

DOI: 10.26693/jmbs03.06.031

УДК 611.817.17.018:615.212.7:616-092.9

Матешук-Вацеба Л. Р.<sup>1</sup>, Бекесевич А. М.<sup>1</sup>, Олійник І. Ю.<sup>2</sup>, Зінько А. В.<sup>1</sup>

## ВПЛИВ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ОПІОЇДУ НА УЛЬТРАСТРУКТУРНУ ОРГАНІЗАЦІЮ БІЛОЇ РЕЧОВИНИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна<sup>2</sup>ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», Чернівці, Україна

lvatseba@gmail.com

olijnyk1961@gmail.com

Дослідження проведено на 24 статевозрілих білих щурах-самцях із початковою масою 160–180 г, віком 3 місяці з метою встановлення особливостей зміни ультраструктури білої речовини головного мозку в динаміці тривалого впливу налбуфіну. Встановлено, що перші зміни ультраструктури білої речовини головного мозку на фоні тривалого введення налбуфіну експериментальним тваринам спостерігаються вже через 2 тижні введення препарату і наростають упродовж наступних термінів експерименту. Основними проявами нейропатії за умов 6-тижневого введення налбуфіну є деструктивність осьових циліндрів нервових волокон та гліальних клітин. Практичне значення отриманих результатів полягає у створенні морфологічної основи для розуміння патогенезу та подальшого пошуку оптимальних методів лікування неврологічних захворювань у пацієнтів, змушених упродовж тривалого часу застосовувати опіоїди.

**Ключові слова:** біла речовина головного мозку, ультраструктурна організація, білий щур, налбуфін.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження проведено в рамках виконання фрагменту планової комплексної науково-дослідної роботи «Структурна організація, ангіоархітектоніка та антропометричні особливості органів у внутрішньо- та позаутробному періодах розвитку, за умов екзо- та ендопатогенних факторів», № державної реєстрації 0115U000041.

**Вступ.** Опіоїди супроводжують людство багато тисячоліть, але, на жаль, проблема наркоманії не стає менш актуальною [8, 6, 15, 19]. Водночас, сучасна практична медицина, особливо в хірургічних та онкологічних клініках, з метою знеболювання широко застосовує опіоїди [2, 3, 11, 12, 17]. Розвиток фармакотерапії наркотичних речовин вимагає розробки заходів профілактики та корекції викликаних ними побічних ефектів і ускладнень, особливо

з боку головного мозку, чутливого до медикаментозного впливу внаслідок особливості своєї будови та функції [1, 4, 5, 7, 18]. Однак багато з цих досліджень носять характер окремих спостережень і відповідні узагальнені висновки не завжди виявляються достатньо обґрунтованими [9, 10, 14, 16]. За даними ООН у світі існує до 21 млн. споживачів опіатів і, незважаючи на зусилля світової спільноти, споживання немає тенденції до зменшення [6, 9, 11]. Існує низка невирішених питань щодо проблем структурної перебудови білої речовини головного мозку при вживанні наркотичних середників.

**Мета дослідження** – встановити особливості ультраструктури білої речовини головного мозку білого щура в динаміці тривалого впливу опіоїду.

**Матеріал і методи дослідження.** Дослідження виконані на 24 статевозрілих білих щурах-самцях із початковою масою 160–180 г, віком 3 місяці. Усіх тварин утримували в умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Із загальної кількості експериментальних тварин взято 15 тварин, яких було розділено на три групи відповідно трьом серіям дослідів: у першій серії дослідів (5 тварин) – вивчали зміни ультраструктури білої речовини головного мозку щурів після введення опіоїду налбуфіну впродовж 2 тижнів; у другій серії дослідів (5 тварин) – вивчали зміни ультраструктури білої речовини головного мозку у відповідь на введення цього ж опіоїду впродовж 4 тижнів; у третій серії дослідів (5 тварин) – вивчали стан ультраструктурної організації білої речовини головного мозку щурів через 6 тижнів впливу налбуфіну в експерименті. Контролем слугували решта 9 білих щурів, яким вводили 0,9% розчин хлориду натрію. Евтаназію тварин проводили шляхом передозування внутрішньоочеревинного наркозу з використанням тіопенталу натрію (із розрахунку 25 мг/кг маси тіла тварини). Експерименти проведені відповідно до положення Європейської конвенції щодо захисту хребетних

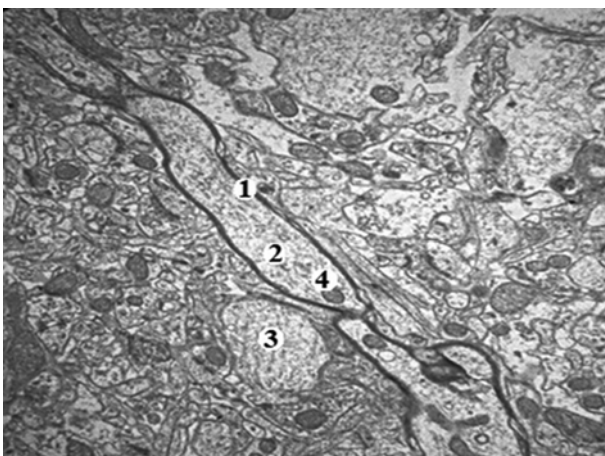
тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Для моделювання тривалого впливу опіюду застосовували методику фізичної опіюдної залежності в щурів, модельованої шляхом щоденного (1 раз на добу в однаковий проміжок часу) введення наркотичного анальгетика налбуфін (патент № 76564 U Україна, Онисько Р. М. та ін., 2013).

Препарат вводили внутрішньом'язово за наступною схемою: I тиждень – 8 мг/кг, II тиждень – 15 мг/кг, III тиждень – 20 мг/кг, IV тиждень – 25 мг/кг, V тиждень – 30 мг/кг, VI тиждень – 35 мг/кг [13]. Терміни експериментального впливу опіюду склали 2, 4, 6 тижнів від початку експерименту. Електронно-мікроскопічне дослідження білої речовини головного мозку білих щурів за умов тривалого впливу налбуфіну проводили на електронному мікроскопі УЕМВ-100К при прискорювальній напрузі 75 кВ і збільшеннях  $\times 4000$  –  $\times 8000$ .

#### Результати дослідження та їх обговорення.

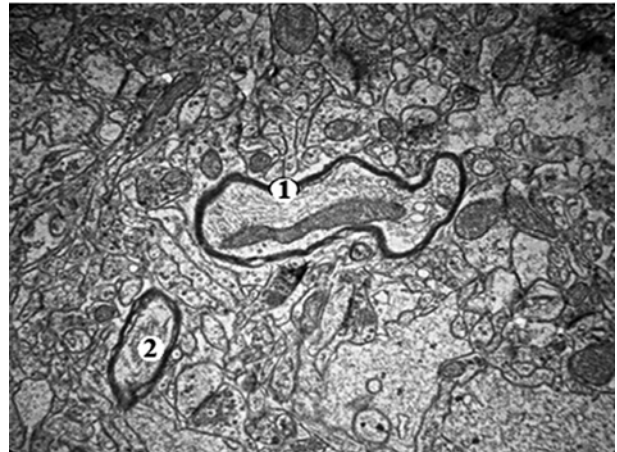
Через 2 тижні перебігу експерименту нервові волокна білої речовини головного мозку ще не мають ознак ушкодження і структура їх практично відповідає контролю (рис. 1). Але в деяких мієлінових волокнах виявлено потовщення і дезорганізацію мієлінової оболонки, проте збережена її неперервність, аксоплазма містить поодинокі гіпертрофовані мітохондрії (рис. 2).

Ядра нейрореміцитів мають чіткі контури, але значно зменшується кількість конденсованого хроматину. Ядерце зміщене ближче до ядерної оболонки, перинуклеарний простір розширений.



**Рис. 1.** Збережені нервові волокна мозолистого тіла білого щура через 2 тижні введення налбуфіну. Електронна мікрофотографія. 36.  $\times 4000$ :

1 – мієлінова оболонка; 2 – аксоплазма; 3 – безмієлінове волокно; 4 – мітохондрія



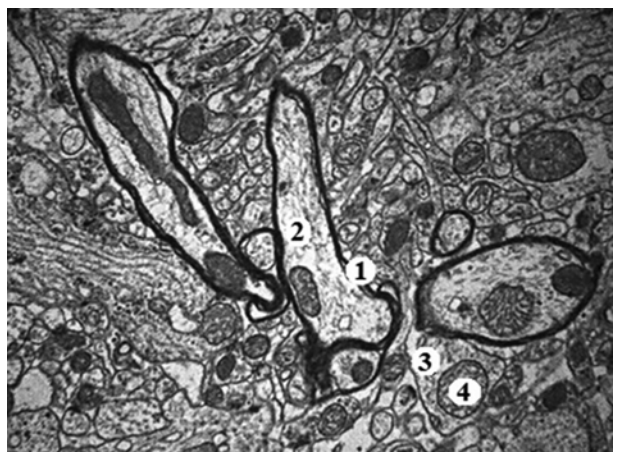
**Рис. 2.** Ультратонкий зріз ділянки променистого вінця кінцевого мозку білого щура через 2 тижні введення налбуфіну. Електронна мікрофотографія. 36.  $\times 4000$ :

1 – потовщення і дезорганізація мієлінової оболонки нервових волокон; 2 – гіпертрофована мітохондрія

Кількість органел у цитоплазмі нейрореміцитів не змінюється. Елементи нейроглії частково гіпертрофовані, але наслідкової гліальної реакції не спостерігали. Перичелюлярні простори помірно розширені. Виявлено розширений прошарок аморфної речовини між пучками нервових волокон, що є морфологічним проявом порушення мікроциркуляції.

Через 4 тижні введення налбуфіну виявлено набряк осьових циліндрів нервових волокон (рис. 3). Аксоплазма неоднорідної електронної щільності, темні ділянки чергуються зі світлими, зменшується кількість органел.

Осьові циліндри безмієлінових волокон містять великі округлі та овальні мітохондрії зі зруйнованими



**Рис. 3.** Ультратонкий зріз ділянки променистого вінця кінцевого мозку білого щура через 4 тижні введення налбуфіну. Електронна мікрофотографія. 36.  $\times 8000$ :

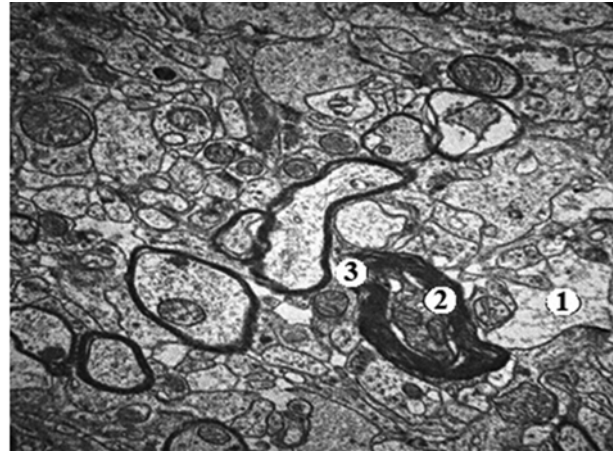
1 – мієлінове нервові волокно; 2 – набряк аксоплазми нервових волокон; 3 – безмієлінове волокно; 4 – набряк мітохондрії

кристами. Спостерігається деструкція мієліну, деформація мієлінових оболонок нервових волокон, розшарування мієліну. Розміщені між пучками нервових волокон олігодендроцити гіпертрофовані, з ознаками лізису хроматину. Цитоплазма олігодендроцитів білої речовини кінцевого мозку просвітлена і набрякла, ядра гіпертрофовані, із зубчастою ядерною оболонкою і містять конденсований хроматин.

В ядрах містяться 1–2 ядерця. Ядра різко гіперхромні, зморщені, зернисті, з нечіткими контурами. Ядерця не контуруються, виявлено пікноморфні форми клітин, у деяких клітинах спостерігається каріолізіс та каріорексис. Спостерігається вакуолізація цитоплазми.

Через 6 тижнів перебігу експерименту безмієлінові нервові волокна фрагментовані. Мієлінові нервові волокна на поперечному перерізі набувають неправильної форми. Про це свідчать овальні випини та інвагінаціями або зірчасті контури мієлінових оболонок, які оточують нервові волокна (рис. 4).

Присутній периаksonальний набряк, пошкодження аксоплазми. В аксоплазмі виявлено лише окремі мікротрубочки і пошкоджені мітохондрії зі зруйнованими кристами, подекуди – лізис цитоплазми. Осьові циліндри нервових волокон у стані гідропічної дистрофії. У гліальних клітинах білої речовини головного мозку виявлено вакуольну дистрофію цитоплазми. Спостерігається відшарування плазмолем аксонів від мієлінових оболонок і формування електроннопрозорих просторів між ними. Подекуди важко диференціювати шари мієлінової оболонки. Ураховуючи, що саме відростки олігодендроцитів утворюють мієлінову оболонку нервових волокон білої речовини кінцевого мозку, можна стверджувати, що процес демієлінізації (дегенерації мієлінової оболонки) нервових волокон відбувається внаслідок деструкції цих клітин, наявність аутофаголізосом свідчить про цитоліз.



**Рис. 4.** Ультратонкий зріз ділянки мозолистого тіла білого шура з нервовими волокнами через 6 тижнів введення налбуфіну. Електронна мікрофотографія. 36.  $\times$  4000:

1 – фрагментоване безмієлінове нервове волокно; 2 – неправильної форми мієлінове нервове волокно; 3 – овальний випин мієлінової оболонки

В астро- та олігодендроцитах відбуваються процеси дегенерації, що проявляється каріопікнозом, розпадом ядра, спостерігається конденсація грудок гетерохроматину, деструктивні процеси мікроглії.

**Висновок.** Перші зміни ультраструктури білої речовини головного мозку спостерігаються вже через 2 тижні введення налбуфіну експериментальним тваринам і наростають упродовж наступних термінів експерименту. Основними проявами нейропатії за умов 6-тижневого введення налбуфіну є деструктурованість осьових циліндрів нервових волокон та гліальних клітин.

**Перспективи подальших досліджень.** Вважаємо за доцільне продовжити вивчення ультраструктурних змін білої речовини головного мозку щурів на тривалий вплив опіоїдів із застосуванням медикаментозної корекції.

## References

1. Bekesevych AM. Morfometrychnyi analiz anhiоarkhitektoniky kory mozochka za umov vplyvu opioidu. *Svit medytsyny ta biolohii*. 2014; 4: 68–71. [Ukrainian]
2. Cherepkova EV, Gribacheva IA. Issledovanie polimorfizmov ryada genov neyromediatornoy sistemy golovnoho mozga i opioidnoy retseptsii u narkotiziruyuschihysya. *Byulleten sibirskoy meditsiny*. 2009; 8(3): 49–54. [Russian]
3. Choi S, Han KM, Won E, Yoon BJ, Lee MS, Ham BJ. Association of brain-derived neurotrophic factor DNA methylation and reduced white matter integrity in the anterior corona radiata in major depression. *J Affect Disord*. 2014; 172: 74–80. PMID: 25451398. DOI: 10.1016/j.jad.2014.09.042
4. Di Paola M, Luders E, Cherubini A, Sanchez-Castaneda C, Thompson PM, Toga AW, Caltagirone C, Orobello S, Elifani F, Squitieri F, Sabatini U. Multimodal MRI analysis of the corpus callosum reveals white matter differences in pre-symptomatic and early Huntington's disease. *Cereb Cortex*. 2012; 22(12): 2858–66. PMID: 22223853. DOI: 10.1093/cercor/bhr360
5. Fesenko UA. Opioidy v lechenii boli, chto myi znaem o nih segodnya? *Bil zneboliuvannia i intensyvna terapiia*. 2013; 1: 34–46. [Ukrainian]



6. Ismailova Yu, Altaeva A, Ahmetov Zh, Selivohina N. Patomorfogeneticheskie aspekty vliyaniya opiatnykh analgetikov na organizm cheloveka (obzor). *Vestnik Kazahskogo Natsionalnogo meditsinskogo universiteta*. 2014; 1: 75–7. [Russian]
7. Kryzhna SI, Larianovskaia YuB. Morfolohichne doslidzhennia holovnoho mozku shchuriv v umovakh eksperymentalnoi porfirynopatii. *Svit medytsyny ta biolohii*. 2012; 2: 113–7. [Ukrainian]
8. Lelevich VV, Vinnitskaya AG, Abazid H. Vliyanie morfinovoy intoksikatsii na aktivnost GAMK-shunta v nekotorykh otdelakh golovnoho mozga kryis. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2011; 3: 29–31. [Russian]
9. Markhon NO, Mamchur VI, Zhyliuk VI. Morfolohichniy analiz hemomikrotsyrkuliarnoho rusla shchuriv za umov eksperymentalnoho metabolichnoho syndromu v umovakh zastosuvannia propilenhlikolevoho ekstraktu horobyny. *Ukrainskyi biofarmatsevtichnyi zhurnal*. 2015; 5: 54–5. [Ukrainian]
10. Meng Y, Xiao Q, Bai JY, Xiao X, Zhang Sh, Zhu X-Y, Cheng G-F, Yin D-L. Resolution and chiral recognition of muscone as well as actions on neural system. *J Asian Nat Prod Res*. 2014; 16(12): 1166–70. <https://doi.org/10.1080/10286020.2014.996141>
11. Obara I, Parkitna JR, Korostynski M, Makuch W, Kaminska D, Przewlocka B, Przewlocki R. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain*. 2009; 141(3): 283–91. PMID: 19147290. DOI: 10.1016/j.pain.2008.12.006
12. Opryshko VI. Vplyv kombinatsii tramadolu i drotaverynu na strukturno-funktsionalnu orhanizatsiiu holovnoho mozku. *Medychni perspektyvy*. 2009; 2: 35–9. [Ukrainian]
13. *Patent 76564 Ukraine*, MPK A 61 K 31/00. Sposib modeliuvannia fizychnoi opioidnoi zalezhnosti u shchuriv / Onysko RM, Paltov YeV, Fik VB, Vilkhova IV, Kryvko Yu, Yakymiv Ila, Fitkalo OS (UA); zayavnik i vlasnik patentu Lvivskyi natsionalnyi medychnyi universytet imeni Danyla Halytskoho MOZ Ukraine (UA). № U201207124; zaiavi 12.06.2012; opubl 10.01.2013, Biul № 1. [Ukrainian]
14. Roy M, Shohamy D, Daw N, Jepma M, Wimmer GE, Wager TD. Representation of aversive prediction errors in the human periaqueductal gray. *Nat Neurosci*. 2014; 17(11): 1607–12. PMID: 25282614. PMCID: PMC4213247. DOI: 10.1038/nn.3832
15. Shepit'ko VI. Novi mozhyvosti kompiuternoї tomohrafiї v antropometrychnykh doslidzhenniakh cherepa. *Svit medytsyny ta biolohii*. 2014; 10(2): 203–8. [Ukrainian]
16. Shitov LN. Nemeditsinske ispolzovanie opioidnogo analgetika nalbufina v kontekste izmeneniya struktury potrebleniya narkoticheskikh sredstv i psihotropnykh veschestv. *Narkologiya*. 2012; 11: 76–80. [Russian]
17. Tsymbaliuk VI, Nosov AT, Semenova VM, et al. Ultrastrukturni osoblyvosti protsesu orhanizatsii v zoni travmatychnoho poskodzhennia spynnoho mozku ta implantatsii syntetychnoho makroporystoho hidroheliu. *Ukrainskyi neirokhirurhichnyi zhurnal*. 2009; 4: 51–6. [Ukrainian]
18. Yamdeu RS, Shaqura M, Mousa SA, Schäfer M, Droese J. Mitogen-activated protein kinase activation by nerve growth factor in primary sensory neurons upregulates  $\mu$ -opioid receptors to enhance opioid responsiveness toward better pain control. *Anesthesiology*. 2011; 114(1): 150–61. doi:10.1097/ALN.0b013e318201c88c
19. Zin'ko AV, Mateshuk-Vatseba LR. Vplyv opioidu na ultrastrukturu promenyistoho vintsia kintsevoho mozku v eksperimenti. *Svit medytsyny ta biolohii*. 2014; 4(47): 127–30. [Ukrainian]

УДК 611.817.17.018:615.212.7:616-092.9

**ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ОПИОИДА  
НА УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА  
ГОЛОВНОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Матешук-Вацеба Л. Р., Бекесевич А. М., Олійник І. Ю., Зинько А. В.**

**Резюме.** Исследование проведено на 24 половозрелых белых крысах-самцах с начальной массой 160–180 г, в возрасте 3 месяца с целью установления особенностей ультраструктурных изменений белого вещества головного мозга в динамике длительного воздействия налбуфина. Установлено, что первые изменения ультраструктуры белого вещества головного мозга на фоне длительного введения налбуфина на экспериментальным животным наблюдаются уже через 2 недели введения препарата и нарастают в течение следующих этапов эксперимента. Основными проявлениями нейропатии в условиях 6-недельного введения налбуфина является деструктурированность осевых цилиндров нервных волокон и глиальных клеток. Практическое значение полученных результатов заключается в создании морфологической основы для понимания патогенеза и дальнейшего поиска оптимальных методов лечения неврологических заболеваний у пациентов, вынужденных в течение длительного времени применять опиоиды.

**Ключевые слова:** белое вещество головного мозга, ультраструктурная организация, белая крыса, налбуфин.

UDC 611.817.17.018:615.212.7:616-092.9

**The Influence of Long-Term Opioid Administration on the Ultrastructural Organization of the White Substance of the Brain in the Experiment**

*Mateshuk-Vatseba L. R., Bekesevych A. M., Oliinyk I. Yu., Zin'ko A. V.*

**Abstract.** According to the UN there are up to 21 million opiate users in the world. Despite the efforts of the world community, opioid consumption does not tend to decrease. However, opioids are widely used as anesthesia in the modern practical medicine, especially in surgical and oncology clinics. The development of narcotics pharmacotherapy requires the issuing prevention and correction activities against resulting side effects and complications, especially on the part of the brain that is sensitive to drug effects due to the peculiarities of its structure and function. There are a number of unresolved questions on the problem of structural adjustment of the white substance of the brain with the long-term use of narcotic drugs. Our study reveals a portion of the ultrastructural features of the restructuring of the white substance of the brain as a result of the long-term opioid nalbuphine administration.

*The purpose of the study* was to establish the peculiarities of the ultrastructure of the white substance of the brain of white rats in the dynamics of the long-term opioid influence.

*Material and methods.* The studies were performed on 24 sexually mature white male-rats with the initial mass of 160–180 g, aged 3 months. Fifteen animals were taken from the total number of experimental animals and were divided into three groups accordingly to the three series of experiments: the changes in the ultrastructure of the white substance of the rat brain after opioid nalbuphine administration for 2 weeks were studied in the first series of experiments (5 animals); the changes in the ultrastructure of the white substance of the brain in response to the administration of the same opioid for 4 weeks were studied in the second series of experiments (5 animals); the state of the ultrastructural organization of the white substance of the rat brain after the influence of nalbuphine for 6 weeks in the experiment was studied in the third series of experiments (5 animals). The remaining 9 white rats served as a control group, and they were injected with 0.9% solution of sodium chloride.

Modeling of opioid dependence in rats was achieved using the methodology according to the patent of Ukraine № 76564 (R. M. Onysko and others, 2013). The electron microscopic study of the white substance of the brain of white rats in conditions of the long-term nalbuphine influence was performed on electronic microscope UEMV–100K at the accelerating voltage of 75 kV and magnifications  $\times 4000 - \times 8000$ .

*Results and discussion.* After 2 weeks of the experiment, the nerve fibers of the white substance of the brain still did not have signs of damage and their structure is practically consistent with control. Thickening and disorganization of the myelin sheath were detected in some myelinated fibers, in axoplasm, single mitochondria were hypertrophied.

After 4 weeks of nalbuphine administration, the swelling of the axis cylinders of nerve fibers was revealed; the number of organelles was reducing in axoplasm. The destruction of myelin, the deformation of the myelin sheaths of nerve fibers, and separation of myelin were observed.

After 6 weeks course of the experiment, non-myelinated nerve fibers were fragmented. Myelinated nerve fibers in the transverse section became irregular, as evidenced by ovals with stitches and invaginations, or stellar contours of myelin membranes surrounding nerve fibers.

*Conclusions.* The first changes of the ultrastructure of the white substance of the brain were observed after 2 weeks of opioid nalbuphine administration to experimental animals and they were growing during the following periods of the experiment. The main manifestations of neuropathy in a 6-week nalbuphine administration were the destructuring of the axial cylinders of nerve fibers and glial cells.

**Keywords:** the white substance of the brain, ultrastructural organization, the white rat, nalbuphine.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

Стаття надійшла 09.07.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування