

УДК 615.212.7:[616.831.4:616.379-008.64]

**А. В. Абрамов**  
**М. М. Карнаух**  
**Г. В. Василенко**  
**О. В. Мельникова**

Запорізький державний медичний  
університет

## ПОКАЗНИКИ ЕКСПРЕСІЇ МЕТ-ЕНКЕФАЛІНУ В АРКУАТНИХ ЯДРАХ ГІПОТАЛАМУСА В ДИНАМІЦІ РОЗВИТКУ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ДІАБЕТУ В ЩУРІВ

**Ключові слова:** мет-енкефалін, цукровий діабет, гіпоталамус.

**Резюме.** У щурів у динаміці експериментального діабету імунофлуоресцентним методом в суб'ядрах аркуатних ядер гіпоталамуса (АрЯ) вивчено розподіл нейронів, які синтезують мет-енкефалін. Визначені їх морфометричні характеристики й кількісні показники накопичення мет-енкефаліну. Встановлено, що в нормі мет-енкефалін синтезується поодинокими клітинами АрЯ, переважно в його дорсомедіальному суб'ядрі. При діабеті в АрЯ посилюється експресія мет-енкефаліну спочатку в дорсомедіальному, а згодом – у вентролатеральному суб'ядрі. Через 5 тижнів від початку розвитку діабету в дорсомедіальному суб'ядрі АрЯ вдвічі збільшується вміст мет-енкефаліну в нейросекреторних клітинах і на 73 % – в їх аксонах. У вентролатеральному суб'ядрі АрЯ вміст мет-енкефаліну в нейросекреторних клітинах підвищується на 67 %, а в аксонах – втричі. Посилення синтезу й секреції мет-енкефаліну в суб'ядрах АрЯ при експериментальному діабеті супроводжується 7-разовим зростанням вмісту нейропептиду в середньому підвищенні гіпоталамуса. Отримані результати свідчать, що мет-енкефалінергічній системі гіпоталамуса притаманна активна участь у нейроендокринній відповіді організму на розвиток цукрового діабету.

### Вступ

Серед великої кількості публікацій про роль опіюїдних пептидів у патології лише невелике їх число присвячено патогенезу цукрового діабету. Тим не менш, вони свідчать про зміну функціональної активності опіатергічної системи гіпоталамуса як при експериментальному діабеті, так і при обох його клінічних формах. Так, радіоімунне визначення енкефаліну і ендорфіну в різних тканинах щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом свідчить про зниження концентрації цього пептиду в гіпоталамусі, нейро- і аденогіпофізі, а також у більшості периферичних органів і тканин [6,9]. У той же час, опіюїдні нейропептиди, до яких належать мет- і лей-енкефаліни та бета-ендорфін, є одними з компонентів нейросекрету нейронів медіобазального гіпоталамуса і відіграють важливу роль не тільки в ендокринній регуляції тропної функції аденогіпофіза, але й в нейроендокринній відповіді організму на стрес в якості складової стрес-лімітуючої системи. При цьому, лише поодинокі публікації присвячено нейроендокринній відповіді на метаболічний

стрес, що розвивається внаслідок цукрового діабету [1-3,5,7]. У попередніх наших дослідженнях було доведено підвищення синтезу й секреції мет-енкефаліну в дрібноклітинних та крупноклітинних суб'ядрах паравентрикулярних ядер гіпоталамуса [1-3]. Проте дані про характер синтезу мет-енкефаліну в аркуатних ядрах гіпоталамуса, які є одним із провідних місць синтезу опіюїдів, досі відсутні.

### Мета дослідження

Вивчити особливості синтезу і секреції мет-енкефаліну в окремих суб'ядрах аркуатних ядер гіпоталамуса в динаміці розвитку експериментального діабету.

### Матеріал і методи

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 призводило до зростання концентрації глюкози в крові до  $6,0 \pm 0,2$  ммоль/л на-

прикінці 2-го тижня та до  $8,5 \pm 0,4$  ммоль/л наприкінці 5-го тижня розвитку патологічного процесу. За 48 годин до декапітації контрольним та експериментальним (із діабетом) тваринам інтрацеребровентрикулярно вводили 120 мкг колхіцину (SIGMA Chemical, США) у 20 мкл 0,9 % розчину NaCl. Ідентифікацію лей-енкефалінсинтезуючих 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 ( $T = 4-6^{\circ}\text{C}$ ) з первинними антитілами до лей-енкефаліну (кролячий IgG у розведенні 1:200, виробництво Amersham, Англія). Після відмивання у фосфатному буфері 45 хвилин інкубували ( $T = 37^{\circ}\text{C}$ ) з розведеними (1:64) козячими антитілами проти IgG кроля, кон'югованими з FITC (SIGMA Chemical, США). Після інкубації зрізи відмивали у фосфатному буфері і поміщали в гліцерин-буферну суміш (9:1). Імуноцитохімічні дослідження проводили за допомогою комп'ютерної системи цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Zeiss - Kontron Elektronik, Німеччина). Аналіз зображення проводили в автоматичному режимі за допомогою пакета прикладних програм VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина), що дозволяло ідентифікувати ділянки зі статистично значущою флуоресценцією, яка притаманна імунопозитивним нейронам і їх аксонам. Обчислювалися площа окремих нейронів ( $\text{мкм}^2$ ), концентрація та вміст нейропептиду (в умовних одиницях імунофлуоресценції -  $O_{\text{IF}}$ ), а також чисельність імунопозитивних клітин, загальна площа імунопозитивного матеріалу в аксонах та вміст у них мет-енкефаліну у фронтальних зрізах окремих суб'ядер АрЯ і середньому підвищенні гіпоталамуса. За даними чисельності мет-енкефалін-імунопозитивних нейронів, вмісту в них і в їх аксонах нейропептиду, розраховувався загальний вміст мет-енкефаліну у фронтальному зрізі окремих суб'ядер АрЯ. Експериментальні дані обробляли пакетом прикладних і статистичних програм VIDAS -2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина). Для оцінки достовірності відмінностей у групах застосовували t - критерій Ст'юдента.

#### Обговорення результатів дослідження

Вивчення серійних зрізів гіпоталамуса показало, що в щурів у нормі в аркуатному ядрі (АрЯ) виявлялися лише поодинокі імунопозитивні до мет-енкефаліну (метЕ) нейрони, причому в дорсомедіальному суб'ядрі їх кількість була втричі вищою, ніж у вентролатеральному (табл. 1). Іму-

нопозитивні клітини обох суб'ядер мали схожі морфометричні характеристики та однаковий вміст метЕ, але в аксонах нейронів дорсомедіального суб'ядра площа матеріалу, імунореактивного до метЕ, була приблизно вдвічі вищою, а вміст нейропептиду – втричі вищим, ніж в аксонах вентролатерального суб'ядра (табл. 2). До того ж, за рахунок більшої чисельності метЕ-нейронів у дорсомедіальному суб'ядрі загальний вміст мет-енкефаліну у 2,6 раза перевищував аналогічний показник у вентролатеральному суб'ядрі (табл. 3).

Розвиток цукрового діабету в щурів призводив до підвищення чисельності клітин, імунопозитивних до метЕ, тільки в дорсомедіальному суб'ядрі. Їх кількість за 2 тижні зростала у 2,5 раза. При цьому суттєвих змін морфометричних та денситометричних характеристик нейронів та їх аксонів не відбувалося. Проте в аксонах нейронів вентролатерального суб'ядра наприкінці 2-го тижня розвитку діабету спостерігалось зростання площі матеріалу, імунореактивного до метЕ, на 97 % порівняно з інтактними щурами, та підвищення вмісту нейропептиду вчетверо. Це призводило до суттєвого зростання загального вмісту метЕ в АрЯ, причому в дорсомедіальному суб'ядрі він збільшувався в 3,7 раза, а у вентролатеральному – тільки на 74 %. Зміна функціональної активності нейронів АрЯ в початковий період розвитку діабету свідчила не тільки про підвищення синтезу метЕ в цьому нейросекреторному утворенні гіпоталамуса, але й про збільшення секреції нейропептиду до середнього підвищення гіпоталамуса. Про це говорило зростання в останньому площі матеріалу, імунореактивного до метЕ, на 58 %, та підвищення вмісту метЕ у 2,5 раза.

Подальший розвиток експериментального діабету протягом 5-ти тижнів суттєво не вплинув на загальну кількість метЕ-імунопозитивних нейронів АрЯ, але призвів до деякого їх перерозподілу по окремих суб'ядрах, внаслідок чого чисельність метЕ-імунопозитивних клітин у суб'ядрах зрівнялася (табл. 1). При цьому в дорсомедіальному суб'ядрі їх кількість у 2,5 раза, а у вентролатеральному – у 6 разів перевищувала аналогічний показник у контрольних щурах. Проте на тлі відсутності суттєвих змін морфометричних показників нейрони обох суб'ядер АрЯ в клітинах значно збільшувався вміст метЕ: у дорсомедіальному суб'ядрі на 92 %, а у вентролатеральному – на 67 % (табл. 2). До того ж, в аксонах нейронів дорсомедіального суб'ядра на 35 % зросла площа матеріалу, імунореактивного до метЕ, та на 73 % зріс вміст нейропептиду. За рахунок цих змін наприкінці 5-го тижня розвитку експериментального діабету в обох суб'ядрах

Таблиця 1

Розподіл нейронів, які синтезують мет-енкефалін, у суб'ядрах АрЯ ( $M \pm m$ )

Суб'ядра АрЯ	Кількість імунопозитивних нейронів		
	Контроль	Діабет, 2 тиж.	Діабет, 5 тиж.
Дорсомедіальне	8±1	29±2 *	19±3 * <sup>#</sup>
Вентролатеральне	3±1	5±1	19±3 * <sup>#</sup>

Примітка. Достовірність відмінностей ( $p < 0,05$ ) стосовно: \* – контролю, <sup>#</sup> – двотижневого діабету

Таблиця 2

Показники імунореактивності до мет-енкефаліну в нейронах (чисельник), їх аксонах (знаменник) і серединному підвищенні гіпоталамуса ( $M \pm m$ )

Суб'ядра АрЯ	Площа імунореактивного матеріалу, $\mu\text{m}^2$			Уміст мет-енкефаліну, $O_{10}$		
	Контроль	Діабет, 2 тиж.	Діабет, 5 тиж.	Контроль	Діабет, 2 тиж.	Діабет, 5 тиж.
Дорсомедіальне	43,0±4,7	41,2±2,4	52,6±3,0	4,12±0,52	4,01±0,29	7,93±0,57* <sup>#</sup>
	32,5±0,5	36,1±3,0	43,9±3,2*	3,01±0,03	2,90±0,24	5,20±0,42* <sup>#</sup>
Вентролатеральне	45,6±4,6	50,4±5,9	46,2±3,0	4,03±0,60	4,07±0,52	6,73±0,52* <sup>#</sup>
	17,5±1,7	34,6±5,2*	27,9±4,0*	1,06±0,01	4,38±0,80*	3,46±0,50*
Серединне підвищення гіпоталамуса	691,3±13,4	1091,0±26,3**	3421,4±90,4* <sup>#</sup>	46,7±1,1	119,4±2,9*	336,7±8,9* <sup>#</sup>

Примітка. Достовірність відмінностей ( $p < 0,05$ ) стосовно: \* – контролю, <sup>#</sup> – двотижневого діабету

Таблиця 3

Загальний уміст ( $O_{10}$ ) мет-енкефаліну в нейронах АрЯ ( $M \pm m$ )

Суб'ядра АрЯ	Контроль	Діабет, 2 тиж.	Діабет, 5 тиж.
Дорсомедіальне	91,4±2,3	336,3±8,3 *	396,0±9,5 * <sup>#</sup>
Вентролатеральне	35,4±1,3	61,7±1,1 *	189,0±16,6 * <sup>#</sup>

Примітка. Достовірність відмінностей ( $p < 0,05$ ) стосовно: \* – контролю, <sup>#</sup> – двотижневого діабету

АрЯ додатково зріс загальний уміст мет-енкефаліну (табл. 3): на 17,8% ( $p < 0,01$ ) у дорсомедіальному та втричі – у вентролатеральному суб'ядрі АрЯ.

Таким чином, аналіз функціонального стану мет-енкефалінергічної системи АрЯ в динаміці експериментального цукрового діабету в щурів свідчить про поступове зростання синтезу нейропептиду нейросекреторними клітинами обох суб'ядер та його секреції по аксонах у зовнішню зону серединного підвищення гіпоталамуса. При цьому загальний уміст мет-енкефаліну в обох суб'ядрах у 3,14 раза перевищував загальний уміст нейропептиду у тварин із 2-тижневим діабетом, та у 4,61 раза – аналогічний показник у контрольних тварин, а його вміст у серединному підвищенні гіпоталамуса у 2,8 раза був вищим, ніж у тварин із 2-тижневим діабетом, та у 7,2 раза вище, ніж аналогічний показник у контрольних тварин. Але слід зазначити, що імунореактивність серединного підвищення гіпоталамуса до мет-енкефаліну формується не тільки за раху-

нок секреції нейропептиду нейронами АрЯ, але й за рахунок транспорту нейропептиду від нейронів дрібноклітинних та крупноклітинних суб'ядер паравентрикулярних ядер, в яких при діабеті суттєво зростає здатність до синтезу та секреції опіоїдних пептидів [1-5,8]. Разом із тим, отримані дані свідчать про важливу роль нейронів аркуатних ядер, як компонента мет-енкефалінергічної системи гіпоталамуса, в інтегрованій нейроендокринній відповіді організму на розвиток цукрового діабету.

## Висновки

1. Розвиток цукрового діабету в щурів призводить до зростання в аркуатних ядрах гіпоталамуса чисельності нейронів, що синтезують мет-енкефалін.

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

**Перспективи подальших досліджень**

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

**Література.** 1. Абрамов А.В. Характеристика мет-енкефалин-синтезуючої системи крупноклеточных нейронів гіпоталамуса в нормі і при експериментальному сахарному діабеті / А.В. Абрамов, М.Н. Карнаух // Загальна патологія і клінічна патофізіологія. - 2010. - Т.5, №3. - С. 27-30. 2. Абрамов А.В. Характеристика мет-енкефалин-синтезуючої системи крупноклеточных нейронів гіпоталамуса в нормі і при експериментальному сахарному діабеті / А.В. Абрамов, М.Н. Карнаух // Загальна патологія і клінічна патофізіологія. - 2010. - Т.5, №3. - С. 27-30. 3. 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-биологический вестник. - 2012. - №3, ч.1. - С.11-14. 4. Колесник Ю.М. Нейроэндокринные и иммунные механизмы развития сахарного диабета / Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов // Патологія. - 2005. - Т. 2, № 3. - С. 20-23. 5. 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. 6. 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. R1320-1326. 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, №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 [et al.] // Cell. Mol. Neurobiol. - 2001. - Vol.21, №1. - 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.

**ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСПРЕССИИ МЕТ-ЭНКЕФАЛИНА  
В АРКУАТНЫХ ЯДРАХ ГИПОТАЛАМУСА  
В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ  
СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА У КРЫС**

*А.В.Абрамов, М.Н.Карнаух,  
Г.В.Василенко, О.В.Мельникова*

**Резюме.** У крыс в динамике экспериментального диабета иммунофлюоресцентным методом в субъядрах аркуатных ядер гипоталамуса (АрЯ) изучено распределение нейронов, синтезирующих мет-енкефалин. Определены их морфометрические характеристики и количественные показатели накопления мет-енкефалина. Установлено, что в норме мет-енкефалин синтезируется единичными клетками АрЯ, пре-

имущественно в его дорсомедиальном субъядре. При диабете в АрЯ усиливается экспрессия мет-енкефалина вначале в дорсомедиальном, а затем и в вентролатеральном субъядре. Через 5 недель развития диабета в дорсомедиальном субъядре АрЯ вдвое увеличивается содержание мет-енкефалина в нейросекреторных клетках и на 73 % – в их аксонах. В вентролатеральном субъядре АрЯ содержание мет-енкефалина в нейросекреторных клетках возрастает на 67 %, а в аксонах – втрое. Усиление синтеза и секреции мет-енкефалина в субъядрах АрЯ при экспериментальном диабете сопровождается 7-кратным нарастанием содержания нейропептида в срединном возвышении гипоталамуса. Полученные результаты свидетельствуют, что для мет-енкефалинергической системе гипоталамуса свойственно активное участие в нейроэндокринном ответе организма на развитие сахарного диабета.

**Ключевые слова:** мет-енкефалин, сахарный диабет, гипоталамус.

**THE EXPRESSION OF MET-ENKEPHALIN IN  
HYPOTALAMIC ARCUATE NUCLEI IN RATS WITH  
STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES**

*A.V.Abramov, M.N.Karnaukh,  
G.V.Vasilenko, O.V.Melnikova*

**Abstract.** The distribution of the neurons that synthesize met-enkephalin in subnuclei of arcuate hypothalamic nuclei (ARH) was studied in the course of experimental diabetes in rats with the help of immune fluorescence method. The neurons' morphometric characteristics and qualitative indices of met-enkephalin accumulation were measured. It has been established, that normally met-enkephalin is synthesized in solitary cells of ARH, mainly in its dorsomedial subnucleus. In the course of diabetes expression of met-enkephalin increases first in dorsomedial and later in ventrolateral subnucleus of ARH. In 5 weeks after diabetes onset, the content of met-enkephalin in neurosecretory cells of ARH dorsomedial subnucleus is increased 2 times and by 73% in the axons. In ARH ventrolateral subnucleus met-enkephalin content in neurosecretory cells rises by 67% and in their axons in three times. The intensification of met-enkephalin synthesis and secretion in ARH subnuclei is accompanied by 7-times increase of neuropeptide content in hypothalamus medial eminence. The obtained data are evidence of the active participation of met-enkephalinergic hypothalamic system in neuroendocrine response of the organism to diabetes mellitus development.

**Key words:** met-enkephalin, diabetes mellitus, hypothalamus.

**Zaporizhzhya State Medical University**

*Clin. and experim. pathol. - 2013. - Vol.12, №4 (46).-P.12-15.*

*Надійшла до редакції 01.12.2013*

*Рецензент – проф. В.Ф.Мислицький*

*© А.В. Абрамов, М.М. Карнаух, Г.В. Василенко, О.В. Мельникова, 2013*