

М.Н. Карнаух

Функциональное состояние лей-энкефалин-синтезирующей системы крупноклеточных ядер гипоталамуса при экспериментальном сахарном диабете

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: гипоталамус, энкефалин, сахарный диабет.

В исследованиях на крысах линии Вистар показано, что 2-недельный период развития стрептозотцин-индуцированного сахарного диабета приводило к 5-кратному увеличению количества лей-энкефалин-иммунопозитивных нейронов в заднелатеральном крупноклеточном субъядре паравентрикулярного ядра (зкПВЯ) и 3-кратному их увеличению в супраоптическом ядре (СОЯ), и сопровождалось значительным увеличением иммунореактивности и концентрации нейропептида в срединном возвышении гипоталамуса. Дальнейшее течение диабета приводило к угнетению синтеза и секреции лей-энкефалина в нейронах зкПВЯ и СОЯ при сохранении высокого уровня иммунореактивности к лей-энкефалину в срединном возвышении.

Функціональний стан лей-енкефалін-синтезуючої системи крупноклітинних ядер гіпоталамусу при експериментальному цукровому діабеті

М.М. Карнаух

В дослідженнях на щурах лінії Вістар доведено, що 2-тижневий період розвитку стрептозотцин-індукованого цукрового діабету призводить до 5-кратного збільшення кількості лей-енкефалін-імунопозитивних нейронів у задньолатеральному крупноклітинному суб'яздрі паравентрикулярного ядра (зкПВЯ) і 3-кратного їх збільшення в супраоптичному ядрі (СОЯ), та супроводжувалось значним зростанням імунореактивності й концентрації нейропептиду в срединному підвищенні гіпоталамуса. Подальший розвиток діабету спричинював пригнічення синтезу і секреції лей-енкефаліну в нейронах зкПВЯ і СОЯ при збереженні високого рівня імунореактивності до лей-енкефаліну в срединному підвищенні.

Ключові слова: гіпоталамус, енкефалін, цукровий діабет.**Патологія.** – 2011. – Т.8, №2. – С. 21–23**Functional state of leu-enkephalin-synthesizing system of large cell nuclei in experimental diabetes mellitus**

M.N.Karnaukh

Experiments on Wistar rats showed that two-week period of streptozotocin-induced diabetes development led to fivefold increase of leu-enkephalin-immunopositive neurons in posterolateral large cell subnucleus of paraventricular nucleus (PLCSPN) and their threefold increase in supraoptical nucleus (SON) and was accompanied by significant increase of immunoreactivity and concentration of neuropeptide in middle eminence of hypothalamus. Further development of diabetes led to suppression of synthesis and secretion of leu-enkephalin in neurons of PLCSPN and SON under maintenance of high level of immunoreactivity to leu-enkephalin in middle eminence.

Key words: hypothalamus, enkephalin, diabetes mellitus.**Pathologia.** 2011; 8(2): 21–23

Развитие сахарного диабета приводит к формированию метаболического стресса [1,2], который оказывает влияние на нейроэндокринный гипоталамус. В свою очередь, учитывая наличие глюкокортикоидных нейронов в гипоталамусе, гипергликемия и гипонатриемия при диабете приводят к активации определенных пептидергических нейронов гипоталамуса [3]. В эксперименте показано, что введение синтетических аналогов гипоталамического нейропептида Y, бомбезин-подобных пептидов, холецистокинина 28–34, окситоцина оказывает стимулирующее влияние на синтез инсулина бета-клетками панкреатических островков при диабете и, тем самым, доказывает участие нейроэндокринного гипоталамуса в патогенезе данного патологического процесса [1,4].

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 опиоидергической системы гипоталамуса как при экспериментальном диабете, так и при обеих его клинических формах. Так, радиоиммунологическое определение энкефалина и эндорфина в различных тканях у крыс с стрептозотцин-индуцированным диабетом свидетельствует о снижении концентрации этого пептида в гипоталамусе, нейро- и аденогипофизе, а также в большинстве периферических органов и тканей

[5,6]. Большинство авторов считают, что механизмы развития некоторых периферических патофизиологических симптомов при диабете связаны со снижением активности энкефалинергической системы. Вместе с тем ряд исследователей отмечают повышение иммунореактивности в гипоталамусе ко многим нейропептидам, в частности, вазопрессину, окситоцину, холецистокинину, нейротензину при экспериментальном диабете у крыс [1,4] и к опиоидам при ожирении [7]. Ранее нами было показано увеличение синтеза мет-энкефалина в нейронах крупноклеточных гипоталамических ядер, которое сопровождалось усилением его секреции в срединное возвышение гипоталамуса [8].

Цель работы

Изучить особенности синтеза и секреции лей-энкефалина в крупноклеточных нейронах гипоталамуса в динамике развития экспериментального диабета.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 17 крысах-самцах линии Вистар массой 250–270 г. Сахарный диабет моделировали однократным введением стрептозотоцина (SIGMA Chemical, США) в дозе 50 мг/кг. Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом. Идентификацию лей-энкефалин-синтезирующих нейронов в структурах гипоталамуса осуществляли методом непрямой иммунофлуоресценции. Для этого мозг животных

после одномоментной декапитации фиксировали в жидкости Буэна и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин. Серийные фронтальные срезы гипоталамуса толщиной 14 мкм депарафинировали, отмывали в фосфатном буфере (рН=7,4), 40 часов инкубировали (Т=6–8°C) с разведенной (1:200) кроличьими антителами (IgG) к лей-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 флуоресценцией, характерной для иммунопозитивных клеток и волокон, и вычислять их площадь (мкм²), а также содержание нейропептида (единицы иммунофлуоресценции – 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 контрольных крыс в области заднего крупноклеточного субъядра ПВЯ (зкПВЯ) и СОЯ выявляются лей-энкефалин-иммунореактивные нейроны примерно в равном количестве (табл. 1). Вместе с тем, нейроны

Таблица 1

Распределение нейронов, синтезирующих лейэнкефалин, в крупноклеточных ядрах гипоталамуса в эксперименте (M±m)

Структуры	Количество иммунопозитивных нейронов		
	Контроль	Диабет, 2 нед.	Диабет, 5 нед.
ПВЯ:	11±2	55±7*	20±3*
СОЯ	12±2	42±6*	8±1

Примечание: достоверность отличий по отношению к контролю: * – p<0,05.

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

Структуры	Площадь иммунореактивного материала, мкм ²			Содержание лей-энкефалина, E _{иф}		
	Контроль	Диабет 2 нед.	Диабет 5 нед.	Контроль	Диабет 2 нед.	Диабет 5 нед.
гипоталамуса	117,9±6,2	103,0±6,5	157,2±3,7*	13,1±0,6	8,4±0,7*	21,6±1,9*
	38,7±2,9	250,0±16,2*	85,8±5,6*	3,1±0,3	18,6±1,3*	5,5±0,4*
ПВЯ:	89,1±4,9	95,8±8,6	74,7±2,5*	7,9±0,6	9,1±0,8	10,5±0,5*
	319,4±13,6	580,6±18,3*	350,1±16,7	22,3±1,0	60,6±2,5*	45,9±2,3*
СОЯ						
Срединное возвышение	508,6±12,0	1357±33*	4246±116*	34,7±0,8	150,0±3,7*	442,4±12,1*

Примечание: достоверность отличий по отношению к контролю: * – p<0,01.

зкПВЯ отличались большими значениями площади материала, иммунореактивного к лей-энкефалину, а содержание пептида в нейронах было примерно на 40% выше (p<0,05), чем в нейронах СОЯ (табл. 2). Вследствие этого суммарное содержание лей-энкефалина в зкПВЯ было выше, чем в СОЯ: 144,1±6,6 E_{иф} против 94,8±74,2 E_{иф}. В области обеих структур идентифицировались нервные волокна, иммунореактивные к лей-энкефалину, площадь которых в области СОЯ в 8 раз, а содержание в них нейропептида в 7 раз превышало данный показатель в области зкПВЯ (табл. 2).

Развитие сахарного диабета у крыс к концу 2 недели приводило к 5-кратному увеличению количества лей-энкефалин-иммунопозитивных нейронов в зкПВЯ в сочетании с 6-кратным увеличением площади иммунореактивного материала и содержания нейропептида в аксонах нейронов. При этом суммарное содержание лей-энкефалина в зкПВЯ увеличивалось более чем в 3 раза: с 144,1±6,6 E_{иф} до 462,0±38,5 E_{иф} (p<0,001). Данные факты в сочетании со снижением содержания лей-энкефалина в телах нейронов на 35% указывали на активацию синтеза и особенно секреции нейропептида в срединное возвышение гипоталамуса, о чем свидетельствует также практически 3-кратное увеличение площади иммунореактивного материала, иммунореактивного к лей-энкефалину и 5-кратное нарастание содержания нейропептида в срединном возвышении.

Дальнейшее течение сахарного диабета к концу 5 недели вызывало уменьшение количества лей-энкефалин-иммунопозитивных нейронов в зкПВЯ в 2,5 раза по отношению к 2-недельному периоду течения патологического процесса, однако численность иммунопозитивных нейронов в структуре оставалась в 2 раза больше, чем у контрольных животных. По сравнению с контролем и 2-недельным периодом течения диабета в иммунопозитивных нейронах наблюдалось достоверное увеличение площади иммунореактивного материала и нарастание содержания лей-энкефалина. Вместе с тем, обращает на себя внимание примерно 3-кратное уменьшение площади иммунореактивного материала и содержания лей-энкефалина в нервных волокнах в области зкПВЯ по отношению к 2-недельному периоду, хотя данные показатели оставались достоверно более значимыми, чем у контрольных животных. Возможно,

Таблица 2

это свидетельствовало об определенном затруднении процессов секреции лей-энкефалина и накопления нейросекрета в нейронах зкПВЯ при сахарном диабете. При этом суммарное содержание лей-энкефалина в зкПВЯ в этот период практически не отличалось от показателей 2-недельного периода и составляло $432,0 \pm 38,0 E_{\text{иф}}$.

В СОЯ к концу 2-недельного периода течения диабета количество лей-энкефалин-иммунопозитивных нейронов увеличивалось в 3,5 раза (табл. 1), однако в клетках площади иммунореактивного материала и содержания самого нейропептида практически не изменялось (табл. 2). В области СОЯ в нервных волокнах на 80% увеличивалась площадь материала, иммунореактивного к лей-энкефалину, с практически 3-кратным нарастанием содержания нейропептида. Вместе с фактом увеличения численности лей-энкефалин-иммунопозитивных нейронов это приводило к существенному увеличению суммарного содержания нейропептида в области СОЯ до $382,2 \pm 33,6 E_{\text{иф}}$ против $94,8 \pm 7,2 E_{\text{иф}}$ в контроле ($p < 0,001$). Указанные изменения, по-видимому, свидетельствовали об умеренной активации процессов синтеза и выведения лей-энкефалина в нейронах крупноклеточного супраоптического ядра.

К концу 5 недели в СОЯ количество лей-энкефалин-иммунореактивных нейронов уменьшалось и достигало показателей контрольной группы. В нейронах наблюдали небольшое, но достоверное уменьшение площади материала, иммунореактивного к лей-энкефалину, при небольшом увеличении содержания нейропептида ($p < 0,01$). В нервных волокнах в области СОЯ площадь иммунореактивного материала уменьшалась до показателей контрольной группы, а содержание лей-энкефалина, хоть и уменьшалось по сравнению с 2-недельным периодом, оставалось в 2 раза большим, чем у контрольных животных. Подобные изменения приводили к снижению общего содержания лей-энкефалина с СОЯ до уровня контроля. Полученные данные свидетельствовали, что развитие сахарного диабета у крыс приводит к усилению процессов синтеза и секреции лей-энкефалина в СОЯ в ранние сроки течения патологического процесса, которое сменяется их угнетением в более поздние сроки диабета.

Иммунофлуоресцентное исследование срединного возвышения гипоталамуса при диабете показало, что к концу 2 недели течения патологического процесса площадь материала, иммунореактивного к лей-энкефалину, увеличивалась в 3 раза, а содержание самого нейропептида – в 4,5 раза (табл. 2). В последующие 3 недели эти показатели примерно выросли еще в 3 раза по сравнению с 2-недельным периодом, что говорит об увеличении поступления лей-энкефалина из гипоталамуса в срединное возвышение при диабете. Сопоставляя полученные данные можно отметить, что в начальный период развития диабета (2 недели) нейроны крупноклеточных ядер ПВЯ и СОЯ могут быть приоритетными источниками посту-

пления лей-энкефалина в срединное возвышение. Однако в дальнейшем, на фоне снижения уровня иммунореактивности к лей-энкефалину в зкПВЯ и СОЯ, очевидно доминирование других гипоталамических источников поступления лей-энкефалина в срединное возвышение. Основываясь на данных специальной литературы, можно предполагать, что такими дополнительными источниками синтеза нейропептида могут быть нейроны мелкоклеточных субъядер паравентрикулярного и аркуатного ядер гипоталамуса, морфофункциональная активность которых при диабете возрастает [1,4].

Выводы

1. Начальный период развития экспериментального сахарного диабета у крыс приводит к увеличению численности лей-энкефалин-иммунореактивных нейронов в крупноклеточных заднелатеральных субъядрах паравентрикулярных ядер и супраоптических ядер гипоталамуса, а также усилением в них синтеза и секреции нейропептида.

2. Длительный период развития сахарного диабета у крыс приводит к торможению синтеза и секреции лей-энкефалина в нейронах крупноклеточных паравентрикулярных и супраоптических ядер.

Литература

1. Колесник Ю.М. Нейроэндокринные и иммунные механизмы развития сахарного диабета / Колесник Ю.М., Абрамов А.В. // Патология. – 2005. – Т. 2, №3. – С. 20–23.
2. Ганчева О.В. Биохимические корреляты метаболических нарушений у потомков самок крыс с экспериментальным гестационным диабетом / Ганчева О.В. // Клінічна та експериментальна патологія. – 2009. – Т. 8, №4. – С. 15–19.
3. Колесник Ю.М. Нейро-иммуно-эндокринные механизмы регуляции эндокринной функции панкреатических островков / Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Ганчева О.В., Камышный А.М., Грекова Т.А. // Загальна патологія і клінічна патофізіологія. – 2010. – Т. 5, №3. – С. 16–20.
4. Kolesnik Yu.M. Participation of various divisions of the hypothalamus in the pathogenesis of experimental diabetes in rats / Kolesnik Yu.M., Abramov A.V., Vasilenko G.V., Zhulinskii V.A. // Neurosci. Behav. Physiol. – 1996. – Vol. 26, №4. – P. 365–371.
5. Saravia F.E. Diabetes increases the expression of hypothalamic neuropeptides in a spontaneous model of type I diabetes, the nonobese diabetic (NOD) mouse / Saravia F.E., Gonzalez S.L., Roig P., Alves V., Homo-Delarche F., De Nicola A.F. // Cell. Mol. Neurobiol. – 2001. – Vol. 21, №1. – P. 15–27.
6. Kim E.M. STZ-induced diabetes decreases and insulin normalizes POMC mRNA in arcuate nucleus and pituitary in rats / Kim E.M., Grace M.K., Welch C.C., Billington C.J., Levine A.S. // Am. J. Physiol. – 1999. – Vol. 276, №5, Pt. 2. – P. R1320–1326.
7. Chang G.-Q. Dietary fat stimulates endogenous enkephalin and dynorphin in the paraventricular nucleus: role of circulating triglycerides / Chang G.-Q., Karatayev O., Ahsan R., Gaysinskaya V., Marwil Z., Leibowitz S.F. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2007. – Vol. 292. – P. E561–E570.
8. Абрамов А.В. Характеристика мет-энкефалин-синтезирующей системы крупноклеточных нейронов гипоталамуса в норме и при экспериментальном сахарном диабете / Абрамов А.В., Карнаух М.Н. // Загальна патологія і клінічна патофізіологія. – 2010. – Т. 5, №3. – С. 27–30.

Сведения об авторе:

Карнаух М.Н., ассистент каф. стоматологии ЗГМУ.

Адрес для переписки:

Карнаух Марина Николаевна, г. Запорожье, ул. Героев Сталинграда, 46. Тел.: (0612) 63 14 71.