

Ю.М. Колесник, Є.В. Каджарян, А.В. Абрамов

Вплив переривчастих гіпоксичних тренувань на функціональний стан кортиколіберин- і β -ендорфінсинтезуючих нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамуса щурів

В експерименті на щурах показано, що гіпоксичні тренування призводять до посилення імунореактивності до кортиколіберину і β -ендорфіну та збільшення їх вмісту у паравентрикулярному ядрі гіпоталамуса. При цьому показник відношення площі імунореактивного матеріалу до вмісту кортиколіберину і β -ендорфіну, а також коефіцієнт їх вмісту в паравентрикулярному ядрі суттєво не змінювалися у порівнянні з контролем. Таким чином, обраний режим гіпоксичних впливів призводить до адаптації організму, що виражається у збалансованій активності стрес-реалізуючої та стрес-лімітуючої систем гіпоталамуса щурів.

Ключові слова: гіпоталамус, переривчаста гіпоксія, нейропептиди.

ВСТУП

Добре відомо, що послідовність патогенетичних ланок розвитку стресу лишається незмінною та визначається реактивністю гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи [14, 15]. Ключовим її елементом є гіпоталамічні нейрони, що синтезують кортикотропін-релізінг-гормон (кортиколіберин) [9], значна частка яких локалізована у медіальному дрібноклітинному суб'ядрі паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (ПВЯ) [18]. Саме кортиколіберин активує каскад нейроендокринної відповіді на дію стресового фактора, в результаті чого з надниркових залоз виділяються основні гормони стресу – глюкокортикоїди [7, 9, 17]. Ступінь підвищення їх секреції визначає силу і специфіку дії стресу, а також його наслідки для організму [7, 10]. З іншого боку, нейросекреторні клітини ПВЯ виділяють β -ендорфін, який регулює інтенсивність нейроендокринної відповіді на стрес [12]. Одним з позитивних результатів останнього є розвиток адаптаційних реакцій у

© Ю.М. Колесник, Є.В. Каджарян, А.В. Абрамов

ключових органах і системах, відповідальних за формування резистентності до стресового фактора [5]. Відомо, що універсальною за своєю природою впливу на організм є гіпоксична гіпоксія, яка при багатоденному застосуванні викликає стійке підвищення загальної резистентності організму при диханні газовими сумішами із 14–16%-м вмістом O_2 для людини і 8–11%-м O_2 для лабораторного щура [19].

Метою цього дослідження було вивчити особливості функціонального стану нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ гіпоталамуса щурів при багатоденному впливі гіпоксичної гіпоксії.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 30 самцях щурів лінії Вістар масою 230–250 г. Переривчасті гіпоксичні тренування здійснювали у вентиляваній барокамері 6-годинною експозицією щурів на “висоті” 6000 м ($pO_2=9,8\%$) протягом 15 діб [2]. Мозок інтактних (контрольних) та експериментальних тварин виймали після декапітації, фіксували у рідині Буена

та після стандартної обробки заливали у парапласт ("MkCormic", США). На ротаційному мікромомі Microm-325 ("Microm Corp.", Німеччина) отримували серійні фронтальні зрізи гіпоталамуса завтовшки 7 мкм для гістохімічного забарвлення на РНК і 14 мкм – для імунофлюоресцентного виявлення нейропептидів. Зрізи депарафінували та демаскували у РТ-модулі ("Thermo Scientific", США) у цитратному буферному розчині ("Thermo Scientific", США). Для визначення вмісту нуклеїнових кислот, переважно РНК, гістологічні зрізи забарвлювали галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсоном [6] та заливали полімерним середовищем EUKITT ("O.Kindler GmbH", Німеччина). Для визначення вмісту нейропептидів гістологічні зрізи інкубували у вологій камері (+4 °C, 24 год) із поліклональними антитілами до кортикотропін-релізінг-гормону ("Sigma Chemical", США), β -ендорфіну ("Santa Cruz Biotechnology", США) у розведенні 1:200, а потім із вторинними антитілами, кон'югованими із FITC ("Sigma Chemical", США) у розведенні 1:64 у вологій камері (37 °C, 45 хв) і заключали в суміш гліцерин/фосфатного буфера (9:1).

Вивчення зрізів, забарвлених на РНК, проводили у видимому спектрі, а зрізів, забарвлених на нейропептиди – в ультрафіолетовому спектрі збудження за допомогою світлофільтра 38HE з високою емісією ("Carl Zeiss", Німеччина) на мікроскопі AxioImager-M2 ("Carl Zeiss", Німеччина). Отримане зображення за допомогою 16-бітної відеокамери AxioCam5HRm ("Carl Zeiss", Німеччина) записували у вигляді комп'ютерного файлу для подальшої обробки системою цифрового зображення AxioVision 4.8.2 ("Carl Zeiss", Німеччина).

У кожній серії зрізів, забарвлених на РНК, у інтерактивному режимі визначали не менш ніж 1000 нейронів, що містять ядрце. Далі в автоматичному режимі обчислювали морфометричні параметри нейронів – площа та еквівалентний діаметр клітин, їх ядер, ядерець та цитоплазми, а також денситометричні характеристики – оптична густина ядер,

ядерець і цитоплазми клітин, які зумовлені рівнем накопичення РНК.

У зрізах з імуноним забарвленням на нейропептиди досліджували не менш ніж 200 полів зору у кожній серії. Далі в автоматичному режимі визначали зони із статистично значимою флюоресценцією, задля яких обчислювали абсолютну площу імунореактивного матеріалу, його відносне значення у стандартному полі зору площею приблизно 40 000 мкм², а також денситометричні характеристики – концентрація та питомий вміст нейропептиду, які були зумовлені інтенсивністю флюоресценції.

Вміст кортикостерону у сироватці крові визначали імуноферментним методом за допомогою комерційного набору ("DRG", США).

Отримані результати обробляли пакетом статистичних програм, для оцінки вірогідності відмінностей в групах застосовували критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що у ПВЯ гіпоталамуса виділяють ділянки скупчення великих і дрібних клітин, які формують так звані суб'ядра [4]. Дрібноклітинна частина ПВЯ складається з 5 суб'ядер: переднього, перивентрикулярного, дорсального, латерального та найбільшого – медіального. Однак клітинний вміст останнього також неоднорідний і включає поодинокі великі нейрони [16]. Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що це нейрони з площею перикаріону більш ніж 80 мкм² (середня площа 89,8±0,8 мкм²) і їхня частка в ПВЯ становить 10–12 % (табл.1). Окрім них у суб'ядрі визначаються дуже дрібні нейрони з площею перикаріону менше як 45 мкм² (середня площа 38,2±0,6 мкм²). Основна частина клітинної популяції ПВЯ це – нейрони середньої величини із площею перикаріону 59,38±0,24 мкм². Подальший аналіз отриманих результатів буде пов'язаний саме з цією групою клітин.

Таблиця 1. Відносна кількість (%) нейронів паравентрикулярного ядра різної площі (M±m)

Серії досліджень	Площа нейронів		
	<45 мкм ²	45-80 мкм ²	> 80 мкм ²
Контроль	7,16±0,80	81,25±1,34	11,60±1,06
Гіпоксичні тренування	6,39±0,45	81,98±1,07	11,63±1,02

Гіпоксичні тренування не впливали на клітинний вміст ПВЯ (див. табл. 1), однак призводили до помірної гіпертрофії нейронів за рахунок збільшення площі їх ядер на 2,4 % та цитоплазми на 5,7 %. У цитоплазмі також зростав вміст РНК на 25,6 % (табл. 2). Подібні ефекти впливу багатодобових гіпоксичних тренувань відзначалися у попередніх наших дослідженнях, причому зміни морфофункціонального стану дрібноклітинних нейронів ПВЯ поєднувались зі збільшенням резистентності організму тварин до дії гострої гіпоксії [1].

Відомо, що дрібноклітинні нейрони ПВЯ синтезують більш ніж 30 різноманітних нейропептидів, основними з яких є кортиколіберин і тіроліберин, а також нейротензин, холецистокінін, вазоактивний інтестинальний пептид, вазопресин, ендорфіни, енкефаліни [3, 19]. Однак невеликий об'єм цитоплазми цих нейронів не дає змоги накопичувати нейропептиди у великій кількості, що ускладнює їх імуногістохімічне виявлення, особливо у інтактних тварин. Тому більшість дослідників для визначення вмісту нейропептидів застосовують прижиттєве введення у шлуночки мозку колхіцину, який руйнує мікротрубочки нейронів і блокує транспорт нейросекрету в аксони. У наших дослідженнях ми не використовували колхіцин і тому при аналізі імунофлюоресцентної реакції не визначались

нейрони з цитоплазмою, що була повністю заповнена імунореактивним матеріалом до кортиколіберину або до β-ендорфіну. Головним чином у ПВЯ імунореактивний матеріал розташовується дифузно у вигляді скупчень різного розміру. При цьому у контрольних тварин матеріал, імунореактивний до кортиколіберину, займав приблизно 1,2 % площі зрізу ПВЯ, що на 48 % перевищувало площу, зайняту матеріалом, імунореактивним до β-ендорфіну (табл. 3). Хоча концентрація останнього в зонах імунореактивності була вища, тим не менш відносний вміст кортиколіберину в ПВЯ на 32 % перебільшував аналогічний показник до β-ендорфіну.

Гіпоксичні тренування призводили до збільшення імунореактивності до кортиколіберину втричі і до β-ендорфіну у 3,1 раза, в результаті чого питомий вміст кортиколіберину у ПВЯ зростав у 8,5 раза, а β-ендорфіну – у 7 разів (див. табл. 3). Отримані результати добре узгоджуються з відомими фактами про збільшення синтезу кортиколіберину у гіпоталамусі у відповідь на дію стресового фактора будь-якої етіології. Надходження кортиколіберину по аксонам дрібноклітинних нейронів до терміналів у серединне підвищення гіпоталамуса з наступним його транспортом по системі портальних судин аденогіпофіза, призводить до активації

Таблиця 2. Морфометричні характеристики і вміст РНК у нейронах площею 45–80 мкм² (M±m)

Серії досліджень	Площа клітин, мкм ²	Ядра		Ядерця		Цитоплазма	
		площа, мкм ²	вміст РНК, ум.од.	площа, мкм ²	вміст РНК, ум.од.	площа, мкм ²	вміст РНК, ум.од.
Контроль	59,38±0,24	38,49±0,17	10,42±0,08	2,72±0,06	4,18±0,12	20,89±0,20	5,06±0,06
Гіпоксичні тренування	61,51±0,22*	39,42±0,18*	10,58±0,09	2,83±0,07*	4,39±0,13	22,09±0,20*	6,36±0,05

Примітка. Тут і в табл. 3 *P<0,001 відносно контролю.

Таблиця 3. Характеристика імунореактивності в паравентрикулярному ядрі (M±m)

Нейропептид	Площа імунореактивного матеріалу, %		Концентрація нейропептиду, ум.од.		Вміст нейропептиду, тис. ум.од./мм ²	
	контроль	переривчаста гіпоксія	контроль	переривчаста гіпоксія	контроль	переривчаста гіпоксія
Кортиколіберин	1,19±0,21	3,56±0,29*	0,38±0,01	1,1±0,06*	4,627±0,838	39,279±3,306*
β-Ендорфін	0,8±0,12	2,51±0,25	0,43±0,03	0,99±0,05	3,503±0,538	24,921±2,563

секреції адренкортикотропного гормону (АКТГ) [3, 11, 13]. Крім того, у кортикотрофах кортиколіберин стимулює експресію гена проопіомеланокортину – гормону, що є попередником АКТГ та β-ендорфіну [7]. Під впливом АКТГ ендокриноцити кори надниркових залоз секретують глюкокортикоїди, які, з одного боку, регулюють метаболічні процеси, пов'язані з відповіддю організму на стрес, а, з іншого, формують функціональний механізм негативного зворотного зв'язку на рівні аденогіпофіза та гіпоталамуса, гальмуючи секрецію АКТГ і кортиколіберину відповідно [7, 8]. Подібна реакція була показана і вивчена у експерименті та за клінічних умов на прикладі травматичного, емоційного, іммобілізаційного та інших видах стресу, що дає змогу віднести кортиколіберинергічну систему ПВЯ до стрес-реалізуючих систем мозку [11]. Дійсно, у наших дослідженнях гіпоксичні тренування призводили до підвищення концентрації у крові основного глюкокортикоїду щурів – кортикостерону – з 218,0±32,6 до 358,9±17,4 мг/мл, тобто на 64 % (P<0,01).

З іншого боку, гіпоксична гіпоксія, як вже згадувалося, підвищувала активність β-ендорфінергічної системи ПВЯ, яка відноситься до стрес-лімітуючих систем і контролює активність кортиколіберинергічної системи на рівні гіпоталамуса. Слід відмітити той факт, що гіпоксичні тренування не впливали на співвідношення площі імунореактивного матеріалу до кортиколіберину та β-ендорфіну – 1,42±0,12 щодо 1,48±0,27 в контролі (P>0,05), та не змінювали коефіцієнт їх вмісту в ПВЯ – 1,58±0,13 щодо 1,32±0,24 в контролі (P>0,05). На наш погляд, стабіль-

ність цих показників у відповідь на гіпоксичні тренування свідчить про збалансоване підвищення активності стрес-реалізуючої та стрес-лімітуючої систем і відображає особливості нейроендокринної відповіді на гіпоксичні впливи, які в режимі, що був нами застосований, чинять тренувальний ефект і підвищують загальну резистентність організму.

Таким чином, гіпоксичні тренування призводять до збалансованої активації стрес-реалізуючої та стрес-лімітуючої систем гіпоталамуса, викликають помірну гіпертрофію дрібноклітинних нейронів ПВЯ гіпоталамуса та накопичення РНК у цитоплазмі, пропорційно підвищують площу матеріалу, імунореактивного до кортиколіберину та β-ендорфіну у ПВЯ та збільшують вміст нейропептидів.

Ю.М. Колесник, Е.В. Каджарян, А.В. Абрамов

ВЛИЯНИЕ ПРЕРЫВИСТЫХ ГИПОКСИЧЕСКИХ ТРЕНИРОВОК НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КОРТИКОЛИБЕРИН- И В-ЭНДОРФИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ НЕЙРОНОВ ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА КРЫС

В эксперименте на крысах показано, что гипоксические тренировки приводят к усилению иммунореактивности к кортиколиберину и β-ендорфину и повышению их содержания. При этом показатель отношения площади иммунореактивного материала к кортиколиберину и β-ендорфину, а также коэффициент их содержания в паравентрикулярном ядре гипоталамуса существенно не менялся по сравнению с контролем. Таким образом, выбранный режим гипоксических воздействий приводит к адаптации организма, что выражается в сбалансированной активности стресс-реализующей и стресс-лимитирующей систем гипоталамуса крыс.

Ключевые слова: гипоталамус, прерывистая гипоксия, нейропептиды.

Yu.M. Kolesnik, E.V. Kadzharyan, A.V. Abramov

THE INFLUENCE OF THE INTERMITTENT HYPOXIA TRAININGS ON THE FUNCTIONAL STATUS OF CORTICOLIBERIN- AND BETA-ENDORPHIN-SYNTHESIZING NEURONS OF THE PARAVENTRICULAR NUCLEUS HYPOTHALAMUS IN RATS

The experiments show that hypoxia training leads to an increase of the immunoreactivity to corticotropin and beta-endorphin and to an increase of the content of these neuropeptides. In this case, the ratio of the area of the immunoreactive material to the corticotropin / beta-endorphin, and the coefficient of their content in the PVN did not change significantly compared with the control. Thus, the selected hypoxia mode leads to adaptation, which is reflected in the balanced activity of stress-realizing and stress-limiting systems of rats' hypothalamus. Key words: hypothalamus, intermittent hypoxia, neuropeptides

Zaporozhye State Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Абрамов А.В., Колесник Ю.М. Влияние гипоксии на функциональное состояние нейросекреторной системы гипоталамуса крыс // Физиолог. журн. им. И.М. Сеченова. – 1992. – **78**, № 7. – С. 21–27.
- Абрамов А.В., Колесник Ю.М., Иваненко Т.В. Вплив переривчастої гіпоксії на функціональний стан бета-клітин панкреатичних островців при експериментальному цукровому діабеті // Здобутки клініч. і експерим. медицини. – 2011. – № 2(13). – С. 10–13.
- Акмаев И.Г., Гриневич В.В. Нейроиммуноэндокринология гипоталамуса. – М.: Медицина, 2003. – 168 с.
- Гоуфман Е.И. Клеточная организация паравентрикулярных ядер гипоталамуса крысы // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1990. – **98**. – С. 46–51.
- Меерсон Ф. Адаптация, стресс и профилактика. – М.: Наука, 1981. – 279 с.
- Пирс Э. Гистохимия / Пер. с англ. – М.:Изд-во ин. лит-ры., 1962. – 962 с.
- Резников А.Г. Эндокринологические аспекты стресса // Междунар. эндокрин. журн. – 2007. – **4**(10). – С. 20–24.
- Benjamin H., Jeffry L., Tasker G. Synaptic regulation of the hypothalamic – pituitary adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress // Front Cell Neurosci. – 2012. – **6**. – P. 24–28.
- Bonfiglio J.J., Inda C., Refojo D., Holsboer F., Arzt E., Silberstein S. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved // Neuroendocrinology. – 2011. – **94**. – P. 12–20.
- Busnardo C., Tavares R.F., Resstel B.M. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats // Aut. Neurosci.: Basic and clinical. – 2010. – **58**. – P. 51–58.
- Flak J.N., Ostrander M.M., Tasker J.G., Herman J.P. Chronic stress – induced neurotransmitter plasticity in the PVN // J.Comp. Neurol. – 2009. – **517**. – P. 156–165.
- Kovalitskaya Y.A., Novolotskaya E.V. Nonopioid effect of beta-endorphin // Biochemistry (Mosc). – 2011. – **76**. – P. 379–393.
- Seasholtz A.F., Valverde R.A., Denver R.J. Corticotropin-releasing hormone-binding protein: biochemistry and function from fishes to mammals // J. Endocrinol. – 2002. – **75**. – P. 89–97.
- McEwen B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain // Physiol Rev. – 2007. – **87**. – P. 873–904.
- McEwen B.S. The brain is the central organ of stress and adaptation // Neuroimage. – 2009. – **47**. – P. 911–913.
- Silva S.M., Paula-Barbosa M.M., Dulce Madeira M. Prolonged alcohol intake leads to reversible depression of corticotrophin-releasing hormone and vasopressin immunoreactivity and mRNA levels in the parvocellular neurons of the paraventricular nucleus // Brain Res. – 2002. – **954**. – P. 82–93.
- Shakh H.I., Kriski K.R., Smith H.J. Corticotropin-releasing hormone system polymorphism are associated with children's cortisol reactivity // Neuroscience. – 2013. – **229**. – P. 1–11.
- Swanson L.W., Sawchenko P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei // Ann. Rev. Neurosci. – 1983. – **6**. – P. 269–324.
- Xi L., Serebrovskaya T.V. Intermittent hypoxia: from molecular mechanism to clinical applications. – New York.: Nova Science Publishers, 2009. – 615 p.

Zaporізьк. мед. ун-т
E-mail: abramov@zsmu.pp.ua

Матеріал надійшов до редакції 12.03.2013