

УДК: 616.831.4-008-092.9-055.62:616.379-008.64-02:618.2
© Ганчева О.В., 2009

ОСОБЕННОСТИ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ АРКУАТНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА У САМЦОВ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР

Ганчева О.В.

Запорожский государственный медицинский университет

Ганчева О.В. Особенности возрастной динамики функциональной активности нейронов аркуатного ядра гипоталамуса у самцов крыс линии вистар // Украинський морфологічний альманах. - 2009. - Том 7, № 4. - С. 14-17.

В ходе проведенного исследования было установлено, что в процессе роста животного размеры нейронов АрЯ и их функциональная активность претерпевают существенные изменения. Наблюдается возрастное уменьшение линейных размеров нейрона и ядра клетки на фоне увеличения содержания в них РНК. Распределение нейронов в аркуатном ядре по площади до 6-месячного возраста характеризуется стабильностью, отмечено преобладание клеток средних размеров. У старых, 18-ти месячных животных, наблюдаются значительные структурные перестройки в ядре: начинают преобладать мелкие нейроны с практически полным исчезновением крупных и средних. Пубертатный период характеризуется усилением экспрессии транскрипционного фактора c-Fos и NPY-синтетической активности. Повышение синтеза NPY осуществлялось не столько за счет активации синтетических процессов в отдельном нейроне, сколько за счет увеличения общего пула клеток, вовлеченных в процесс синтеза нейрогормона.

Ключевые слова: аркуатное ядро, гипоталамус, морфо-функциональное состояние, нейропептид Y, белок c-Fos.

Ганчева О.В. Особливості вікової динаміки функціональної активності нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса у самців щурів лінії вистар // Український морфологічний альманах. - 2009. - Том 7, №4. - С.14-17.

При проведенні дослідження було встановлено, що в процесі росту тварини розміри нейронів АрЯ та їх функціональна активність змінюються. Спостерігається вікове зменшення розмірів нейрону та його ядра на тлі збільшення вмісту РНК. Розподіл нейронів в аркуатному ядрі за розмірами до 6-місячного віку характеризується стабільністю, в структурі налічують клітини середніх розмірів. У старих, 18-місячних тварин, спостерігається значна структурна перебудова в ядрі гіпоталамуса: практично зникають нейрони великих і середніх розмірів, залишаються тільки маленькі. Пубертатний період характеризується посиленням експресії транскрипційного фактору c-Fos та NPY-синтетичної активності. Підвищення синтезу NPY здійснюється не стільки за рахунок активації синтетичних процесів в окремому нейроні, скільки завдяки збільшенню загального пулу клітин, які синтезують гормон.

Ключові слова: аркуатне ядро, гіпоталамус, морфо-функціональний стан, нейропептид Y, білок c-Fos.

Gancheva O.V. Features of age dynamics of hypothalamic arcuate nucleus neurons functional activity in male wistar rats // Украинський морфологічний альманах. - 2009. - Том 7, № 4. - С. 14-17.

It was established in the experiment that during animal growth process the size of ArN neurons and their functional state significantly change. Age-related decrease of neurons and nuclei linear sizes both with increased RNA content in these structures is observed. The distribution of ArN neurons by the area before 6 months of age is stable; middle-sized cells prevail. In older animals (18 months of life) marked structural changes in ArN neurons were seen: the prevalence of small neurons and almost complete absence of large neurons.

The age of puberty is characterized by increased expression of c-Fos transcriptional factor and NPY- synthesizing activity. The increase of NPY synthesis was realized mainly due to increase of neurons number involved in the process neurohormone synthesis, but not due to activation of synthesis in neuron itself.

Key words: arcuate nucleus, hypothalamus, morphofunctional state, neuropeptide Y, protein c-Fos.

Аркуатное ядро (АрЯ) гипоталамуса расположено в вентральной части медиобазального гипоталамуса и образовано мелкоклеточными нейроэндокриноцитами [1], которые формируют три субъядра [2] отличающиеся характером нейрональных связей и спектром синтезируемых нейропептидов. В области АрЯ проходит большое количество нервных волокон к срединному возвышению, главным образом от паравентрикулярного ядра, содержащих довольно широкий спектр пептидов: вазопрессин [3], холецистокинин, соматостатин [1, 3], нейропептид Y (NPY) [1, 4].

Рецепторный аппарат нейронов АрЯ характеризуется наличием специфических рецепторов к инсулину, кортикостерону [4, 5] и лептину [6, 7], что предполагает участие данной структуры в процессах гипоталамической регуляции глюкозного и энергетического гомеостаза. Кроме того, NPY-синтезирующие нейроны АрЯ содержат рецепторы к эстрадиолу, что свидетельствует об их участии в регуляции репродуктивной функции

и половой дифференцировке мозга [8].

Целью работы было изучить возрастные аспекты функциональной активности нейронов АрЯ гипоталамуса.

Методы исследования. Исследование было проведено на 40 крысах-самцах линии Вистар, распределенных на четыре возрастные группы (2, 4, 6 и 18 месяцев) по 10 животных в каждой. Животные находились на стандартном рационе при свободном доступе к воде и пище. Крысы соответствующего возраста декапитировали под этиминаловым наркозом (40 мг/кг, внутривенно). Мозг немедленно извлекали, помещали в фиксатор Буэна, обезживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Для морфометрических исследований нейронов гипоталамуса на ротационном микротоме MICROM HR-360 (Microm, Германия) изготавливали серийные срезы толщиной 5 микрон, для иммунофлюоресцентных – толщиной 14 микрон. В дальнейшем срезы депарафинировали

ли в ксилоле, регидрировали в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%), трижды по 10 минут отмывали в дистиллированной воде или фосфатном буфере pH 7,4.

Для определения РНК в структурах нейронов 5 мкм срезы мозга окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону [9]. После окраски препараты закладывали в канадский балзам. Морфометрический анализ проводили на микроскопе Аxioskop (Ziess, Германия). Изображение нейронов АрЯ гипоталамуса с помощью высокочувствительной видеокамеры COHU-4922 (COCHU Inc., США) вводили в компьютерную программно-аппаратную систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). В каждой возрастной группе было исследовано не менее 400 нейронов. Исследовали только те нейроны, которые в плоскости среза имели ядро и ядрышко. В результате автоматического анализа определялись площадь нейрона, ядра и ядрышка (мкм²), содержание РНК в цитоплазме, ядре и ядрышке нейрона (Еоп/мкм²). О повышении функциональной активности нейронов судили по увеличению площади клеток, их цитоплазмы, ядер и, особенно, ядрышек, а также увеличению в клетках их ядрах и ядрышках содержания и концентрации РНК [10].

Для определения экспрессии белка c-Fos регидрированные срезы толщиной 14 мкм при t=+4⁰ инкубировали с первичными кроличьими антителами к протеину c-Fos крысы производства Sigma Chemical (США). Для выявления NPY-синтезирующих нейронов регидрированные срезы толщиной 14 мкм при t=+4⁰ инкубировали с первичными кроличьими антителами к NPY производства Sigma Chemical (США). В обоих исследо-

ваниях в качестве вторичных антител использовали козьи антитела к полной молекуле IgG кролика, конъюгированные с FITC (Sigma Chemical, США). Принадлежность идентифицированных c-Fos и NPY-иммунопозитивных нейронов АрЯ гипоталамуса определяли в соответствии со стереотаксическим атласом мозга крысы [11]. Полученные изображения с помощью видеокамеры COHU-4922 (США) вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). В ходе автоматической обработки определяли: площадь материала, иммунореактивного к транскрипционному фактору c-Fos или NPY (мкм²), содержание белка c-Fos или NPY в площади иммунореактивности, их концентрацию в нейроне (Е_{иф}).

Полученные экспериментальные данные обрабатывали параметрической t статистикой Стьюдента, считая достоверными отличия в сравниваемых группах при p_{ст}<0,05. Для оценки статистической взаимосвязи изучаемых показателей использовали корреляционный анализ из программного пакета EXCEL (Microsoft Corp. США). При этом наличие зависимости между параметрами считали, если коэффициент корреляции был больше, чем 0,5 [12].

Результаты и их обсуждение. Проведенные исследования показали, что для нейронов АрЯ гипоталамуса характерно возрастное уменьшение параметров нейронов и их ядер, на фоне повышения содержания в них нуклеиновых кислот (таб. 1). При этом наблюдается обратная динамика изменения размеров ядрышка и нейрона/ядра: на фоне возрастного уменьшения размеров ядра и цитоплазмы, площадь ядрышка увеличивается практически в 2 раза.

Таблица 1 Морфометрическая характеристика мелкоклеточных нейронов аркуатного ядра гипоталамуса у крыс в возрастном аспекте (M±m)

возраст	2 месяца	4 месяца	6 месяцев	18 месяцев
Площадь нейрона, мкм ²	121,8±1,02	117,9±1,1*	117,3±0,8	87,9±0,98*
Площадь ядра, мкм ²	90,04±0,7	79,5±0,7*	75,5±0,5*	59,4±0,6*
Площадь ядрышка, мкм ²	2,93±0,1	5,64±0,23*	4,8±0,2*	6,2±0,36*
Концентрация РНК в цитоплазме, Еоп/мкм ²	0,056±0,0006	0,052±0,0006*	0,061±0,0008*	0,08±0,002*
Концентрация РНК в ядре, Еоп/мкм ²	0,07±0,0004	0,08±0,0007*	0,1±0,0008*	0,12±0,001*
Концентрация РНК в ядрышке, Еоп/мкм ²	0,2±0,0006	0,19±0,0007*	0,23±0,001*	0,26±0,002*

Примечание: * – достоверные (p<0,05) отличия по отношению к группе животных предыдущего возраста

С целью оценки степени функциональной активности всей структуры, нейроны АрЯ были разделены на три группы, в зависимости от площади (мелкие <100 мкм², средние 101-149 мкм², большие >150 мкм²). Из таблицы 2 видно, что до 6-месячного возраста, включительно, наблюдалась однотипная картина распределения нейронов по их площади – преобладали нейроны средних размеров. Тогда как у старых, 18-ти месячных животных, наблюдались выраженные структурные перестройки в аркуатном ядре, стали преобладать мелкие нейроны на фоне практически полного исчезновения крупных.

Выявленные возрастные изменения линейных параметров нейронов и структурные пере-

стройки в аркуатном ядре свидетельствуют о подверженности данной структуры возрастной нейродегенерации. При этом установленное реципрокное соотношение линейных характеристик нейрона и его функциональной активности, возможно, обусловлено компенсаторными механизмами, направленными на мобилизацию активности клеточной популяции нейронов.

Другими, более ранними и высокоспецифичными показателями активации покоящихся клеток являются гены «немедленного раннего ответа» (immediate early response genes), среди которых особый интерес представляет протоонкоген c-fos [13]. Этот ядерный протоонкоген представляет собой одну из основных ядерных мишеней для

передачі сигналів регуляції клітинного росту і трансформації, вовлечен во множество клітинних функцій, в том числі в процеси клітинної проліферації, дифференціювання і апоптоза [13, 14]. Продуктом гена *c-fos* являється білок раннього відповіді *c-Fos* [13,15], який виконує ряд важливих функцій, зв'язаних з клітинною дифференціюванням і проліферацією, а також з цілим рядом стресових реакцій [15].

Таблиця 2 Розподіл нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса по площі у крыс в віковому аспекті (%)

вік	% нейронів з площею до 100 мкм ²	% нейронів з площею 101-140 мкм ²	% нейронів з площею більше 150 мкм ²
2 місяці	21%	61%	18%
4 місяці	24%	65%	11%
6 місяців	21%	72%	7%
18 місяців	63%	26%	1%

При вивченні експресії транскрипційного фактора білка *c-Fos* в нейронах АРЯ було встановлено, що у тварин 4-х місячного віку спостерігалася найбільш висока активність його експресії. Вивчені критерії перевищили показники інших вікових груп на 30-40 % (площа матеріалу, імунореактивного к білку *c-Fos* на 10-15 % (вміст білка *c-Fos* в нейронах), на 40-55% (вміст білка *c-Fos* в площі матеріалу, імунореактивного к нему) (табл. 3).

Таблиця 3 Експресія транскрипційного фактора *c-Fos* в нейронах аркуатного ядра гіпоталамуса у крыс в віковому аспекті (M±m)

Вік	Площа матеріалу, імунореактивного к білку <i>c-Fos</i> , мкм ²	Вміст білка <i>c-Fos</i> в нейронах, ЕИФ	Вміст білка <i>c-Fos</i> в площі матеріалу, імунореактивного к нему, ЕИФ/мкм ²
2 місяці	1389,1±154,5	0,23±0,008	346,6±45,7
4 місяці	1892,1±147,5*	0,27±0,009*	538,5±49,8*
6 місяців	1355,2±100,3*	0,24±0,004*	351,7±34,5*
18 місяців	1439,3±152,2	0,26±0,007*	384,6±43,9

Примечание: * –достовірні (p<0,05) відмінності по відношенню к групі тварин попереднього віку

Виявлене нами посилення експресії білка раннього відповіді *c-Fos* у 4-х місячних тварин можна зв'язати з стимуляцією в цьому віку у крыс НPY-синтетическої активності (табл. 4). Поясненням подібної активації АРЯ гіпоталамуса являється те, що в цьому віковому періоді, відповідному періоду полового дозрівання, в організмі тварин відбуваються суттєві гормональні перебудови, супроводжувані активним ростом і розвитком, становленням статевих і поведінкових характеристик.

Ураховуючи той факт, у 4-х місячних тварин спостерігається найбільш висока експресія транскрипційного білка *c-Fos* і НPY-синтетическої активності, але при цьому відсутні суттєві зміни лінійних параметрів і РНК-синтетическої активності ней-

ронів, було вивчене співвідношення імуногістохімічних параметрів. Оказалося, що у 2-х, 6-ти і 18- місячних тварин площа матеріалу, імунореактивного к НPY становила 16% площі імунореактивності к транскрипційному фактору білка *c-Fos*, а у 4-х місячних 23,5%. Однак, в цьому віковому періоді вміст нейромедіатора в нейроні становив 74% (від вмісту білка *c-Fos*), в той час як у 2-х і 6-ти місячних тварин – 82,6% і 91,7%, відповідно (табл. 5).

Таблиця 4 Вміст НPY-імунореактивного матеріалу в АРЯ гіпоталамуса у крыс в віковому аспекті (M±m)

Вік	Площа матеріалу, імунореактивного к НPY, мкм ²	Вміст НPY в нейронах, ЕИФ	Вміст НPY в площі матеріалу, імунореактивного к нему, ЕИФ/мкм ²
2 місяці	227,4±18,8	0,19±0,002	41,5±3,7
4 місяці	443,8±20,8*	0,2±0,002*	94±4,4*
6 місяців	223,4±16,2*	0,22±0,002*	50±3,9*
18 місяців	234,9±17,6	0,19±0,003*	50,1±4,7

Примечание: * –достовірні (p<0,05) відмінності по відношенню к групі тварин попереднього віку

Таблиця 5 Співвідношення параметрів експресії транскрипційного фактора білка *c-Fos* і НPY-синтетическої активності нейронів аркуатного ядра у крыс в віковому аспекті (%)

вік	Відношення Сим к НPY / Сим к білку <i>c-Fos</i> , %	Відношення в нейроні вмісту НPY / к вмісту білка <i>c-Fos</i> , %	Відношення вмісту НPY в Сим к вмісту білка <i>c-Fos</i> в Сим к нему, %
2 місяці	16,4%	82,6%	12%
4 місяці	23,5%	74%	17,5%
6 місяців	16,5%	91,7%	14,2%
18 місяців	16,3%	73%	13%

Ці результати дозволяють нам передположити, що посилення активності структури зв'язано з збільшенням кількості активних нейронів. Отримані нами дані підтверджують нашу передположення о суттєвих структурних змінах в складній організованій АРЯ гіпоталамуса в різні вікові періоди. Як оказалося в до- і постпубертатні періоди життя кількості клітин синтезуючих НPY зменшується, по порівнянню з пубертатом, але при цьому відбувається компенсаторне посилення його синтезу в нейроні.

Висновки:

1. В процесі росту тварин розміри нейронів АРЯ і їх функціональна активність змінюються суттєво. Спостерігається вікове зменшення розмірів нейрона і ядра клітини на фоні збільшення вмісту в них РНК.

2. Розподіл нейронів в аркуатному ядрі по площі до 6-місячного віку характер-

зуються стабільністю, отмечено преобладание клеток средних размеров. У старых, 18-ти месячных животных, наблюдаются значительные структурные перестройки в ядре: начинают преобладать мелкие нейроны с практически полным исчезновением крупных и средних.

3. Пубертатный период характеризуется усилением экспрессии транскрипционного фактора c-Fos и NPY-синтетической активности. Повышение синтеза NPY в структуре ядра осуществляется, преимущественно, за счет увеличения общего пула клеток, вовлеченных в процесс синтеза нейромона.

4. У старых животных возрастная нейродегенерация АрЯ гипоталамуса, проявляющаяся уменьшением размеров клеток и структурными перестройками ядра, компенсируется за счет усиления функциональной активности отдельных нейронов.

ЛИТЕРАТУРА:

- Altman J. Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus / J. Altman, S. Bayer. - A. J. Comp. Neurol., 1978.- V. 182, [4].- P.945-972.
- Evidence that neuropeptide Y-containing neurons in the brain stem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior / [Sahu A., Kalra S.P., Crowley W.R., Kalra P.S.] - Brain Research., 1988.- V. 457.- P. 376-378.
- Meister B. Peptide- and transmitter-containing neurons in the mediobasal hypothalamus and their relation to GABAergic systems: Possible roles in control of prolactin and growth hormone / B.Meister, T. Hokfelt. - Synapse., 1988.- V.2.- P.585-605.
- Fasting enhances the response of arcuate neuropeptide Y-glucose-inhibited neurons to decreased extracellular glucose / (Murphy B.A., Fioramonti X., Jochnowitz N. et al.) - Am. J. Physiol. Cell. Physiol., 2009.- V.296[4]. – P. 746-756.
- Neuronal cell bodies in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate stress-induced renin and corticosteron secretion / (Morton K.D.R., Van de Kar L.D., Brownfield M.S. et al.). - Neuroendocrinology.- 1989.- V. 50, №1.- P.73-80.
- Könner A.C. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond / A.C. Könner, T. Klöckener, J.C. Brüning. – Physiol. Behav., 2009.- V. 14[5]. – P. 632-638.
- Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus / (Hsueh H., He Y., Kastin A.J. et al.) - Brain., 2009. – V. 132, [Pt 4]. – P. 889-902.
- Estrogen receptor immunoreactivity in late-gestation fetal lambs / (Gorton L.M., Mahoney M.M., Magorien J.E. et al.) – Biol. Reprod., 2009. – V. 80[6]. P. 1152-1159.
- Гистохимия / Э.Пирс -Пер. с англ. - М.: Изд-во ин.лит, - 1962.-962с
- Neuropeptide Y release from human heart is enhanced during prolonged exercise in hypoxia / (Kajiser L., Pernow J., Berlung B. et al). J. Appl. Physiol.- 1994.- V. 76, [3].- P.1346-1349.
- Paxinos G.B. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G.B. Paxinos, C.C. Watson :Sydney, Academia Press second edit.- 1986.- 264 pp.
- Закс А. Статистическое оценивание / А. Закс - М.: «Статистика», 1976-598с.
- Colotta F. Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death by growth factor deprivation in lymphoid cell lines / F. Colotta, N. Polentarutti, A.Mantovani. - J. Biol. Chem., 1992.- V.267.- P.18278-18283.
- Ameyar M. The role for AP-1 in apoptosis: the case for and against / M. Ameyar, M. Wisniewska, J. Weitzman. J. - Biochimie.- 2003.-V. 85.- P. 747-752.
- Milde-Langosch K. The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas / K. Milde-Langosch, H. Roder, B. Andritzky. – Breast. Cancer. Res. Treat., 2004.- V.86.-P.139-152.

Надійшла 19.10.2009 р.

Рецензент: д.мед.н. Т.П.Тананакіна