

О.В. Ганчева

Значение дисфункции NPY-ергической системы гипоталамуса в формировании нарушений углеводного и жирового обмена при экспериментальной патологии

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: гипоталамус, аркуатное ядро, вентромедиальное ядро, срединное возвышение, крысы линий SHR и Vistar, нейропептид Y, метаболические нарушения, гестационный диабет**Ключові слова:** гіпоталамус, аркуатне ядро, вентромедіальне ядро, серединне підвищення, щури ліній SHR і Vistar, нейропептид Y, метаболічні порушення, гестаційний диабет**Key words:** hypothalamus, arcuate nucleus, ventromedial nucleus, eminentia medialis, SHR rats, Wistar rats, neuropeptide Y, gestational diabetes, metabolic syndrome

Общий результат экспериментальных исследований позволяет сделать следующие выводы: формирование нарушений углеводного и жирового обмена сопровождается изменением морфо-функциональной активности NPY-ергической системы гипоталамуса, которая зависит от этиологии и этапа развития патологического процесса. В патогенезе формирования метаболических нарушений лежит высокая синтетическая и секреторная активность NPY-ергической системы гипоталамуса, одной из причин развития которой является формирующаяся лептинорезистентность нейронов.

Загальний результат експериментальних досліджень дозволяє зробити такі висновки: формування порушень вуглеводного і жирового обміну супроводжується зміною морфо-функціональної активності NPY-ергічної системи гіпоталамусу, яка залежить від етіології та етапу розвитку патологічного процесу. В патогенезі формування метаболічних порушень знаходиться значна синтетична і секреторна активність NPY-ергічної системи гіпоталамусу, однією з причин розвитку якої є лептинорезистентність нейронів.

The results of experimental researches allow us to formulate the following conclusions: the development of carbohydrate and lipid metabolism disorders is accompanied with the changes of NPY hypothalamic system morpho-functional activity which depends on the stage of development and etiology of pathological process. The pathogenesis of metabolic disorders is determined by increased synthesis and secretion of NPY hypothalamic system, which can be caused by development of neurons resistance to leptin.

На протяжении более 15 лет сотрудники кафедры патологической физиологии Запорожского государственного медицинского университета занимаются изучением механизмов нейро-эндокринной регуляции эндокринной функции поджелудочной железы.

В рамках этих исследований мы обратили внимание на NPY-ергическую систему, как одну из важных регуляторов углеводного, жирового и энергетического гомеостазов [1]. Свои эффекты NPY осуществляет путем взаимодействия со специфическими клеточными рецепторами шести подтипов. В зависимости от локализации рецептора – осуществляются различные эффекты:

В ЦНС – нейромедиация, стимуляция потребления пищи, регуляция половой дифференцировки и репродуктивной функции, регуляция секреции аденогипофизарных гормонов [2].

В сердечно-сосудистой системе – регуляция кардиоваскулярных функций, вазоконстрикция [1].

В панкреатических островках, адипоцитах, надпочечниках – регуляция углеводного, жирового и энергетического гомеостаза [3].

По мнению большинства исследователей, регулятором образования нейропептида Y является гормон лептин, который подавляет экспрессию гена NPY в нейронах гипоталамуса [4].

Среди гипоталамических структур максимальное количество NPY-синтезирующих нейронов сосредоточено в аркуатном ядре (АрЯ), паравентрикулярном (ПВЯ), вентромедиальном (ВМЯ) ядре, в меньшем количестве и – в дорсомедиальном (ДМЯ), латеральном гипоталамусе (ЛГ), супраоптическом ядре (СОЯ) [5]. NPY-содержащие аксоны широко распределены в структурах гипоталамуса, однако их наибольшая плотность выявлена в наружной и внутренней зонах срединного возвышения (СВ), ПВЯ, АрЯ, ВМЯ, в меньшей степени – в ДМЯ, ЛГ, СОЯ [6].

В ранее проведенных экспериментальных исследованиях сотрудниками нашей кафедры NPY-ергической системы панкреатических островков при стрептозотоциновой модели диабета было установлено, что гипергликемия и гипоинсулинемия, вследствие деструкции бета-клеток и пролиферации альфа-клеток, сопровождается вначале увеличением количества NPY-синтезирующих клеток в панкреатических островках, а после развития стойких нарушений углеводного обмена – отмечается уменьшение количества NPY-иммунопозитивных клеток [7].

Параллельно в тех же сериях животных в ходе детального исследования NPY-ергической системы гипоталамуса были выявлены изменения активности структуры – на фоне усиления синтеза NPY в АрЯ гипоталамуса, наблюдалось уменьшение его секреции в системный кровоток. В то же время многократное введение экзогенного NPY животным со стрептозотоциновым диабетом способствовало снижению уровня гликемии и повышению концентрации инсулина в крови вследствие увеличения количества бета-клеток и снижения альфа-клеток. Следует отметить, что экзогенный NPY способствовал восстановлению NPY-ергической системы самих панкреатических островков – наблюдалось увеличение количества NPY-синтезирующих клеток и снижение в них концентрации пептида, свидетельствующее о нормализации внутриостровковой секреции NPY [8].

Выявленные изменения состояния NPY-ергической системы гипоталамуса при стрептозотоциновой модели диабета и отмеченное позитивное влияние введенной NPY на состояние панкреатических островков и показатели углеводного обмена позволило нам предположить патогенетическую роль изменений этой системы и при других метаболических нарушениях. В связи с этим в работе

были использованы две разные модели метаболических нарушений – потомки самок с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД) [9] и крысы со спонтанной гипертензией SHR [10].

Цель настоящей работы - изучить, в зависимости от патогенетических механизмов формирования метаболических нарушений, у потомков самок с ЭГД и крыс линии SHR, морфо-функциональное состояние NPY-ергической системы гипоталамуса (АрЯ, ВМЯ и срединное возвышение).

Методы исследования

Исследования были проведены на 30 половозрелых самцах крыс линии Вистар и 15 крысах самцах линии SHR. Животные были распределены на три экспериментальные группы: контрольная группа – половозрелые самцы линии Вистар с нормальными показателями углеводного и жирового обменов; половозрелые самцы линии Вистар, потомки самок с ЭГД [11] и крысы-самцы линии SHR. Каждая группа животных была представлена 15 особями. Животные находились на стандартном рационе при свободном доступе к воде и пище. Крыс декапитировали под этаминаловым наркозом (40 мг/кг, внутривенно), мозг немедленно извлекали и помещали в фиксатор Буэна на 20 часов при комнатной температуре, обезжировали в спиртах возрастающей концентрации, хлороформе, парафине и заливали в парафин. На ротационном микротоме готовили серийные срезы гипоталамуса толщиной 14 мкм, которые затем депарафинировали в ксилоле, проводили регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%, 50%). С помощью метода непрямой иммуофлюоресценции иммуногистохимически в гипоталамусе выявляли иммунопозитивные NPY нейроны. В качестве первичных антител использовали кроличьи антитела к NPY в разведении 1:200 производства Sigma Chemical (США). В качестве вторичных антител использовали козы антитела к полной молекуле IgG кролика, конъюгированные с FITC в разведении 1:100 (Sigma Chemical, США).

Исследовали нейроны АрЯ, ВМЯ ядер гипоталамуса и

терминалы СВ. Идентифицировали NPY-иммунопозитивные нейроны в отдельных структурах гипоталамуса в соответствии со стереотаксическим атласом мозга крысы [12].

Имунофлюоресценцию нейронов с помощью видеокамеры СОНУ-4922 (США) вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). В ходе автоматической обработки полученных изображений определяли: площадь материала, иммунореактивного к NPY (мкм²) и содержание NPY в площади структуры (ядра гипоталамуса, СВ), а также содержание NPY в нейронах или терминалах СВ (E_{иф}). На основании данных показателей судили о состоянии морфо-функциональной активности ядра гипоталамуса или интенсивности нейросекреции. Математический анализ исследуемых структур гипоталамуса проводили с помощью оригинального программного обеспечения, разработанного на основе макроязыка программирования VIDAS.

Во всех экспериментальных группах исследовали показатели жирового (общие липиды, триглицериды, холестерин) и углеводного обменов (концентрацию глюкозы, инсулина) с помощью стандартных наборов, концентрации гормонов инсулина и лептина - иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы Peninsula Laboratories Inc. (США).

Полученные экспериментальные данные обрабатывали параметрической статистикой t-статистикой Стьюдента, считая достоверными отличия в сравниваемых группах при $p_{st} < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Во всех экспериментальных группах у самцов и потомков самок с ЭГД и SHR были выявлены нарушения углеводного и жирового обменов, наблюдалось развитие гипергликемии и гиперинсулинемии, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии (табл. 1). Изменения состояния жирового обмена развивались на фоне увеличенной массы тела животного [10] и гиперлептинемии (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация гормонов и метаболитов в крови у крыс экспериментальных серий (M±m)

Линии животных	Глюкоза, мМоль/л	Инсулин, мкЕД/мл	Лептин, нг/мл	Общие липиды, г/л	Триглицериды, мМоль/л	Общий холестерин, мМоль/л
Вистар (контроль)	3,6±0,1	1,44±0,15	3,6±0,3	3,4±0,1	1,3±0,03	4,9±0,2
Вистар, потомки самок с ЭГД	6,1±0,15*	5,6±0,5*	9,6±0,8*	6,6±0,5*	2,1±0,08*	6,7±0,2*
SHR	5,6±0,12*	1,98±0,19*	6,2±0,7*	5,2±0,16*	2,26±0,09*	8,6±0,25*

Примечание: * – достоверные ($p_{st} < 0,05$) отличия по отношению к контролю

Учитывая тот факт, что эффекты лептина реализуются на уровне гипоталамуса, то, выявленная гиперлептинемия в экспериментальных группах, стала еще одним подтверждением возможных центральных нарушений, возможно трансдукции сигнала лептина на рецепторном или пострецепторном уровнях нейронов гипоталамуса,

в частности ее NPY-ергической системы.

При оценке состояния NPY-ергической системы гипоталамуса, а именно основного места его синтеза – АрЯ, отмечено что, независимо от патогенеза метаболических нарушений, наблюдалась высокая синтетическая активность нейронов АрЯ (табл.2.).

Содержание NPY-иммунопозитивного материала в АрЯ гипоталамуса у крыс в экспериментальных сериях (M±m)

Линии животных	Площадь материала, иммунореактивного к NPY, мкм ²	Концентрация NPY в нейронах, E _{нв}	Концентрация NPY в АрЯ, E _{нв} /мкм ²
Вистар (контроль)	269,1±26,6	0,21±0,006	66,9±6,3
Вистар, потомки самок с ЭГД	394,1±20,8*	0,24±0,003*	101,9±6,3*
SHR	569,5±68,5*	0,15±0,003*	102,4±16,3*

Примечание: * – достоверные ($p_{st} < 0,05$) отличия по отношению к контролю

Так в АрЯ площадь материала, иммунореактивного к NPY, у потомков самок с ЭГД более чем на 25%, а у крыс линии SHR более чем в 1,5 раза превышали контрольные значения, содержание нейропептида Y в площади материала, иммунореактивного к нему, на 40 - 45% в обеих группах превышало показатели контроля. При этом содержание NPY в нейроне имело обратную динамику, у крыс линии SHR на 40% было меньше, чем в контроле, а у потомков самок с ЭГД – на 14% достоверно превысило

значения группы сравнения, что, вероятно, связано с нарушением синтеза и секреции гормона нейросекреторными клетками.

Анализируя морфо-функциональное состояние нейронов ВМЯ гипоталамуса была отмечена разнофазовая активность нейронов, зависящая от экспериментальной модели. Так высокая активность наблюдалась у животных со спонтанной гипертензией, а у потомков самок с ЭГД – отмечалось снижение содержания NPY в нейронах изучаемого ядра (табл. 3).

Таблица 3

Содержание NPY-иммунопозитивного материала в ВМЯ гипоталамуса у крыс

Линии животных	Площадь материала, иммунореактивного к NPY, мкм ²	Концентрация NPY в нейронах, E _{нв}	Концентрация NPY в ВМЯ, E _{нв} /мкм ²
Вистар (контроль)	405±32,3	0,25±0,007	41,7±9,1
Вистар, потомки самок с ЭГД	221,4±17,2*	0,19±0,003*	42,9±3,8
SHR	532,8±34,4*	0,23±0,003*	78,2±12,8*

Примечание: * – достоверные ($p_{st} < 0,05$) отличия по отношению к контролю

Секреция нейропептида из срединного возвышения в системный кровоток также имела определенные особенности: у животных с гипертензией наблюдалось сниже-

ние секреции, а у потомков самок с ЭГД – наоборот, превышала контрольные значения более чем в 2 раза (табл. 4).

Таблица 4

Содержание NPY-иммунопозитивного материала в срединном возвышении гипоталамуса у крыс в экспериментальных сериях (M±m)

Линии животных	Площадь материала, иммунореактивного к NPY, мкм ²	Концентрация NPY в терминалях СВ, E _{нв}	Концентрация NPY в площади среза СВ, E _{нв} /мкм ²
Вистар (контроль)	556,7±61,8	0,26±0,006	179,3±22,5
Вистар, потомки самок с ЭГД	870,1±42,6*	0,34±0,006*	308,3±19,4*
SHR	321,3±21,8*	0,21±0,03*	69,6±5,1*

Примечание: * – достоверные ($p_{st} < 0,05$) отличия по отношению к контролю

Из приведенного материала видно, что при нарушениях углеводного и жирового обмена при различных экспериментальных моделях метаболических нарушений отмечается комплексная направленность изменений NPY-ергической системы гипоталамуса в сторону ее повышения. Это проявляется в изменении синтеза нейронами гипоталамуса NPY и его секреции в системный кровоток через срединное возвышение. На основании этого можно признать патогенетическую роль дисфункции изученной нами системы в формировании метаболических нарушений. Однако, учитывая однонаправленность изменений NPY-ергической системы гипоталамуса при этиологически различных метаболических нарушениях, мы полагаем, что эти изменения и их последствия связаны не только с самой системой, но и с дисфункцией панкреатических островков, лептинорезистентностью, инсулинорезистентностью периферических тканей и другими нейро-эндокринными нарушениями.

Общий результат экспериментальных исследований позволяет сделать следующие выводы: формирование нарушений углеводного и жирового обмена сопровождается изменением морфо-функциональной активности NPY-ергической системы гипоталамуса, которая зависит от этапа развития патологического процесса и этиопатогенеза патологии. В патогенезе формирования метаболических нарушений лежит высокая синтетическая и секреторная активность NPY-ергической системы гипоталамуса, одной из причин развития которой является формирующаяся лептинорезистентность нейронов.

Литература

1. Пальцев М.А., Кветной И.М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии / Москва: «Медицина», 2006. - 381 с.
2. Резников А.Г., МакКенн С.М. Изменения секреции гормонов гипофиза при введении нейропептида Y в третий желудочек мозга // Физиол. журнал. - 1993. - Т. 39, №1. - С. 83-89.
3. Hoyle C.H.V. Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives // Brain Res. - 1999. - V. 848. - P. 1-25.

4. Housenknecht K.L., Baile C.A., Matteri R.L., Spurlock M.E. The biology of leptin: a review // J. of animal science. - 1998. - V. 76, №5. - P.1405-1413.

5. Williams G., Steel J.H., Polak J.M., Bloom S.R. Neuropeptide Y in the hypothalamus // Neuropeptide Y, ed. Victor Mutt et. al. New York: Raven Press. - 1989. - P. 243-251.

6. Horvath T.L., Naftolin F., Leranthe C. et al. Morphological and pharmacological evidence for neuropeptide Y-galanin interactions in the rat hypothalamus. // Endocrinology. - 1996. - V.137. - P. 3069-3077.

7. Колесник Ю.М., Траилин А.В., Орловский М.А. Источники синтеза нейропептида Y в островках Лангерганса у нормальных и диабетических животных // Запорожский медицинский журнал. - 2000, №4. - С.9-12.

8. Колесник Ю.М., Траилин А.В., Абрамов А.В. Гормональные эффекты нейропептида Y у интактных и диабетических животных // Сб. науч. тр. "Лекарства - человеку" - Харьков, 1998. Т.6. - С.232-235.

9. Колесник Ю.М., Ганчева О.В., Абрамов А.В., Беленичев И.Ф. Метаболические нарушения у потомков самок крысы линии Вистар с экспериментальным гестационным диабетом. // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, Харків, 9-10 лютого 2006р. - Харків - 2006 - С.51-53.

10. Колесник Ю.М., Ганчева О.В., Абрамов А.В., Камышин А.М. Крысы линии SHR со спонтанной гипертензией как модель для изучения метаболических нарушений // Запорожский медицинский журнал. - 2007. - №1. - С.5-10.

11. Декларацийний патент України № 17281 «Спосіб моделювання гестаційного діабету у щурів лінії Вистар для вивчення його наслідків для нащадків» // Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Беленічев І.Ф., Ганчева О.В., Камышин А.М., Грекова Т.А. // Оpubл. 15.09.2006 в Бюл. №9.

12. Paxinos G.B., Watson C.C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates // Sydney, Academia Press second edit. - 1986. - 264 pp.

Сведения об авторе:

Ганчева О.В., к.мед.н., доцент кафедры патологической физиологии.

Адрес для переписки: 69035, г. Запорожье, пр. Маяковского 26, ЗГМУ, Кафедра патологической физиологии.

Тел.: (0612)34-35-61