

Погляд на проблему

УДК 615.212.7:[616.831.4:616.379-008.64]

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЛЕЙ-ЕНКЕФАЛІНЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ АРКУАТНИХ ЯДЕР ГІПОТАЛАМУСА В ДИНАМІЦІ РОЗВИТКУ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ДІАБЕТУ У ЩУРІВ

©А. В. Абрамов, М. М. Карнаух, О. В. Мельникова, Г. І. Бессараб

Запорізький державний медичний університет

РЕЗЮМЕ. У щурів в динаміці експериментального діабету імунофлуоресцентним методом в суб'ядрах аркуатних ядер гіпоталамуса (АрЯ) вивчено розподіл нейронів, які синтезують лей-енкефалін. Визначені їх морфометричні характеристики й кількісні показники накопичення лей-енкефаліну. Встановлено, що в нормі лей-енкефалін синтезується поодинокими клітинами АрЯ, переважно в його дорсомедіальному суб'ядрі. При діабеті в АрЯ посилюється експресія лей-енкефаліну, в 2–3 рази збільшується чисельність нейроцитів, що синтезують його. Через 5 тижнів з початку розвитку діабету у венролатеральному суб'ядрі АрЯ на 44 % збільшується вміст лей-енкефаліну в нейросекреторних клітинах і на 49 % – в їх аксонах. В дорсомедіальному суб'ядрі АрЯ ці показники більш вражаючі: вміст лей-енкефаліну в нейросекреторних клітинах підвищується на 98 %, а в аксонах – на 80 %. Посилення синтезу і секреції лей-енкефаліну в суб'ядрах АрЯ при експериментальному діабеті супроводжується майже 13-разовим зростанням вмісту нейропептиду в серединному підвищенні гіпоталамуса. Отримані результати свідчать про те, що для лей-енкефалінергічної системи гіпоталамуса притаманна активна участь в нейроендокринній відповіді організму на розвиток цукрового діабету.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лей-енкефалін, цукровий діабет, гіпоталамус

Вступ. Опіоїдні нейропептиди, до яких належать лей- і мет-енкефаліни та бета-ендорфін, є одним з компонентів нейросекрету нейронів аркуатних ядер гіпоталамуса, які відіграють важливу роль не тільки в ендокринній регуляції тропної функції аденогіпофіза, але й як компонент стрес-лімітуючої системи нейроендокринної відповіді організму на стрес. При цьому лише поодинокі публікації присвячено нейроендокринній відповіді на метаболічний стрес, який розвивається внаслідок цукрового діабету і свідчать про зміну функціональної активності опіатергічної системи гіпоталамуса як при експериментальному діабеті, так і при обох його клінічних формах [1–4, 7, 9]. У попередніх наших дослідженнях було доведено підвищення синтезу й секреції лей-енкефаліну (лейЕ) в дрібноклітинних та крупноклітинних суб'ядрах паравентрикулярних ядер гіпоталамуса [3,4]. Проте дані про характер синтезу лей-енкефаліну в аркуатних ядрах гіпоталамуса, які є одним із провідних місць синтезу опіоїдів, досі відсутні.

Метою дослідження було вивчити особливості синтезу і секреції лей-енкефаліну в окремих суб'ядрах аркуатних ядер гіпоталамуса в динаміці розвитку експериментального діабету.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проведено на 22 щурах-самцях лінії Вістар масою 250–270 г. Цукровий діабет у щурів моделювали одноразовим введенням стрептозоточину

(SIGMA Chemical, США) у дозі 50 мг/кг. Це призвело до зростання концентрації глюкози в крові до $(6,0 \pm 0,2)$ ммоль/л наприкінці 2 тижня та до $(8,5 \pm 0,4)$ ммоль/л наприкінці 5 тижня розвитку патологічного процесу. За 48 годин до декапітації тваринам інтрацеребровентрикулярно вводили 120 мкг колхіцину (SIGMA Chemical, США) в 20 мкл 0,9 % розчину NaCl. Ідентифікацію лей-енкефалін-синтезуючих нейронів у структурах гіпоталамуса здійснювали методом непрямой імунофлуоресценції в серійних фронтальних зрізах головного мозку завтовшки 14 мкм. Депарафіновані гістологічні зрізи відмивали у фосфатному буфері (pH = 7,4) та 40 годин інкубували (T = 4-6 °C) з первинними антитілами до лей-енкефаліну (кролячий IgG у розведенні 1:200, виробництво Amersham, Англія). Після відмивання у фосфатному буфері 45 хвилин інкубували (T = 37 °C) з розведеними (1:64) козячими антитілами проти IgG кролика, які кон'юговані з FITC (SIGMA Chemical, США). Після інкубації зрізи відмивали у фосфатному буфері і укладали до гліцерин-буферної суміші (9:1). Імуноцитохімічні дослідження проводили за допомогою комп'ютерної системи цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Zeiss-Kontron Elektronik, Німеччина). Аналіз зображення проводили у автоматичному режимі за допомогою пакета прикладних програм VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина), що дозволяють ідентифікувати ділянки зі статис-

тично значущою флуоресценцією, яка притаманна імунопозитивним нейронам і їх аксонам. Обчислювали площу окремих нейронів (мкм²), концентрацію та вміст нейропептиду (в умовних одиницях імунфлуоресценції – O_{1ф}), а також чисельність імунопозитивних клітин, загальну площу імунопозитивного матеріалу в аксонах та вміст в них лей-енкефаліну у фронтальних зрізах окремих суб'ядер АрЯ й середньому підвищенні гіпоталамуса. За даними чисельності лей-енкефалінімунопозитивних нейронів, вмісту в них і в аксонах нейропептиду розраховували загальний вміст лей-енкефаліну у фронтальному зрізі окремих суб'ядер АрЯ. Експериментальні дані обробляли пакетом прикладних і статистичних програм VIDAS -2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина). Для оцінки досто-

вірності відмінностей у групах застосовували t-критерій Ст'юдента.

Результати й обговорення. Вивчення серійних зрізів гіпоталамуса показало, що у щурів в нормі в аркуатному ядрі (АрЯ) виявлялися лише поодинокі імунопозитивні до лей-енкефаліну (лейЕ) нейрони, причому частіше – в дорсомедіальному суб'ядрі (табл. 1). Імунопозитивні клітини обох суб'ядер мали подібні морфометричні та денситометричні параметри як з тілами нейронів, так і з їх аксонами (табл. 2).

Проте за рахунок більшої чисельності лей-енкефаліну в дорсомедіальному суб'ядрі загальний вміст лей-енкефаліну практично втричі перевищував аналогічні показники вентролатерального суб'ядра (табл. 3).

Таблиця 1. Розподіл нейронів, які синтезують лей-енкефалін, в суб'ядрах АрЯ (M±m)

Суб'ядра АрЯ	Кількість імунопозитивних нейронів		
	контроль	діабет, 2 тиж.	діабет, 5 тиж.
Дорсомедіальне	11±2	26±4 *	20±4 *
Вентролатеральне	3±1	11±2 *	10±1 *

Примітка: (*)достовірність відмінностей p<0,05 по відношенню до контролю.

Таблиця 2. Показники імунореактивності до лей-енкефаліну у нейронах (чисельник), їх аксонах (знаменник) й середньому підвищенні гіпоталамуса (M±m)

Суб'ядра АрЯ	Площа імунореактивного матеріалу, мкм ²			Вміст лей-енкефаліну, O _{1ф}		
	контроль	діабет, 2 тиж.	діабет, 5 тиж.	контроль	діабет, 2 тиж.	діабет, 5 тиж.
Дорсомедіальне	40,3±3,7 26,7±2,8	38,0±2,5 31,4±5,1	47,1±2,9 [#] 30,7±3,6	3,98±0,42 2,35±0,26	3,57±0,25 2,75±0,59	7,86±0,59 ^{#*} 4,22±0,56*
Вентролатеральне	49,4±3,9 26,0±1,3	40,6±4,4 16,9±2,6*	47,7±3,9 37,2±3,38 ^{#*}	4,83±0,37 2,91±0,21	3,41±0,38* 1,20±0,12*	6,97±0,66 ^{#*} 4,34±0,27 ^{#*}
Середнє підвищення гіпоталамуса	509±12	1357±33*	4246±116 ^{#*}	35±1	150±4*	442±12 ^{#*}

Примітка: достовірність відмінностей p<0,05 по відношенню до контролю (*), 2-тижневого діабету ([#]).

Таблиця 3. Загальний вміст (O_{1ф}) лей-енкефаліну в нейронах АрЯ (M±m)

Суб'ядра АрЯ	Контроль	Діабет, 2 тиж.	Діабет, 5 тиж.
Дорсомедіальне	128,6±11,0	254,8±17,1 *	443,1±30,0 ^{#*}
Вентролатеральне	34,8±5,0	98,3±9,9 *	189,0±16,6 ^{#*}

Примітка: достовірність відмінностей p<0,05 по відношенню до контролю (*), 2-тижневого діабету ([#]).

Розвиток цукрового діабету у щурів призводив до підвищення чисельності клітин, імунопозитивних до лейЕ, кількість яких за 2 тижні зростала в 2,5 раза у дорсомедіальному та в 3,5 раза у вентролатеральному суб'ядрі. При цьому якщо в дорсомедіальному суб'ядрі морфометричні та денситометричні параметри не зазнавали суттєвих змін, то у вентролатеральному суб'ядрі на 35 % зменшувалася площа імунореактивного матеріалу в аксонах та на 58 % вміст в них лейЕ. Але, за рахунок збільшення чисельності клітин, імунопозитивних до лейЕ, загальний вміст нейропептиду в дорсомедіальному суб'ядрі АрЯ зростав майже вдвічі, у вентролатеральному суб'ядрі АрЯ в 2,8 раза, а у середньому підвищенні гіпоталамуса – більш ніж учетверо.

Подальший розвиток діабету протягом 5 тижнів не викликав зростання чисельності лейЕ-імунопозитивних нейронів в обох суб'ядрах АрЯ, але призводив до помірної гіпертрофії нейронів дорсомедіального суб'ядра, яка супроводжувалася збільшенням площі імунореактивного матеріалу на 24 %, порівняно з 2-тижневим періодом діабету, та зростанням вмісту лейЕ в нейронах на 98 % й аксонах на 79 %. В той же час у вентролатеральному суб'ядрі АрЯ суттєвого зростання зазнавали площа лейЕ-імунопозитивного матеріалу в аксонах та вміст нейропептиду, які у порівнянні з контролем підвищувалися на 43 % і 49 % відповідно. До того ж, наприкінці 5-го тижня розвитку діабету, в нейронах вентролатерального суб'ядра на 44 %

зростає вміст лейЕ. Саме за цих обставин при діабеті загальний вміст лей-енкефаліну в АрЯ додатково зростає і в дорсомедіальному суб'ядрі в 3,4 раза і перевищував аналогічний показник у інтактних щурів, а в вентролатеральному суб'ядрі – в 5,4 раза. При цьому в серединному підвищенні площа матеріалу, імунореактивного до лейЕ, зростала в 8,3 раза, а вміст нейропептиду в 12,6 раза перевищував показники інтактних щурів.

Таким чином, аналіз функціонального стану лейЕ-ергічної системи АрЯ свідчить про поступове зростання синтезу нейропептиду нейросекреторними клітинами обох суб'ядер та його секреції по аксонах у зовнішню зону серединного підвищення гіпоталамуса. Але слід зазначити, що не тільки лей-енкефалін АрЯ складає імунореактивність останнього, а й секреція нейропептиду лейЕ-ергічними нейро-

нами паравентрикулярних ядер, в яких при діабеті суттєво зростає морфофункціональна активність [1–8, 10].

Висновки. 1. Розвиток цукрового діабету у щурів призводить до зростання в аркуатних ядрах гіпоталамуса чисельності нейронів, які синтезують лей-енкефалін.

2. При експериментальному діабеті в аркуатних ядрах гіпоталамуса зростає синтез лей-енкефаліну та підвищується його секреція у серединне підвищення гіпоталамуса.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з вивченням ефективності центрального та периферійного багаторазового введення синтетичних аналогів лей-енкефаліну з метою корекції нейрогуморальних порушень при експериментальному цукровому діабеті.

ЛІТЕРАТУРА

1. Абрамов А. В. Иммуноцитохимические показатели экспрессии мет-енкефалина в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса при экспериментальном диабете у крыс / А. В. Абрамов, М. Н. Карнаух // Таврический медико-биол. вестник. – 2012. – № 3, Ч.1. – С. 11–14.

2. Абрамов А. В. Характеристика мет-енкефалин-синтезирующей системы крупноклеточных нейронов гипоталамуса в норме и при экспериментальном сахарном диабете / А. В. Абрамов, М. Н. Карнаух // Загальна патологія і клінічна патофізіологія. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 27–30.

3. Карнаух М. Н. Функциональное состояние лей-енкефалин-синтезирующей системы крупноклеточных ядер гипоталамуса при экспериментальном сахарном диабете / М. Н. Карнаух // Патологія. – 2011. – Т. 8, № 2. – С. 21–23.

4. Карнаух М. Н. Особенности экспрессии лей-енкефалина в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса при экспериментальном диабете у крыс / М. Н. Карнаух, Абрамов А. В. // Клінічна та експериментальна патологія. – 2012. – Т. 9, № 3 (41), Ч. 1. – С. 91–93.

5. Колесник Ю. М. Нейроэндокринные и иммунные механизмы развития сахарного диабета / Ю. М. Колесник, А. В. Абрамов // Патологія. – 2005. – Т. 2, № 3. – С. 20–23.

6. Dietary fat stimulates endogenous enkephalin and dynorphin in the paraventricular nucleus: role of circulating triglycerides / G.-Q. Chang, O. Karatayev, R. Ahsan [et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2007. – Vol. 292: – P. E561–E570.

7. STZ-induced diabetes decreases and insulin normalizes POMC mRNA in arcuate nucleus and pituitary in rats / E. M. Kim, M. K. Grace, C. C. Welch [et al.] // Am. J. Physiol. – 1999. – Vol. 276, N5, Pt. 2. – P. 1320–1326.

8. Participation of various divisions of the hypothalamus in the pathogenesis of experimental diabetes in rats / Yu. M. Kolesnik, A. V. Abramov, G. V. Vasilenko, V. A. Zhulinskii // Neurosci. Behav. Physiol. – 1996. – Vol. 26, No.4. – P. 365–371.

9. Diabetes increases the expression of hypothalamic neuropeptides in a spontaneous model of type I diabetes, the nonobese diabetic (NOD) mouse / F. E. Saravia, S. L. Gonzalez, P. Roig, V. Alves [et al.] // Cell. Mol. Neurobiol. – 2001. – Vol. 21, N1. – P. 15–27.

10. Swanson L. W. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei / L. W. Swanson, P. E. Sawchenko // Ann. Rev. Neurosci. – 1983. – V. 6. – P. 269–324.

FUNCTIONAL STATE OF LEU-ENKEPHALINERGIC SYSTEM OF HYPOTALAMIC ARCUATE NUCLEI IN THE COURSE OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES IN RATS

©A. V. Abramov, M. N. Karnaukh, O. V. Melnykova, H. I. Bessarab

Zaporizhzhia State Medical University

SUMMARY. The distribution of the neurons that synthesize leu-enkephalin in subnuclei of arcuate hypothalamic nuclei (ARH) was studied in the course of experimental diabetes in the rats with the help of immune fluorescence method. The neurons' morphometric characteristics and qualitative indices of leu-enkephalin accumulation were studied. It was established that normally leu-enkephalin is synthesized in solitary cells of ARH, mainly of dorsomedial subnucleus. In diabetes expression of leu-enkephalin in ARH rises, the number of neurons that synthesize it increases in 2-3 times. In 5 weeks after diabetes onset the content of leu-enkephalin in ventrolateral subnucleus of ARH is increased by 44 % in neurosecretory cells and by 49 % in their axons. In dorsomedial subnucleus of ARH these indices are more impressive: leu-enkephalin content in neurosecretory cells is increased by 98 % and in axons by 80 %. The intensification of leu-enkephalin synthesis and secretion in ARH subnuclei is accompanied by almost 13-times increase of neuropeptide content in hypothalamus medial eminence. The obtained data evidence about the active participation of leu-enkephalinergic hypothalamic system in neuroendocrine response of the organism to diabetes mellitus development.

KEY WORDS: leu-enkephalin, diabetes mellitus, hypothalamus.