

УДК 615.212.7:[616.831.4:616.379-008.64]

© А.В. Абрамов, М.Н. Карнаух, 2012.

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСПРЕССИИ МЕТ-ЭНКЕФАЛИНА В ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНЫХ ЯДРАХ ГИПОТАЛАМУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

А.В. Абрамов, М.Н. Карнаух

Запорожский государственный медицинский университет, кафедра патофизиологии, г. Запорожье.

IMMUNOCYTOCHEMICAL EXPRESSION OF MET-ENKEPHALIN IN THE HYPOTHALAMIC PARAVENTRICULAR NUCLEI IN EXPERIMENTAL DIABETES IN RATS

A.V. Abramov, M.N. Karnaukh

SUMMARY

At rats with an experimental diabetes the distribution of met-enkephalin synthesizing neurons in the paraventricular nucleus subnuclei was studied by immunofluorescence method. It was determine morphometric characteristics, and quantitative accumulation of met-enkephalin in neurons. We observed elevating the expression, increases synthesis and secretion of met-enkephalin only in the paraventricular neurosecretory subnuclei.

ИМУНОЦИТОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЕКСПРЕСІЇ МЕТ-ЕНКЕФАЛІНУ У ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНИХ ЯДРАХ ГІПОТАЛАМУСА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ДІАБЕТИ У ЩУРІВ

А.В. Абрамов, М.Н. Карнаух

РЕЗЮМЕ

У щурів в динаміці експериментального діабету імунофлюоресцентним методом в суб'ядрах паравентрикулярного ядра вивчено розподіл нейронів, що синтезують мет-енкефалін. Визначені їх морфометричні характеристики й кількісні показники накопичення мет-енкефаліну. Встановлено, що при діабеті посилюється експресія, синтез і секреція мет-енкефаліну тільки в нейросекреторних суб'ядрах паравентрикулярного ядра.

Ключевые слова: мет-энкефалин, сахарный диабет, гипоталамус.

Среди большого количества публикаций о роли опиоидных пептидов в патологии лишь небольшое их число посвящено патогенезу сахарного диабета. Тем не менее, они свидетельствуют об изменении функциональной активности опиатергической системы гипоталамуса как при экспериментальном диабете, так и при обеих его клинических формах. Так, радиоиммунологическое определение энкефалина и эндорфина в различных тканях у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом свидетельствует о снижении концентрации этого пептида в гипоталамусе, нейро- и аденогипофизе, а также в большинстве периферических органов и тканей [4, 6]. Однако данные о характере изменения синтеза опиоидов в отдельных ядрах гипоталамуса отсутствуют.

Целью исследования было изучить особенности синтеза и секреции мет-энкефалина в отдельных субъядрах паравентрикулярного ядра гипоталамуса в динамике развития экспериментального диабета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 17 крысах-самцах линии Вистар массой 250-270 г. Сахарный диабет у крыс моделировали однократным введением стрептозотоцина (SIGMA Chemical, США) в дозе 50 мг/кг. За 48 часов до декапитации животным интрацеребровентрикулярно вводили 120 мкг

колхицина (SIGMA Chemical, США), разведенного в 20 мкл 0,9% раствора NaCl. Идентификацию мет-энкефалин-синтезирующих нейронов в структурах гипоталамуса осуществляли методом непрямо́й иммунофлюоресценции в парафиновых серийных фронтальных срезах головного мозга толщиной 14 мкм. Депарафинизированные срезы отмывали в фосфатном буфере (рН=7,4), 40 часов инкубировали (Т=68°C) с разведенной (1:200) кроличьими антителами (IgG) к мет-энкефалину (Amersham, Англия), 45 минут инкубировали (Т=37°C) с разведенными (1:100) козьими антителами против IgG кролика, конъюгированного с FITC (SIGMA Chemical, США), и после отмывки в фосфатном буфере заключали в глицерин-буферную смесь (9:1). Иммуноцитохимические исследования проводили с помощью компьютерной системы цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Zeiss-Kontron Elektronik, Германия). Анализ изображения проводили в автоматическом режиме с помощью пакета прикладных программ VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Германия), позволяющих идентифицировать области со статистически значимой флюоресценцией, характерной для иммунопозитивных клеток и волокон, и вычислять их площадь (мкм²), а также содержание нейропептида (единицы иммунофлюоресценции – E_{иф}).

Экспериментальные данные обрабатывали пакетом прикладных и статистических программ VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Германия). Для оценки достоверности различий в группах применяли t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение серийных срезов гипоталамуса показало, что у нормальных крыс в области паравентрикулярных ядер мет-энкефалин-иммунопозитивные нейроны (метЭ) выявляются как в мелкоклеточных субъядрах – переднем (пмПВЯ), медиальном (ммПВЯ), перивентрикулярном (пвПВЯ), – так и в заднем

крупноклеточном субъядре (зкПВЯ). При этом доминирующее количество иммунопозитивных нейронов обнаруживается в пвПВЯ, а их общая численность в мелкоклеточных субъядрах более чем в 3 раза выше, чем в крупноклеточных (табл.1). Тем не менее, значительно большая площадь материала, иммунореактивного к метЭ, в цитоплазме нейронов зкПВЯ и более высокое содержание самого нейрпептида приводит к тому, что суммарное содержание метЭ в этой структуре ненамного уступает суммарному содержанию гормона во всех мелкоклеточных субъядрах (табл. 2, 3).

Таблица 1

Распределение нейронов, синтезирующих мет-энкефалин, в субъядрах ПВЯ (M±m)

Субъядра ПВЯ	Количество иммунопозитивных нейронов		
	Контроль	Диабет, 2 нед.	Диабет, 5 нед.
переднее мелкоклеточное	17±2	61±4 *	10±1 **
медиальное мелкоклеточное	14±1	67±4 *	156±7 **
перивентрикулярное мелкоклеточное	63±4	87±8 *	109±10 *
заднее крупноклеточное	28±5	53±9 *	96±12 **

Примечание: достоверность отличий $p < 0,05$ по отношению к контролю (*), 2-недельному диабету (**).

Таблица 2

Показатели иммунореактивности к мет-энкефалину в нейронах (числитель), их аксонах (знаменатель) и срединном возвышении (M±m)

Субъядра ПВЯ	Площадь иммунореактивного материала, мкм ²			Содержание мет-энкефалина, E _{ИФ}		
	Контроль	Диабет 2 нед.	Диабет 5 нед.	Контроль	Диабет 2 нед.	Диабет 5 нед.
переднее мелко-клеточное	$\frac{48,5 \pm 4,2}{46,7 \pm 10,5}$	$\frac{42,6 \pm 4,9}{24,4 \pm 1,9} *$	$\frac{50,4 \pm 12,3}{23,7 \pm 2,27} *$	$\frac{7,67 \pm 0,75}{7,81 \pm 1,71}$	$\frac{5,26 \pm 0,63^*}{3,96 \pm 1,13^*}$	$\frac{5,41 \pm 1,69}{2,50 \pm 0,15^{**}}$
медиальное мелко-клеточное	$\frac{49,2 \pm 4,1}{37,4 \pm 9,1}$	$\frac{35,8 \pm 3,6^*}{24,9 \pm 2,0^*}$	$\frac{47,9 \pm 3,6^{\#}}{22,2 \pm 1,4^*}$	$\frac{7,37 \pm 0,82}{6,54 \pm 2,0}$	$\frac{3,11 \pm 0,33^*}{2,14 \pm 0,36^*}$	$\frac{5,46 \pm 0,47^{\#}}{2,18 \pm 0,16^*}$
перивентрикулярное мелко-клеточное	$\frac{42,3 \pm 4,5}{25,2 \pm 1,9}$	$\frac{42,1 \pm 3,2}{26,9 \pm 1,9}$	$\frac{78,8 \pm 5,3^{**}}{27,0 \pm 4,8}$	$\frac{5,11 \pm 0,62}{2,93 \pm 0,30}$	$\frac{5,81 \pm 0,52}{3,07 \pm 0,38^*}$	$\frac{13,5 \pm 1,06^{**}}{3,49 \pm 0,83^*}$
заднее крупно-клеточное	$\frac{159,4 \pm 4,4}{100,6 \pm 2,3}$	$\frac{119,6 \pm 7,2^*}{32,7 \pm 0,7^*}$	$\frac{134,3 \pm 5,3^*}{7,9 \pm 0,2^{**}}$	$\frac{44,7 \pm 1,8}{18,6 \pm 0,4}$	$\frac{9,4 \pm 0,7^*}{1,8 \pm 0,1^*}$	$\frac{26,7 \pm 1,5^*}{0,7 \pm 0,1^{**}}$
Срединное возвышение	691,3±13,4	1091,0±26,3*	3421,4±90,4**	46,7±1,1	119,4±2,9*	336,7±8,9**

Примечание: достоверность отличий $p < 0,05$ по отношению к контролю (*), 2-недельному диабету (**).

Суммарное содержание мет-энкефалина в нейронах ПВЯ (M±m)

Субъядра ПВЯ	Контроль	Диабет 2 нед.	Диабет 5 нед.
переднее мелкоклеточное	264,6±32,9	506,4±35,7 *	93,7±13,8 **
медиальное мелкоклеточное	198,2 ±14,3	353,2±20,1 *	1193,6±54,9 **
перивентрикулярное мелкоклеточное	990,5±71,8	344,0±31,6 *	1612,4±157,0 **
заднее крупноклеточное	1251,6 ± 50,4	498,2 ± 37,1*	2563,2 ± 144,0**

Примечание: достоверность отличий $p < 0,05$ по отношению к контролю (*), 2-недельному диабету (**).

Развитие диабета у крыс в течение 2-х недель приводило к увеличению численности иммунопозитивных нейронов в 3,5-4 раза в переднем и медиальном мелкоклеточных субъядрах ПВЯ, а в крупноклеточных субъядрах их количество удваивалось. Значительно меньшим был прирост метЭ-нейронов в пвПВЯ – примерно 40%. При этом во всех субъядрах наблюдалось достоверное уменьшение площади иммунореактивного материала и содержания нейропептида в аксонах нейронов, а в ммПВЯ и зкПВЯ дополнительно отмечалось снижение иммунореактивности и в цитоплазме. Суммарное содержание метЭ при диабете нарастало только в нейросекреторном ммПВЯ и в пмПВЯ, аксональный транспорт нейропептидов которого не связан с нейросекрецией в срединное возвышение гипоталамуса. Вместе с тем, в нейросекреторных зкПВЯ и пвПВЯ суммарное содержание метЭ снижалось в 2,5-3 раза, соответственно. Однако, площадь материала, иммунореактивного к метЭ, в срединном возвышении гипоталамуса на 60% превышала показатели контрольных животных, а содержание нейропептида было в 2,6 раз выше.

Дальнейшее течение сахарного диабета к концу 5-й недели вызывало дальнейшее увеличение количества мет-энкефалин-иммунопозитивных нейронов в основных нейросекреторных субъядрах ПВЯ - в ммПВЯ, где их численность возросла более чем в 10 раз по сравнению с контролем, и в зкПВЯ, где их количество увеличивалось примерно в 3,5 раза. В то же время, количество иммунопозитивных метЭ-нейронов в пмПВЯ существенно уменьшалось вместе с сокращением площади материала, иммунореактивного к метЭ, в аксонах нейронов и снижением содержания самого нейропептида. Напротив, в нейросекреторных клетках ммПВЯ содержание метЭ восстанавливалось до показателей контроля, а в пвПВЯ содержание нейропептида возрастало более чем в 2,5 раза. Подтверждением возросшей синтетической активности нейросекреторных субъядрах ПВЯ было увеличение суммарного содержания метЭ в 3,5-4,5 раза на фоне снижения данного показателя в пмПВЯ. Со 2-й по 5-ю недели развития диабета практически в 3 раза

возрастала площадь материала, иммунореактивного к метЭ, и содержание нейропептида в срединном возвышении гипоталамуса, что свидетельствует о высоких показателях нейросекреции данного опиоида.

Определяя источники возможного поступления мет-энкефалина в срединное возвышения, следует обратить внимание не только на классические нейросекреторные нейроны ммПВЯ и зкПВЯ, но и на нейроны супраоптического ядра гипоталамуса, в которых усиление синтеза нейропептида в клетках сочеталось с увеличением его содержания в нервных волокнах, в отличие от крупноклеточных нейронов ПВЯ, в которых накопление нейропептида в клетках происходило на фоне резкого уменьшения его поступления в нервные волокна [1]. Кроме того, основываясь на данных литературы, можно предполагать, что дополнительным источником поступления мет-энкефалина в срединное возвышение могут быть нейроны АрЯ, морфофункциональная активность которых при диабете возрастает [2-5].

ВЫВОДЫ

1. Развитие экспериментального сахарного диабета у крыс приводит к увеличению экспрессии мет-энкефалина главным образом в нейросекреторных мелкоклеточных и крупноклеточных субъядрах и снижению экспрессии в передних мелкоклеточных субъядрах ПВЯ.

2. В динамике развития диабета в ПВЯ отмечается повышение синтеза мет-энкефалина и усиление его секреции в срединное возвышение гипоталамуса.

ЛИТЕРАТУРА

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

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

3. Chang G.-Q., Karatayev O., Ahsan R., Gaysinskaya V., Marwil Z., Leibowitz S.F. Dietary fat stimulates endogenous enkephalin and dynorphin in the paraventricular nucleus: role of circulating triglycerides // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* - 2007. - Vol. 292: -P.E561-E570.

4. Kim E.M., Grace M.K., Welch C.C., Billington C.J., Levine A.S. STZ-induced diabetes decreases and insulin normalizes POMC mRNA in arcuate nucleus and pituitary in rats // *Am. J. Physiol.* - 1999. - Vol.276, N5, Pt. 2. - P. R1320-1326.

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

6. Saravia F.E., Gonzalez S.L., Roig P., Alves V., Homodelarche F., De Nicola A.F. Diabetes increases the expression of hypothalamic neuropeptides in a spontaneous model of type I diabetes, the nonobese diabetic (NOD) mouse // *Cell. Mol. Neurobiol.* - 2001. - Vol.21, N1. - P.15-27.