

УДК 612.6.052:612.822.2:612.826.4:612.616.31

Н. Д. Носенко, Л. Ф. Бурчинская, А. Г. Резников

Эффекты введения 6-гидроксидофамина новорожденным крысам-самкам и половая дифференциация мозга

Вивчені морфофункціональні характеристики результату дії введеного у неонатальний період розвитку організму самок щурів нейротоксину 6-гідроксидофаміну (6-ОНДА) на стан катехоламінергічних терміналей середнього узвишся, вміст катехоламінів (КА) у гіпоталамусі й полову циклічність інтактних та андрогенизованих тварин. 6-ОНДА посилював стерилізуючий ефект пропіонату тестостерону (ПТ), який вводили на 5-у добу життя (50 мкг). Нездатність 6-ОНДА запобігати розвиткові ановуляторній стерильності у андрогенизованих у неонатальний період розвитку самок щурів, можливо, зв'язана із збереженням концентрації ДА в гіпоталамусі на незмінному рівні та відсутністю істотних змін КА-ергічних терміналей середнього узвишся у критичний період статевої диференціації мозку.

Введение

Половые различия структурно-функциональной организации нейроэндокринной системы формируются в ранний период онтогенеза под влиянием половых гормонов. Нарушения катехоламинергической системы мозга способны модифицировать организующее влияние андрогенов на развивающиеся нервные центры регуляции репродуктивной функции. Ведущая роль в реализации действия андрогенов на формирование циклической секреции гонадотропинов принадлежит норадреналину (НА) [5, 6]. Ранее нами было показано, что вызываемая пропионатом тестостерона (ПТ) дефеминизация мозга самок крыс сопровождается подъемом содержания в тканях гипоталамуса катехоламинов (КА) в критический период половой дифференциации мозга (ПДМ) [5, 16]. Была установлена связь между протекторным действием ингибитора синтеза КА α -метил- n -тирозина (α МПТ) в отношении развития ановуляторной стерильности (АС) у андрогенизированных в неонатальный период развития самок крыс и его способностью предотвращать индуцированный ПТ подъем содержания НА в гипоталамусе новорожденных крыс [16, 17]. Некоторые авторы [15, 20] не согласны с нашей точкой зрения о роли КА в ПДМ. Они ссылаются при этом только на результаты изучения половой цикличности для оценки превентивного действия α МПТ и нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-ОНДА), который избирательно повреждает секретирующие НА нейроны ствола мозга, на ход развития АС под влиянием ПТ, введенного в организм в неонатальный период развития. Вместе с тем в работах наших оппонентов отсутствуют доказательства повреждающего действия 6-ОНДА на ультраструктуру КА-ергических терминалей и содержание КА в гипоталамических структурах.

В связи с этим возникла необходимость изучить, во-первых, формирование половой цикличности у самок крыс после введения 6-ОНДА в неонатальный период развития (без и в сочетании с тестостероном), во-вторых, ультраструктуру КА-ергических терминалей срединного воз-

© Н. Д. НОСЕНКО, Л. Ф. БУРЧИНСКАЯ, А. Г. РЕЗНИКОВ, 1993

вышения и содержания КА в гипоталамусе в критический период андрогензависимой половой дифференциации мозга, а также сопоставить полученные результаты изучения.

Методика

Исследования проведены на 118 самках крыс линии Вистар, которым в течение первых двух суток жизни (день рождения считали первым днем жизни) вводили гидрохлорид 6-ОН ДА (фирма «Serva», Германия; 100 мг/кг), растворенный в 0,04 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия, содержащего 0,1 % аскорбиновой кислоты (I группа животных), 50 мкг ПТ, растворенного в 0,05 мл косточкового масла, однократно на 5-е сутки после рождения (II группа животных), 6-ОН ДА в сочетании с ПТ (III группа животных). Контрольная группа животных получала в те же сроки растворители указанных препаратов. Следует отметить, что, по результатам предварительных исследований, нами установлена индифферентность действия указанных растворителей на изучаемые показатели. Это дало основание усреднить все значения показателей, полученные при введении растворителей, и пользоваться общим контролем для всех вводимых в организм животных препаратов. Все инъекции производили подкожно, так как в этом возрасте гематоэнцефалический барьер еще не сформирован, поэтому такой способ введения препарата не препятствует его свободному проникновению в мозг. Крыс декапитировали на 10-е и 90-е сутки жизни.

У крыс 10-суточного возраста на холоду извлекали мозг, выделяли гипоталамус и срединное возвышение. Содержание НА и дофамина (ДА) в объединенных (взятых от 2—3 животных) образцах ткани гипоталамуса определяли спектрофлуориметрическим методом [10]. Ультроструктурный анализ состояния КА-ергических терминалей проводили в наружной зоне срединного возвышения. Срединное возвышение помещали на 4 ч в охлажденный фиксатор—2,5 %-ный раствор глутаральдегида, приготовленный на фосфатном буфере (0,1 моль/л; pH 7,4), содержащем 4,5 %-ную сахарозу. Затем эту область гипоталамуса разрезали на маленькие кусочки и оставляли в этом же фиксаторе еще на 2 ч. После промывки измельченной ткани фосфатным буфером кусочки дополнительно фиксировали в 1 %-ном растворе осмиевой кислоты в течение 1 ч и далее заливали в аралдит по общепринятой схеме. Ультратонкие срезы подвергали двойному контрастированию уранилацетатом и лимонно-кислым свинцом. Срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-7A при напряжении 75 кВ. Полутонкие срезы окрашивали парафенилендиамином.

Часть подопытных животных находилась под наблюдением в течение 3 мес. У них регистрировали сроки открытия вагины, методом микроскопического анализа вагинальных мазков изучали половую циклич-

Таблица 1. Показатели полового созревания и овариального цикла у самок крыс 6-гидроксидофамина (6-ОН ДА) или его сочетания с пропионатом тестостерона (ПТ)

Условия опыта	Число крыс	Время открытия вагины, сут	
		M±m	P
Введение растворителей препаратов (контрольная группа животных — К)	14	42,4±0,4	
Введение 6-ОН ДА (I группа животных)	7	43,6±1,8	$P_{K,I} > 0,5$
Введение ПТ (II группа животных)	13	39,6±0,8	$P_{K,II} < 0,01$ $P_{I,II} > 0,05$
Введение 6-ОН ДА в сочетании с ПТ (III группа животных)	15	45,1±1,9	$P_{K,III} > 0,1$ $P_{I,III} > 0,5$ $P_{II,III} < 0,002$

ность. По достижении 90-суточного возраста животных декапитировали и взвешивали яичники. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Введение новорожденным самкам крыс 6-ОН ДА (100 мг/кг) не влияло на сроки пубертации, половую цикличность и массу яичников самок крыс при достижении половозрелого возраста (табл. 1). Системное введение 6-ОН ДА совместно с ПТ несколько повышало частоту возникновения АС (86,7 % при воздействии 6-ОН ДА и ПТ по сравнению с 69,2 % при воздействии одним ПТ), однако препятствовало преждевременному открытию вагины и задерживало наступление персистентного эструса ($P < 0,02$). Масса яичников у крыс при введении 6-ОН ДА и ПТ, равно как и при воздействии одного ПТ, была достоверно ниже, чем у контрольных животных и самок, обработанных 6-ОН ДА ($P < 0,001$).

Однократная инъекция 50 мкг ПТ на 5-е сутки после рождения крыс вызывала увеличение концентрации НА и ДА в гипоталамусе самок в критический период ПДМ (табл. 2, 1-я серия опытов, $P < 0,05$), что согласуется с результатами наших предыдущих исследований [16]. Применение 6-ОН ДА в неонатальный период онтогенеза не устраняло индуцированное ПТ увеличение содержания КА в гипоталамусе (2-я серия опытов): содержание НА и ДА в гипоталамусе самок крыс 10-суточного возраста было таким же повышенным, как и у крыс, обработанных одним ПТ ($P < 0,05$). Раннее воздействие одного 6-ОН ДА (без ПТ) не вызывало достоверных изменений содержания КА в гипоталамусе по сравнению с контролем (3-я серия опытов, $P < 0,05$).

Полученные нами результаты изучения формирования половой цикличности у самок крыс после введения им 6-ОН ДА (без и в сочетании с тестостероном) в неонатальный период согласуются с результатами изучения ультраструктуры КА-ергических терминалей срединного возвышения и содержания КА в гипоталамусе в критический период андрогензависимой половой дифференциации мозга.

Электронно-микроскопические исследования не показали каких-либо массивных дегенеративных изменений КА-ергических терминалей в наружной зоне срединного возвышения у самок крыс 10-суточного возраста, получавших в первые дни жизни 6-ОН ДА, по сравнению с животными контрольной группы. Лишь в единичных аксонных терминалях II типа (предположительно дофаминергических), содержавших гранулярные и округлые прозрачные синаптические пузырьки, отмечали признаки дегенерации в виде мембранных и осмиофильных телец. Кроме того, в 6—8 % аксонных терминалей этого типа наблюдали гиперплазию элементов гладкого эндоплазматического ретикулума и появление

3-месячного возраста после введения в неонатальный период развития организма

Время начала персистентного эструса, сут ($M \pm m$)	Абсолютное число крыс с персистентным эструсом	Относительное число крыс с ановуляторной стерильностью, % общего	Масса яичников, рассчитанная на 100 г животного, мг	
			$M \pm m$	P
—	0	0	$35,8 \pm 1,4$	
—	0	0	$31,8 \pm 1,4$	$P_{K, I} > 0,05$
$50,3 \pm 5,1$	9	69,2	$17,3 \pm 1,3$	$P_{K, II} < 0,001$ $P_{I, II} < 0,001$
$71,1 \pm 1,9$	13	86,7	$19,2 \pm 1,4$	$P_{K, III} < 0,001$ $P_{I, III} < 0,001$ $P_{II, III} > 0,5$

Т а б л и ц а 2. Содержание катехоламинов в гипоталамусе самок крыс 10-суточного возраста после введения в неонатальный период развития организма 6-гидроксидофамина (6-ОН ДА) или его сочетания с пропионатом тестостерона (ПТ)

Условия опыта	Число животных в опыте	Концентрация катехоламинов в ткани, нмоль/г	
		Норадреналин	Дофамин
1-я серия опыта			
Введение растворителя препарата (контроль)	12	$3,34 \pm 0,33$	$2,82 \pm 0,49$
Введение ПТ	13	$4,54 \pm 0,38^*$	$4,72 \pm 0,27^{**}$
2-я серия опыта			
Введение растворителя препарата (контроль)	12	$3,74 \pm 1,11$	$5,64 \pm 0,37$
Введение ПТ и 6-ОН ДА	12	$2,45 \pm 0,09$	$5,74 \pm 0,54$
3-я серия опыта			
Введение растворителя препарата	10	$3,32 \pm 0,19$	$6,37 \pm 0,46$
Введение 6-ОН ДА	10	$2,84 \pm 0,12$	$4,99 \pm 0,52$

* $P < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем. ** $P < 0,001$ по сравнению с соответствующим контролем.

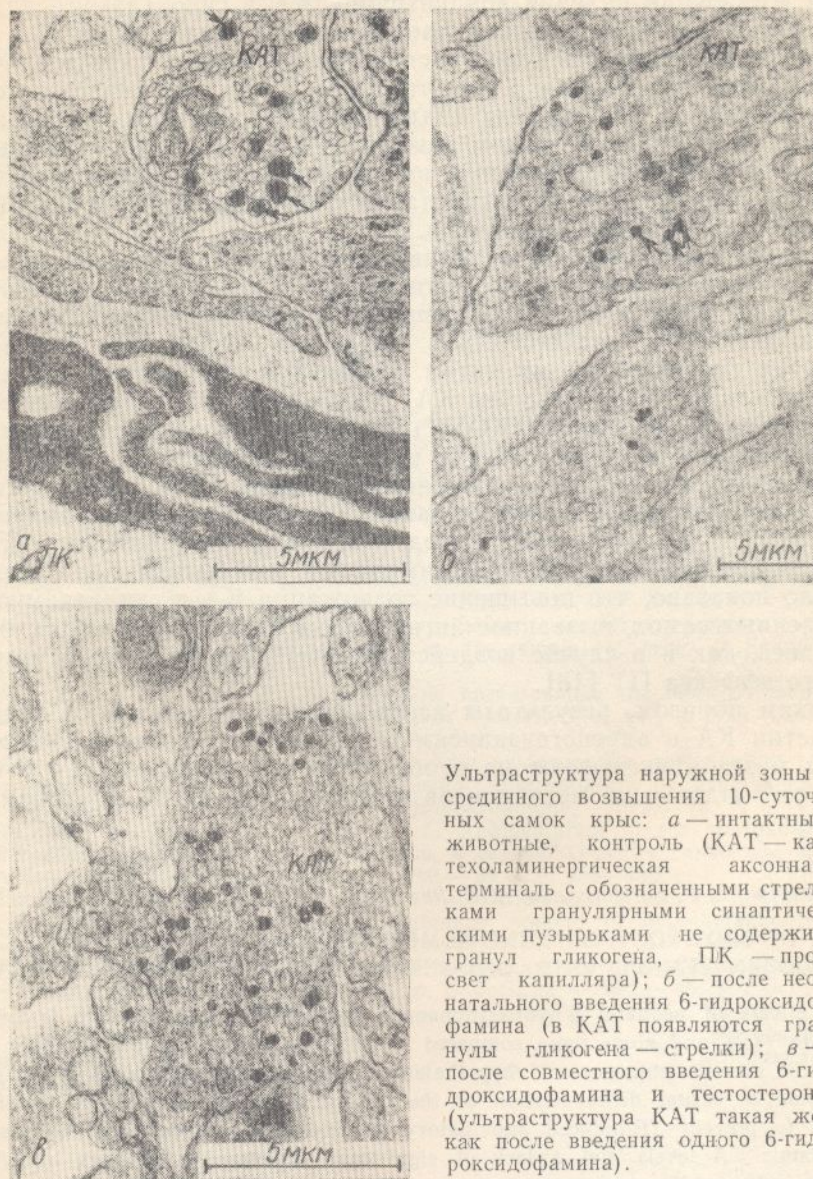
гранул гликогена, что указывает на происходящие в них пластическую перестройку и снижение функциональной активности [4, 7] (рисунок, а, б). Не обнаружено также существенных отличий и в ультраструктуре волоконных и клеточных элементов наружной зоны срединного возвышения при введении одного 6-ОН ДА и при его сочетании с ПТ (рисунок, б, в).

Как известно, КА-ергическая иннервация наружной зоны срединного возвышения осуществляется в основном ДА-ергическими нейронами, тела и аксоны которых формируют туберо-инфундибулярную систему с проекциями в срединное возвышение и гипофиз и связанную с регуляцией секреции гонадотропинов. НА-ергическое звено КА-ергической иннервации срединного возвышения представлено главным образом вентральным НА-ергическим трактом, аксоны которого концентрируются во внутренней зоне срединного возвышения. По результатам наших исследований, признаки дегенерации после воздействия в неонатальный период 6-ОН ДА обнаружены только в единичных аксонных терминалях наружной зоны срединного возвышения, в которой преобладает ДА-ергическая иннервация, являющаяся (в отличие от НА-ергической) более устойчивой к действию 6-ОН ДА [3, 12]. Так, с помощью гистолюминесцентного метода показано, что у взрослых животных после воздействия на их организм в неонатальный период 6-ОН ДА интенсивность свечения КА-ергических структур в наружной зоне лишь несколько снижалась, в то время как во внутренней — оно практически исчезало [3]. Вместе с тем мы не обнаружили достоверных изменений содержания НА и ДА в гипоталамусе крыс 10-суточного возраста, получавших в первые дни жизни 6-ОН ДА. По имеющимся в литературе данным [8], максимальное падение концентрации НА в нервной ткани наблюдается спустя 2 нед после инъекции 6-ОН ДА в латеральный желудочек головного мозга. Сопоставляя результаты биохимического и ультраструктурного анализов, можно заключить, что сохранение концентрации КА в гипоталамусе на одном уровне у интактных и андрогенизированных в неонатальный период развития организма крыс, получавших 6-ОН ДА, объясняется несущественным повреждением КА-ергических терминалей. При этом не исключена возможность их частичной регенерации. По данным Jonsson [11], восстановление содержания КА в поврежденных, но не разрушенных нейротоксиком, КА-ергических терминалях наблюдалось спустя 3—7 сут после воздействия, что почти совпадает со временем определения КА в наших исследованиях. Кроме того, данные о дифференцированном характере

изменени
а также
янием во
исключая
мические
области

врежд
ние др
потала
С
действ
ловозр
введен
сстоя
держа
Т
ни) в
КА-ер

изменений содержания КА в дискретных гипоталамических ядрах [19], а также гиппокампе, коре и других структурах мозга [13, 14] под влиянием воздействия на организм в неонатальный период 6-ОН ДА, не исключают возможности того, что, с одной стороны, не все гипоталамические терминалы КА-секретирующих нейронов, локализованных в области синего пятна (*locus coeruleus*), могут в одинаковой мере по-



Ультраструктура наружной зоны срединного возвышения 10-суточных самок крыс: а — интактные животные, контроль (КАТ — катехоламинергическая аксонная терминаль с обозначенными стрелками гранулярными синаптическими пузырьками не содержит гранул гликогена, ПК — просвет капилляра); б — после неонатального введения 6-гидроксидофамина (в КАТ появляются гранулы гликогена — стрелки); в — после совместного введения 6-гидроксидофамина и тестостерона (ультраструктура КАТ такая же, как после введения одного 6-гидроксидофамина).

вреждаться 6-ОН ДА, с другой стороны, предполагается существование других мало изученных источников НА-ергической иннервации гипоталамуса.

Следует отметить, что в большинстве работ анализ токсического действия 6-ОН ДА на КА-ергическую систему мозга проводился на половозрелых животных и лишь единичные сведения касались влияния введения 6-ОН ДА животным в неонатальный период их развития на состояние КА-ергических структур центральной нервной системы, содержание КА и поведение половозрелых и молодых крыс [1—3, 9].

Таким образом, можно заключить, что раннее (в первые сутки жизни) воздействие 6-ОН ДА не вызывает существенного повреждения КА-ергических структур срединного возвышения у интактных и андро-

генизированных в неонатальный период развития самок 10-суточного возраста, а вызывает лишь пластическую перестройку и дегенерацию единичных аксонных терминалей II типа (предположительно ДА-ергических по своей ультраструктурной организации). Это согласуется с тем, что не обнаружено достоверных изменений содержания КА в гипоталамусе после воздействия 6-ОН ДА. Тот факт, что в наших исследованиях мы не установили падения концентрации КА в гипоталамусе андрогенизированных и получавших в ранний период жизни 6-ОН ДА крыс, объясняет неспособность нейротоксина предотвращать развитие АС, индуцированной ПТ. Данные о том, что 6-ОН ДА не оказывает протекторного действия на последствия андрогенизации животных в неонатальный период, отмеченные рядом авторов [15, 20] и подтвержденные результатами наших исследований, не противоречат положению о вовлечении КА в дифференциацию гипоталамических центров регуляции циклической секреции гонадотропинов.

По современным представлениям, важная роль в реализации дефеминизирующего влияния андрогенов на ПДМ самок крыс принадлежит катехолэстрогенам (КЭ), образующимся в нервной ткани в результате последовательной метаболической конверсии тестостерона по ароматизационному и гидроксиплазному путям. В связи с катехоловой структурой КЭ метаболизируются (подобно КА) *о*-метилированием при участии катехол-*о*-метилтрансферазы (КОМТ), осуществляя таким образом прямую биохимическую связь между половыми стероидами и КА.

Согласно гипотезе, предложенной Резниковым [6], ключевое место в механизме повышения концентрации КА в гипоталамусе андрогенизированных в неонатальный период самок крыс принадлежит КЭ, которые, взаимодействуя с КОМТ, замедляют метаболизм КА. Ранее нами было показано, что повышение содержания КА в гипоталамусе новорожденных самок, вызванное ингибитором КОМТ трополоном, сопровождалось, как и в случае воздействия 6-ОН ДА, усилением стерилизующего эффекта ПТ [18].

Таким образом, результаты исследования подтверждают гипотезу об участии КА в адреногензависимых нарушениях половой дифференциации мозга и указывают на необходимость взаимодействия КА, половых стероидов и их метаболитов в этих процессах по механизму коиндукции.

N. D. Nosenko, L. F. Burchinskaya, A. G. Reznikov

EFFECT OF 6-HYDROXYDOPAMINE ADMINISTRATION TO NEWBORN FEMALE RATS AND SEX DIFFERENTIATION OF THE BRAIN

Remote effects of neonatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA) combined with testosterone propionate (TP) and alone were compared to ultrastructure of catecholaminergic terminals of the median eminence and hypothalamic catecholamine (CA) content in the critical period of sexual differentiation of the brain. It is suggested that inability of 6-OHDA to prevent TP-induced anovulatory sterility is connected with the preserved hypothalamic CA levels and a lack of significant degenerative changes in CA-ergic terminals in the median eminence.

Ukrainian Research Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev
A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громова Е. А., Семенова Т. П., Грищенко Н. И. Механизмы токсического действия 6-оксидофамина на катехоламинергические структуры мозга // *Нейрохимия*.— 1985.— 4.— С. 427—441.
2. Громова Е. А., Семенова Т. П., Грищенко Н. И. Влияние острой и хронической депривации активности катехоламинергических систем, вызванной 6-оксидофамином, на поведение животных // *Журн. высш. нерв. деятельности*.— 1986.— 35, № 6.— С. 1133—1141.

3. Конста...
4. Косиц...
5. Носен...
6. Резни...
7. Bondo...
8. Descan...
9. Gusta...
10. Jacob...
11. Jonss...
12. Looki...
13. O'She...
14. Papp...
15. Raum...
16. Rezn...
17. Rezn...
18. Rezn...
19. Verst...
20. Vidal...

Укр. нау...
эндокрин...
М-ва здр...

УДК 612.8

И. Н. Дь...

Сравни...
нерва...
и сери...

У дослі...
ню нап...
муляції

© И. Н. Д...

ISSN 0201