висновком даного дослідження є те, що структурні зміни складових частин простої рефлекторної дуги у щурів зі стрептозотозиніндукованим діабетом пов'язані з апоптозом нейронів та клітин глії. Встановлено, що в цій ситуації нікотинамід виступає як інгібітор апоптозу.

Перспективи подальших розробок в даному напрямку пов'язані з визначенням ролі кожного компонента простої рефлекторної дуги в розвитку діабетичної нейропатії, а також в широкому вивченні нікотинамїду як антиапоптозного препарату при нейродегенеративних захворюваннях ЦНС.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Коршунов А.М., Преображенская И.С. Программированная смерть клеток (апоптоз) // Неврологический журнал.-1998.- №1.- С.3-16.
2. Костюк Е.П. Клеточные механизмы развития деабетических нейропатий //Нейрофизиология.- 1998.-Т.30, №2.- С.151-160.
3. Котов С.В., Калинин А.П., Рудакова И.Г. Диабетическая нейропатия.—М.: Медицина, 2000. – 228 с.
4. Крыжановский Г.Н. Некоторые общебиологические закономерности и базовые механизмы развития патологических процессов //Архив патологии.-2001.-№6.- С. 44-49.
5. Левицький В.А. Апоптоз та некроз складових компонентів простої рефлекторної дуги протягом постнатального періоду онтогенезу // Український медичний альманах.-2000.-Т.3, №3. – С. 88-92.
6. Титок М.Г., Евенко А.А., Аджамиян Ф.И. Модели сахарного диабета, их выбор и использование в экспериментальных исследованиях // Биополимеры и клеткаю.-1999. Т.15, №2. – С.103-108.
7. Dyck R.I., Thomas P.K. Diabetic Neuropathy. 2—nd ed. — Philadelphia: W. B. Saunders, 1999.—575 p.
8. Häcker G. The morphology of apoptosis // Cell Tissue Res.-2000.-Vol.301.—P. 5-17.
9. Jenner P., Olanow C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease // Neurology.-1996.-Vol.47, №6.- Suppl.3.- P. 5161-5170.
10. Mattson M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders // Nat. Rev. Mol. Cell Biol.-2000.-Vol, №2.- P. 120-129.



11. Russel Y.W., Sullivan K.A., Windebank A.Y., Hermann O.N., Feldman E.L. Neuron undergo opoptosis in animal and cell culture models of diabetes // *Neurobiology of Disease*.-1999.-Vol. 6, №5.- P. 347-363.
12. Srinivasan S., Stevens M., Wiley Y.W. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction // *Diabetes*.-2000.-Vol.49, Issue 11.- P. 1932-1938.

**SUMMARY**

**THE STRUCTURAL CHANGES OF SIMPLE REFLEX ARCH'S COMPONENT PARTS OF THE RATS WITH STREPTOZOTOCIN – INDUCED DIABETES AND THEIR CORRECTION OF NICOTINAMIDE**

**Kryvko Yu. Ya.**

We have studied structural changes of the simple reflex arch's component parts (motor and sensor neurons, nerve fibers of sciatic nerve) on the level L4-L5 of spinal cord of the rats with streptozotocin-induced diabetes. Typical apoptotic nuclear changes are observed. These results imply a new pathogenetic mechanism for diabetic neuropathy. With identification of mechanisms that either promote or prevent neuronal apoptosis come new approaches for preventing and treating diabetic neuropathy. In this situation nicotinamide has been demonstrated to be inhibitor of apoptosis.

**Key words:** neurons, nerve fibers, morphology, streptosotocin-induced diabetes, nicotinamide.