

ORIGINALNI NAUČNI RADOVI

ULOGA HIPOTALAMUSNIH LEZIJA U STERILITETU ŽENA EKSPERIMENTALNO PROUČAVANJE

Vuka KATIĆ, Stevo NAJMAN, Jelena ŽIVANOV-ČURLIS,
Vladmila BOJANIĆ, Marko MATIJAŠ i Snežana JANČIĆ

*Institut za patologiju Kliničkog centra, Institut za biologiju sa genetikom
Medicinskog fakulteta i Klinika za neurologiju Kliničkog centra u Nišu*

Anovulativni ciklusi i amenoreja u bolesnica sa Cushing-ovim sindromom, udruženi sa sterilitetom, kušingoidni tip gojaznosti u našem eksperimentu, kao i kontradiktorni podaci o neplodnosti pacova i miševa u identičnom eksperimentu, razlozi su za proučavanje funkcije i morfologije jajnika u životinja tretiranih mononatrijum glutatomom (MNG).

Eksperimentalna grupa crnih miševa C57BL/6.T soja ženskog pola je tretirana intraperitonealno rastvorom MNG u dozi od 4.4 mg/g telesne težine, od prvog do devetog dana posle rođenja. Parenje tretiranih ženki sa netretiranim mužjacima je izvršeno nakon 90 dana starosti; ove ženke su žrtvovane nakon 120 dana od rođenja. Jajnici su odstranjeni i fiksirani u rastvoru 10% formaldehida, ručno obrađeni i sečeni na mikrotomu. Parafinski preseći su bojani HE, PAS i Van Gieson metodama. Identičan postupak je primenjen i na kontrolnu grupu životinja, oba pola.

Sve tretirane ženke su bile sterilne. Ovarijumi su bili uvećani, cistični, bez žutih ili albikantnih tela. U kontrolnih ženki, nađeni su Graf-ovi folikuli u različitoj fazi sazrevanja, kao i luteinizovana stroma.

U radu je diskutovan poremećaj funkcije hipotalamo-hipofizogonadne ose, uslovljen oštećenjem hipotalamusnih regija koje sekretuju različite "releasing" hormone.

Ključne reči: hipotalamusna gojaznost, mononatrijum glutamat, sterilnost, cistični ovarijumi

Uvod

Pored smrtnosti, ništa manje značajan faktor za opstanak jedne nacije nije ni problem steriliteta. Zahvaljujući razvoju medicinske nauke, uzroci sekundarnog steriliteta danas se sve lakše i brže otkrivaju, a samim tim i uspešno otklanjaju. Međutim, geneza primarnog steriliteta je često nedokučiva, čak i kada se ovom dijagnostikom bave visokostručne i specijalizovane ginekološke ustanove.

Činjenice daju najčešći uzrok steriliteta žena poremećaj ovulacije, kao i da je poremećena funkcijska sinhronizacija između "releasing" faktora

hipotalamusa, gonadotropina hipofize i ovarijalnih hormona (Guyton, 1995), usmerile su brojne istraživače ka proučavanju hipotalamo-hipofizo-ovarijalnih lezija, kako u sterilnih žena sa anovulativnim ciklusom, tako i u sličnim eksperimentalnim mode lima (Redding et al., 1971; Ochi et al., 1998).

Saopštenja o lezijama različitih jedara i nerava hipotalamusa u glodara koji su prvih nekoliko dana od rođenja tretirani mononatrijum glutamatom (MNG) ukazala su na brojne endokrine poremećaje ovih životinja u adultnom periodu (Cushing-ov tip gojaznosti, steroidni tip dijabetesa, atrofija limforetikularnih organa) (Tokuyama i sar., 1989; Katić i sar., 1995), kao i na sterilitet mužjaka koji je posledica odsutne spermatogeneze (Katić i sar., 1997).

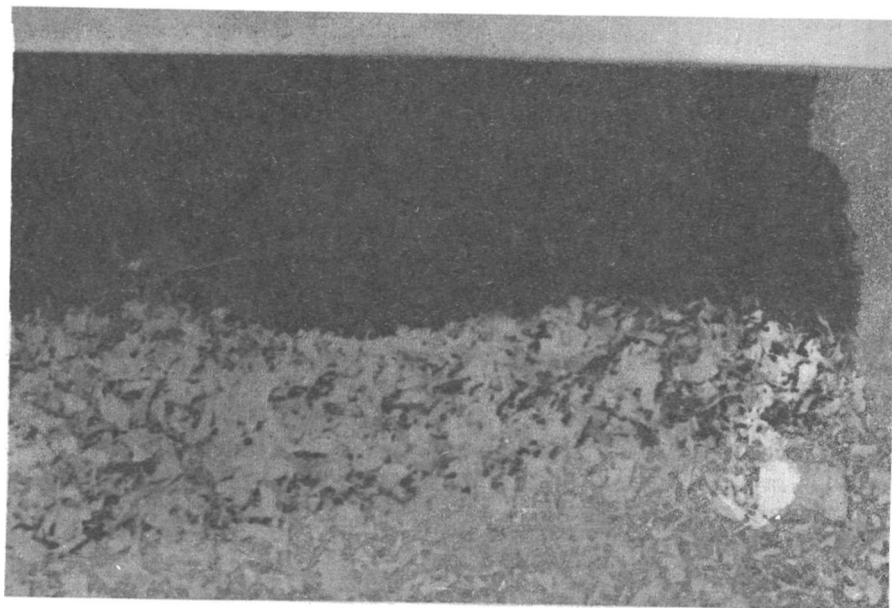
Cilj rada

Proučavanje funkcije i morfoloških promena ovarijuma u miševa sa lezijama hipotalamusa, izazvanim mononatrijum glutamatom.

Matcrijal i metode

Crni miševi C57BL/6.1 soja podeljeni su u dve grupe: kontrolnu i eksperimentalnu. U svakoj grupi je bilo po 12 miševa, oba pola.

Novorođene životinje su tretirane od prvog do desetog dana rastvorom MNG potkožno, jedanput dnevno, u dozi od 4.4mg/g telesne mase (slika 1).



Slika 1. Novorođeni miševi

Parenje tretiranih ženki s kontrolnim (netretiranim) mužjacima je izvršeno devedesetog dana od rođenja. Nakon što dvadeset dana su sve životinje žrtvovane. Jajnici su odstranjeni i fiksirani u rastvoru 10% formaldehida, u trajanju od 24 h. Laboratorijska obrada ovanjalnih isečaka je obavljena ručno. Parafinski preseći bojeni su sledećim metodama:

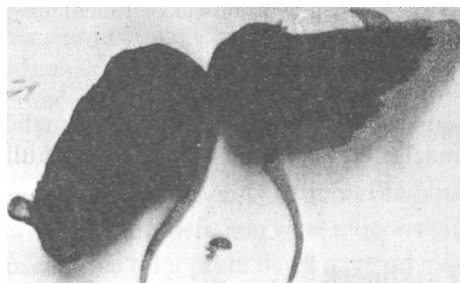
1. Klasičnom HE metodom, za verifikaciju histoloških promena jajnika;
2. Histoheмијskom Van Gieson metodom, za procenu atretičnih folikula;
3. Histoheмијskom AB-PAS metodom (AB=pH 2,5), za ispitivanje sadržaja u cistama.

Rezultati ispitivanja

Eksperimentalna grupa

Gojaznost životinja je evidentna, buffalo-tipa (slika 2).

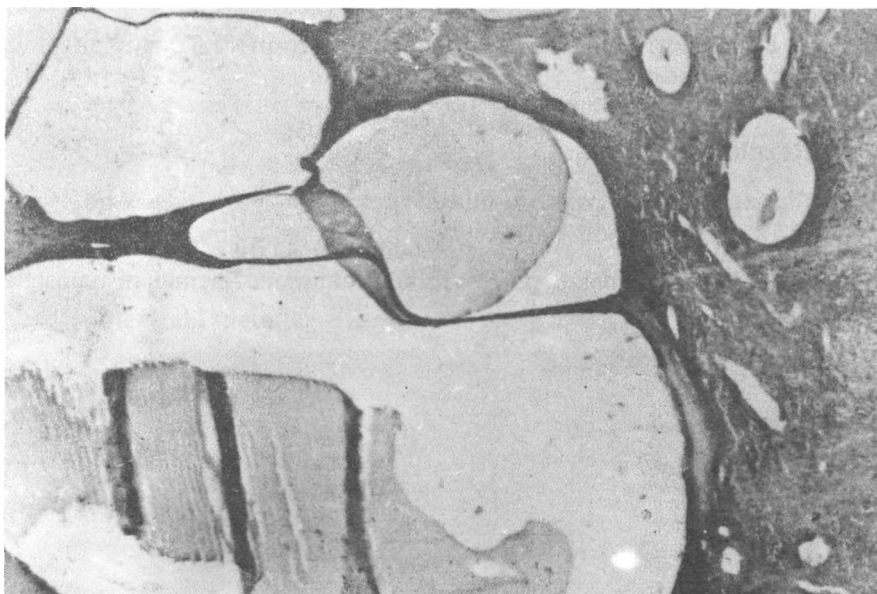
Tretirane ženke, nakon parenja sa kontrolnim mužjacima, nisu postale gravidne.



Slika 2. Upadljivo povećanje poprečnog prečnika trupa leve životinje (crtica)

Njihovi ovarijumi sastavljeni su od mnogobrojnih cističnih formacija (od 3-5 mm), providnih zidova, ispunjenih bistrom žućkastom tečnošću; tanak zid, debljine 1 mm, je sa unutrašnje strane obložen glatkim, sjajnim, beličastim epitelom.

Patohistološki, cistični folikuli pokriveni su atrofičnim granuloznim slojem ćelija, bez luteinizovane theca interna. Theca externa je slabije vaskularizovana, građena od kolagenih vlakana (slika 3).



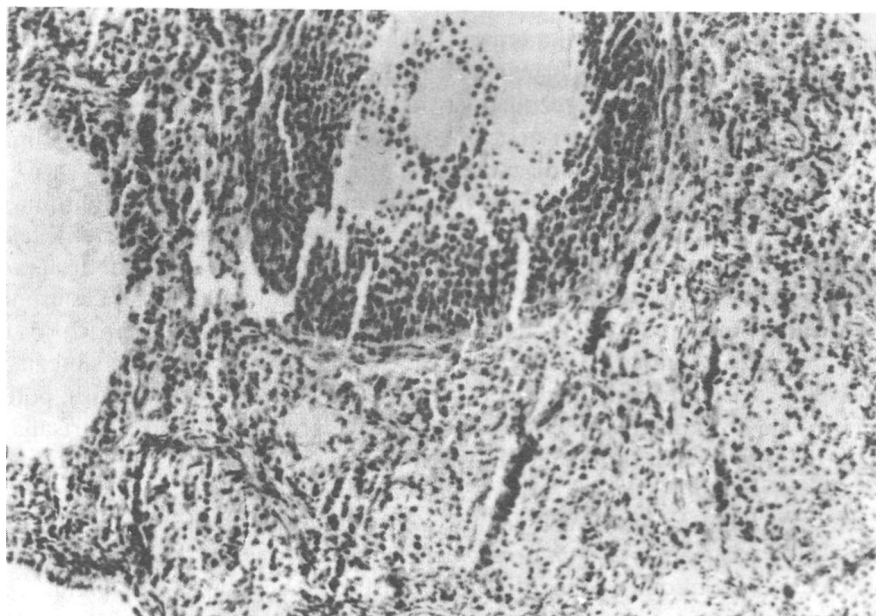
Slika 3. Cistični ovarijumi eksperimentalne grupe

Kontrolna grupa

Ovarijumi su sadržali ovarijalne folikule u različitoj fazi sazrevanja, bez cističnih formacija, sa prisutnim atretičnim folikulima (znak ovulacije) (slika 4).

Diskusija i zaključak

Zahvaljujući tesnoj funkcijskoj povezanosti između "releasing" hormona hipotalamusa, FSH i LH hipofize, kao i estrogena i estradiola ovarijuma, odvija se kompletno sazrevanje samo jednog ovuma u toku jednog menstrualnog ciklusa i samo 400 u toku reproduktivnog perioda žene (Guyton, 1995). Zahvaljujući ovoj hormonskoj saradnji, primordijalni folikul prolazi kroz različite faze sazrevanja da bi u periodu ovulacije istisnuo ovarijalnu ćeliju sposobnu za oplodjenje. S toga je razumljivo da će se



Slika 4. Ovarijalni folikul u sazrevanju kontrolne grupe

poremećaj funkcije bilo koje od 3 navedene karike odraziti na ovulaciju, a samim tim i na plodnost žene.

Dok uzroci apsolutnog hiperestrogenizma leže u ovarijumima i s lakoćom se otkrivaju, dotle se uzroci u hipofizi teže otkrivaju i još teže leče u našoj zemlji. Međutim, patološke lezije izvora kako stimulativnih, tako i inhibitornih signala, tj. hipotalamusa, još uvek klinički su nedokučive (Cotran i sar., 1994).

Ukoliko se ima na umu činjenica da su anovulativni ciklusi odgovorni za sterilitet u 30% žena, onda su razumljive težnje mnogih autora i za eksperimentalno proučavanje funkcijskih i morfoloških oštećenja hipotalamusa (Olney, 1969; Lechon i sar., 1976; Poon i Cameron, 1978; Ochi i sar., 1988).

U žiži eksperimentalnih istraživanja se neprestano nalazi eksperimentalni model hipotalamusne gojaznosti, izazvane mononatrijum glutamatom i to parenteralnim unošenjem u toku prvih deset dana od rođenja (Katić sar., 1995; Katić i sar., 1996; Bojanić, 1998).

Na osnovu višegodišnjeg istraživanja grupe autora navedene u ovom radu, a u okviru naučnog projekta koji je finansiralo Ministarstvo za nauku Srbije (br. 13M17) poslednjih 5 godina, na eksperimentalnom radu u trajanju od 12 meseci, dokazani su: Cushing-ov tip hipotalamusne gojaznosti, kao i mnoge kliničke karakteristike ovog sindroma (Katić i sar., 1995, 1996a, 1996b, 1997, 1998, 2001).

Značajna karakteristika žena sa Cushing-ovim sindromom, amenoreja, udružena sa sterilitetom (*Guyton*, 1995), takođe je patogenetski nedovoljno proučena. Naši prethodni rezultati su suprotni od rezultata *Olney-a* (1969) i odnose se na atrofiju testisa i na sterilitet mužjaka (*Katić i sar.*, 1997) životinja sa hipotalamusnim tipom gojaznosti.

Sterilitet ženki u ovom radu je udružen s policističnim ovarijumima i pokazatelj je anovulativnih ciklusa. Uzrok ovog funkcijskog poremećaja ovarijuma nalazi se u multifokalnim nekrotičnim lezijama hipotalamusa, pre svega u predelu njegove baze (preoptičkih i arkuatnih jedara, kao i neurona eminencije mediane-nuclei tuberales) (*Orhi i sar.*, 1998; *Katić i sar.*, 2001, u štampi). Hipotalamusne lezije ne štete neurone koji stimulišu sintezu i sekreciju gonadotropina dovodeći do nastajanja anovulativnih ciklusa, policističnih ovarijuma i steriliteta. Budući da su u hipotalamusu skoncentrisana i peptidergična vlakna koja sekretuju SRIF (Somatostatin Releasing Inhibiting Factor) (inhibitor sinteze ACTH), kao i neuroni na čijim se završecima sekretuju LH-RH, njihovo razaranje verovatno omogućuje hipersekreciju ACTH i nastajanje Cushing-ovog sindroma s jedne strane, kao i hiposekreciju (asekreciju) gonadotropina i nastajanje anovulativnih ciklusa, s druge strane.

Međutim, da bi se dokazale ove pretpostavke, potrebna su dalja eksperimentalna istraživanja na kriostatskim presecima hipotalamusa, kao i njihovo tretiranje na prisustvo/odsustvo peptidergičnih vlakana koji sekretuju SRIF i onih koji sekretuju LH-RH.

T pored toga što se MNG koristi u eksperimentalne svrhe za proučavanje patogeneze hipotalamusne gojaznosti i steriliteta, njegov toksični efekat na pojedina jedra i nerve hipotalamusa je dokazan samo pri aplikaciji određenim sojevima pacova i miševa samo u toku prvih 9 dana od rođenja. Toksični efekat MNG u periodu novorođenčadi objašnjava se propustljivom hematoencefalnom barijerom samo u ovom periodu; odrasle životinje, sa zreloom hematoencefalnom barijerom, otporne su na efekte MNG na hipotalamus (*Bojanić*, 1998). Zbog toga se adultne osobe ne moraju odreći unošenja MNG u organizam, budući da, kao aditiv (u vegeti), MNG ima široku primenu u prehrambeno-farmaceutskoj industriji.

Naša težnja, ovom prilikom, nije bila otkriće etioloških faktora steriliteta, već proučavanje složenih, hipotalamo-hipofizo-ovarijalnih mehanizama, čestih vinovnika "bele kuge" u mnogim razvijenim zemljama sveta, pa i u našoj zemlji.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da u osnovi policističnih ovarijuma, anovulativnih ciklusa i steriliteta leže hipotalamusne selektivne nekrotične lezije.

Literatura

Bojanić, V. V. (1998). Izučavanje patogeneze gojaznosti, indukovane mononatrijum glutatom. Doktorska disertacija. Univerzitet. Niš.

Cotran, R.S., Kumar. V. and Robbins. S.L. (1994). Robbins Pathologic Basis of Disease. W. B. Saunders Company. Philadelphia - London - Tokyo.

Guyton, A. C. (1995). Textbook of Medical Physiology. W. B. Saunders Company. Philadelphia - London - Tokyo.

Katić, V., Matijaš, M. and Najman, S. (1995). Study on adrenal glands in obese mice treated with mononatrium glutamate. Pathology Research and Practice, *164*, 24-25.

Katić, V., Matijaš, M., Najman, S., Milosavljević, D., Petrović, D. i Karanikolić, A. (1996). Imunocitohemijske karakterislike D ćelija pankreasa u Cushing-ovom sindromu (eksperimentalna studija). Acta medica Medianae, *5*, 5-12.

Katić, K., Ristić, T., Lazarević, V. and Katić, V. (1996a). B cells in obese mice. Cytometry (Supplement), *8*, 130-130.

Katić, V., Najman, S., Vukanović, A. and Velojić, M. (1996b). Spleen atrophy in glutamate treated mice - new approach on Cushing's obesity. International Journal of Hematology (Supplement 1), *64*, 78-79.

Katić, V., Najman, S., Stanković, T., Matijaš, M. and Katić, K. (1997) Testicular function and morphology in mice treated with monosodium glutamate. Pathology Research and Practice (Supplement), *193*, 385-385.

Katić, V., Najman, S., Dindić, B. and Živanović, J. (1998). New approach on Cushing's type of obesity in mice treated with monosodium glutamate. Archives d'Anatomie et de cytologie pathologiques, *46*, 356-357.

Katić, K., Bojanić, V. and Katić, V. (2001). Hypothalamic lesions in obese mice, induced by MNG. Arch, of Oncology (in press).

Ochi, M., Sawada, T. Kusunoki, T. and Hattori, T. (1988). Morphology and cell dynamics of adipose tissue in hypothalamic obese mice. AM. J. Physiol., *254*, R740-R745.

Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. Science, *164*, 719-721.

Poon, T. K. Y. and Cameron, D. P. (1978). Measurement of oxygen consumption and locomotor activity in monosodium glutamate - induced obesity. Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab. Gastrointest. Physiol., *3*, E532-E534.

Redding, T. W., Schally, W. A. V., Arimura, A. and Wakabayashi, I. (1971). Effect of monosodium glutamate on some endocrine function. Neuroendocrinol. *8*, 245-255.

Tokuyama, K. and Himms-Hagen, J. (1989). Adrenalectomy prevents obesity in glutamate-treated mice. Am. J. Physiol. *257* (Endocrinol. Metab., *20*): E139-W144.

**ROLE DES LESIONS D'HYPOTHALAMUS CHEZ LES FEMMES
STERILES - ETUDE EXPERIMENTALE**

Vuka KATIĆ, Stevo NAJMAN, Jelena ŽIVANOV-ČURLIS,
Vladmila BOJANIĆ, Marko MATIJAŠ et Snežana JANČIĆ

*Institut pour la pathologie du Centre (Unique, Institut pour la biologie avec la
genetique de la Faculte de Medecine et Clinique pour la neurologie du Centre
clinique de Niš*

Les cycles anovulatifs et l'amenorrhée chez les malades avec le syndrome de Cushing, associés avec la stérilité, le type de Cushing de la coïpulence dans notre expériment ainsi que les données contradictoires sur l'infécondité des rats et des souris sont des raisons pour l'étude de la fonction et de la morphologie des ovaires des animaux traités par monosodium glutamate (MSG).

Le groupe expérimental des souris noirs C57BL/6J du sexe féminin est traité intrapéritonealement par la solution MSG dosée de 4,4 mg/g du poids corporel, du premier à la neuvième jour après la naissance. La copulation des femelles traitées avec les mâles non-traités est faite après 90 jours; ces femelles sont sacrifiées après 120 jours de naissance. Les ovaires sont ablatés et fixés dans la solution de 10% formaldéhyde, traités à main et coupés sur microtome. Les coupes de paraffine sont colorées par la méthode de HE, PAS et Van Gieson. Le processus identique est appliqué aussi sur le groupe de contrôle des animaux de deux sexes.

Toutes les femelles traitées ont été stériles. Les ovaires étaient agrandis, sans corps jaunes et blanchâtres. Chez les femelles dans le groupe de contrôle on a trouvé des follicules de Graf dans les diverses phases de la maturation ainsi que la strome lutéinisée.

Dans le travail on a discuté sur la perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyséogonade, conditionnée par l'endommagement des régions de l'hypothalamus qui sécrètent les divers "releasing" hormones.

Lex mots vies: Corpulence d'hypothalamus, monosodium glutamate,
ovaires cystiques

**THE ROLE OF THE HYPOTHALAMUS LESIONS IN WOMEN'S
STERILITY - AN EXPERIMENTAL STUDY**

Vuka KATIĆ, Stevo NAJMAN, Jelena ŽIVANOV-ČURLIS,
Vladmila BOJANIĆ, Marko MATIJAŠ and Snežana JANČIĆ

*Institute for Pathology of the Clinic Center, Institute for Biology with Genetics of
the Faculty of Medicine and Clinic for Neurology of the Clinic Center, Niš*

The anovulatory cycles and amenorrhea in the female patients with Cushing's syndrome, coupled with sterility, the Cushingoid type of obesity in our experiment as

well as contradictory data about sterility of rats and mice in the identical experiment represent the reasons for studying the function and morphology of the ovaries in the animals treated by monosodium glutamate (MSG).

The experimental group of the black mice C57BL/6.T of the female gender has been treated by an intraperitoneal solution of MSG in the dose of 4,4 mg/g of the body-weight from the first to the ninth day after birth. The coupling of the treated females with the untreated males was done after 90 days of age; these females were sacrificed 120 days after birth. The ovaries were removed and fixed in the solution of 10% formaldehyde, manually treated and cut on the microtome. The paraffin sections were colored by HE, PAS and Van Gieson methods. The identical procedure was also applied to the control group of animals of both sexes.

All the treated animals were sterile. The ovaries were enlarged, cystic, without yellow or albinic bodies. In the control females, there were Graaf follicles found in various phases of maturation as well as luteinized stroma.

The paper discusses the disturbance of the hypothalamus-hypophysis-gonad axis caused by the damage of the hypothalamus regions secreting various "releasing" hormones.

Key words: Hypothalamus obesity, monosodium glutamate, cystic ovaries

Autor: Prof, dr sci Vuka Katić, patolog, Institut za patologiju Kliničkog centra u Nišu; kućna adresa: Niš, Bulevar Nemanjića 74/13.

(Rad je Uredništvo primilo 18. februara 2001. godine)

