

© К. Ю. Моисеев, А. И. Емануйлов, П. М. Маслюков, 2019
УДК 611.814.1.018:599.323.4

К. Ю. Моисеев¹, А. И. Емануйлов², П. М. Маслюков¹

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОНОВ ВЕНТРОМЕДИАЛЬНОГО И ДОРСОМЕДИАЛЬНОГО ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ

¹ Кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. П. М. Маслюков), ² кафедра анатомии человека (зав. — проф. Т. А. Румянцева), ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России

Цель — выявление локализации, процентного содержания и морфометрических характеристик иммунопозитивных (ИП) нейронов к нейрональной синтазе оксида азота (nNOS) и кальбиндину (КБ) в вентромедиальном (ВМЯ) и дорсомедиальном (ДМЯ) ядрах гипоталамуса крысы.

Материал и методы. Работа выполнена на крысах-самках линии Вистар в возрасте 3–4 мес с использованием иммуногистохимических методов.

Результаты. nNOS-ИП- и КБ-ИП-нейроны обнаруживаются в ВМЯ и ДМЯ. ВМЯ и ДМЯ являются гетерогенными по нейрохимическому составу. Наибольший процент интенсивно флюоресцирующих КБ-ИП-нейронов обнаруживался в ДМЯ в вентральной области ядра, в ВМЯ КБ-ИП-нейроны со слабой флюоресценцией в большом количестве выявлялись в вентролатеральной области. Во всех областях ДМЯ и ВМЯ определялись nNOS-ИП-нейроны с низкой интенсивностью флюоресценции. Средняя площадь сечения КБ-ИП и nNOS-ИП клеток ВМЯ и ДМЯ значимо не отличалась по сравнению с иммунонегативными нейронами.

Выводы. Нейроны ядер гипоталамуса ВМЯ и ДМЯ, участвующие в регуляции обмена веществ и энергии в организме, содержат nNOS и КБ. В свою очередь, ВМЯ и ДМЯ являются гетерогенными по своему нейрохимическому составу.

Ключевые слова: гипоталамус, вентромедиальное ядро, дорсомедиальное ядро, нейрональная синтаза оксида азота, кальбиндин

Введение. Гипоталамус является наиболее важным интегратором вегетативной и эндокринной регуляции и отвечает за рост, развитие, репродуктивную функцию и метаболизм. Вентромедиальное (ВМЯ) и дорсомедиальное (ДМЯ) ядра гипоталамуса являются критичными для регулирования трофики и поддержания гомеостаза энергии всего тела [3, 10].

В составе ВМЯ выделяют периферическую (shell) и центральную (core) зоны, которую, в свою очередь, подразделяют на дорсомедиальную (ВМДМ), центральную (ВМЦ), вентролатеральную (ВМВЛ) области. ДМЯ подразделяют на дорсальную (ДМД), компактную (ДМК) и вентральную (ДМВ) области [8].

Оксид азота (NO) представляет собой внутри- и межклеточный медиатор, который выполняет различные функции сигнализации [2, 5]. Как у взрослых, так и у новорожденных мышей экспрессия фермента синтеза NO — нейрональной синтазы оксида азота (nNOS) в значительной степени ограничивается областями гипоталамуса, которые участвуют в контроле таких функций организма, как энергетический баланс и размножение [3, 4].

Кальбиндин массой 28 килодальтон (КБ) является кальций-связывающим белком, а также кальциевым сенсором [9]. КБ селективно выявляется в отдельных популяциях центральной и периферической нервной системы, в том числе и в гипоталамических ядрах [6].

Цель работы — определение локализации, процентного содержания и морфометрических характеристик иммунопозитивных (ИП) нейронов к nNOS и КБ в ВМЯ и ДМЯ ядрах гипоталамуса крысы при помощи иммуногистохимических методов.

Материал и методы. Работа выполнена на пяти 3–4-месячных крысах-самках линии Вистар. Исследование проводилось с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). На проведение исследования получено разрешение этического комитета Ярославского государственного медицинского университета (№ 29 от 21.02.2019 г.). После введения летальной дозы уретана (3 г/кг внутривенно) животных перфузировали транскардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS, 0,01M, pH 7,4) (Биолот, Россия), затем 4% раствором параформальдегида (Sigma, США) на PBS. После перфузии головной мозг извлекали и иссекали участок гипоталамуса, содержащий ВМЯ и ДМЯ согласно координатам атласа мозга крысы [9], после чего помещали

Сведения об авторах:

Маслюков Петр Михайлович (e-mail: mpm@ysmu.ru), Моисеев Константин Юрьевич, кафедра нормальной физиологии с биофизикой; Емануйлов Андрей Игоревич, кафедра анатомии человека, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

в ту же фиксирующую смесь, в которой производили перфузию, на 1–2 ч. Серии срезов толщиной 12 мкм изготавливали на криостате.

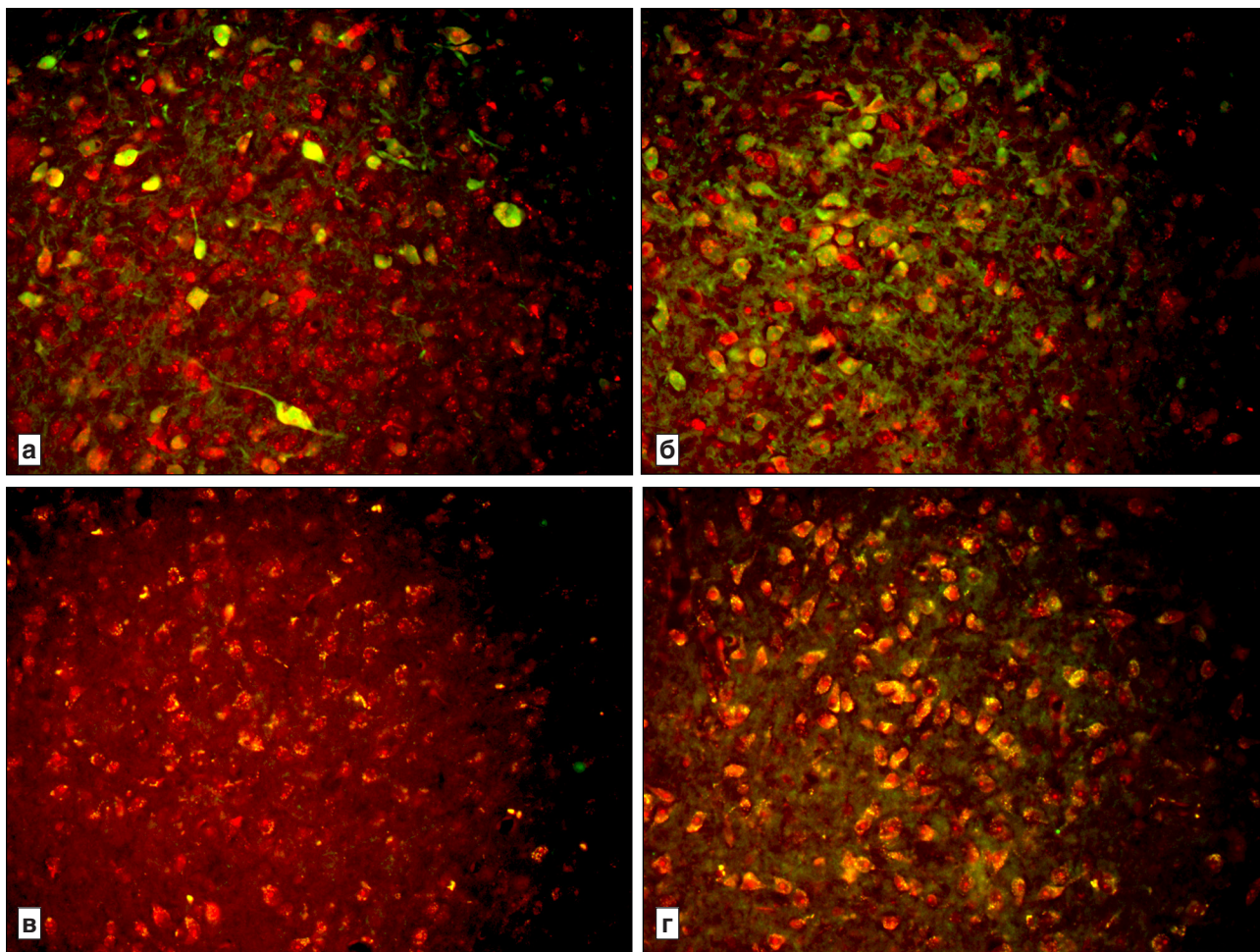
Для выявления нейронов, содержащих nNOS, использовали первичные антитела козы (Abscam, США, разведение 1:300), для идентификации КБ — антитела кролика (Abscam, США, разведение 1:500), вторичные антитела осли против козы или кролика были конъюгированы с флюорохромом флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC, разведение 1:100, Jackson Immunoresearch, США), дающим зеленую флюоресценцию. Негативные контроли проводили с отсутствием первичных или вторичных антител. Для расчета доли иммунопозитивных нейронов производили мечение всей нейронной популяции красителем Neuro Trace Red, который является селективным красителем нейронального вещества Ниссля (Molecular Probes, США, разведение 1:500) с красной флюоресценцией.

Анализ препаратов проводили на флюоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD-камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). Для анализа размеров и процентного соотношения иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали про-

грамму Image J (НИН, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Долю иммунопозитивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нервные клетки, в которых срез прошел через ядро. Для определения площади сечения нейронов в случайном порядке брали 100 нейронов, иммунопозитивных к каждому из исследованных маркеров в каждой возрастной группе. Проводили количественную оценку интенсивности флюоресценции. Она определялась в условных единицах яркости от черного (0) до белого цвета (255) также при помощи программы ImageJ.

Математическая обработка данных проведена с использованием пакета прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, USA). Все величины представлены как средняя арифметическая \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Значимость различий средних величин определяли по методикам ANOVA, критериям Вилкоксона и Манна—Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Результаты показали, что ВМЯ и ДМЯ являются гетерогенными по нейрохимическому составу. Иммунофлюоресценция к КБ и nNOS различалась в отдельных областях ВМЯ и ДМЯ (рисунки).



Иммуногистохимическая реакция к кальбиндину (а, б) и нейрональной синтазе оксида азота (в, г) в компактной области дорсомедиального ядра (а, в) и вентролатеральной области вентромедиального ядра (б, г).

Двойное флюоресцентное иммуномечение: кальбиндин, нейрональная синтаза оксида азота — FITC (зеленый), а также Neuro Trace Red (красный). Об. 20, ок. 10

Таблица 1

Интенсивность иммунофлуоресценции нейронов, иммунопозитивных к кальбиндину (КБ-ИП) и нейрональной синтазе оксида азота (nNOS-ИП), в различных областях вентромедиального (ВМЯ) и дорсомедиального (ДМЯ) ядер (n=5)

Ядро		КБ-ИП	nNOS-ИП
ВМЯ	ВМДМ	19±0,3	21±1,3
	ВМЦ	17±1,4	20±1,4
	ВМВЛ	15±4,8	19±1,3
ДМЯ	ДМД	41±3,2*	18±1,5
	ДМК	44±4,1*	18±1,4
	ДМВ	49±2,9*	19±0,9

Примечание. Здесь и табл. 2, 3: ВМДМ — дорсомедиальная, ВМЦ — центральная, ВМВЛ — вентролатеральная области вентромедиального ядра; ДМД — дорсальная, ДМК — компактная, ДМВ — вентральная области дорсомедиального ядра.

* Различия значимы по сравнению с ВМЯ при $p < 0,001$.

Таблица 2

Процентное содержание нейронов, иммунопозитивных к кальбиндину (КБ-ИП) и нейрональной синтазе оксида азота (nNOS-ИП) в различных областях вентромедиального (ВМЯ) и дорсомедиального (ДМЯ) ядер (n=5)

Ядро		КБ-ИП	nNOS-ИП
ВМЯ	ВМДМ	2±0,3	73±5,8
	ВМЦ	7±1,4	67±1,4
	ВМВЛ	47±4,8*	98±0,6*
ДМЯ	ДМД	37±3,2*	76±4,5
	ДМК	35±4,1*	79±3,6
	ДМВ	49±2,9*	68±6,3

* Различия значимы по сравнению с ВМДМ и ВМЦ при $p < 0,05$.

Таблица 3

Средние площади сечения нейронов, иммунопозитивных к кальбиндину (КБ-ИП) и нейрональной синтазе оксида азота (nNOS-ИП) в различных областях вентромедиального (ВМЯ) и дорсомедиального (ДМЯ) ядер (n=100 для каждой области, мкм²)

Ядро		КБ-ИП	nNOS-ИП
ВМЯ	ВМДМ	138±5,1	133±6,1
	ВМЦ	132±4,3	134±7,8
	ВМВЛ	137±7,2	128±6,4
ДМЯ	ДМД	128±5,1	126±5,2
	ДМК	122±6,3	119±6,6
	ДМВ	126±5,8	120±6,3

Интенсивно флуоресцирующие КБ-ИП-нейроны выявлялись во всех областях ДМЯ. Наибольший процент интенсивно флуоресцирующих КБ-ИП-нейронов обнаруживался в ДМЯ в вентральной области ядра (табл. 1, 2).

В ВМЯ КБ-ИП-нейроны имели слабую флуоресценцию (см. табл. 1). При этом их наибольшее процентное содержание отмечалось в вентролатеральной области ($p < 0,05$). В дорсомедиальной и центральной областях процент КБ-ИП был очень низким.

nNOS-ИП-нейроны определялись во всех областях ДМЯ и ВМЯ с низкой интенсивностью флуоресценции (см. табл. 1, 2, рисунок). При этом в обоих ядрах процент nNOS-ИП-нейронов был выше по сравнению с КБ-ИП.

Нейроны ВМЯ и ДМЯ ядер имели небольшие размеры, на срезах тела нейронов имели круглую и овальную форму. Средняя площадь сечения КБ-ИП- и nNOS-ИП-клеток в ВМЯ и ДМЯ не отличалась от иммунонегативных нейронов ($p > 0,05$, табл. 3).

Обсуждение полученных данных. В результате проведения настоящего исследования получены данные о локализации и морфологических особенностях КБ-ИП- и nNOS-ИП-нейронов в ВМЯ и ДМЯ. КБ-ИП- и nNOS-ИП-нейроны выявлялись в обоих ядрах, при этом степень отличалась в различных областях ядер. Наибольший процент КБ-ИП-нейронов отмечался в ВМЯ в вентролатеральной области, а в ДМЯ — в вентральной. В обоих ядрах процент nNOS-ИП-нейронов был значимо выше по сравнению с КБ-ИП. Полученные нами результаты соответствуют литературным данным, полученным на мышцах [4, 6].

Ионы Ca^{2+} и NO являются универсальными внутриклеточными посредниками и играют важную роль в регуляции разнообразных нейрональных процессов. NO является универсальной сигнальной молекулой, которая может модулировать активность нейронов различными способами: как внутриклеточный мессенджер, работающий на уровне отдельного синапса, или передача сигнала диффузного типа [2, 5].

КБ выполняет функцию не только кальциевого буфера, но и кальциевого сенсора [9]. Среди факторов, регулирующих развитие синапсов и их пластичность, важное значение имеет поддержание определенной концентрации ионов Ca^{2+} , которое может изменяться в пространстве и во времени, и важная роль в этом отводится КБ [1, 7].

Заключение. Таким образом, нейроны ядер гипоталамуса ВМЯ и ДМЯ, ответственные за регуляцию обмена веществ и энергии в организме, содержат КБ и nNOS. В свою очередь, ВМЯ и ДМЯ являются гетерогенными по своему нейрохимическому составу.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00039).

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: П. М. М.

Сбор и обработка материала: К. Ю. М.

Статистическая обработка данных: А. И. Е.

Анализ и интерпретация данных: А. И. Е.

Написание текста: П. М. М.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Maslyukov P. M., Nozdrachev A. D., Emanuilov A. I. Возрастные особенности экспрессии кальций-связывающих белков в нейронах ганглиев автономной нервной системы // Успехи геронтол. 2016. Т. 29, № 2. С. 247–253 [Maslyukov P. M., Nozdrachev A. D., Emanuilov A. I. Age-related expression of calcium-binding proteins in autonomic ganglionic neurons // Uspekhi gerontologii. 2016. Vol. 29, № 2. P. 247–253. In Russ.].
- Bradley S. A., Steinert J. R. Nitric Oxide-Mediated Posttranslational Modifications: Impacts at the Synapse // Oxid. Med. Cell Longev. 2016. ID 5681036. doi: 10.1155/2016/5681036
- Carmo-Silva S., Cavadas C. Hypothalamic Dysfunction in Obesity and Metabolic Disorders // Adv. Neurobiol. 2017. Vol. 19. P. 73–116. doi: 10.1007/978-3-319-63260-5_4
- Chachlaki K., Garthwaite J., Prevot V. The gentle art of saying NO: how nitric oxide gets things done in the hypothalamus // Nat. Rev. Endocrinol. 2017. Vol. 13, № 9. P. 521–535. doi: 10.1038/nrendo.2017.69
- Cossenza M., Socodato R., Portugal C. C., Domith I. C., Gladulich L. F., Encarnação T. G., Calaza K. C., Mendonça H. R., Campello-Costa P., Paes-de-Carvalho R. Nitric oxide in the nervous system: biochemical, developmental, and neurobiological aspects // Vitam. Horm. 2014. Vol. 96. P. 79–125. doi: 10.1016/B978-0-12-800254-4.00005-2
- Foo K. S., Hellysaz A., Broberger C. Expression and colocalization patterns of calbindin-D28k, calretinin and parvalbumin in the rat hypothalamic arcuate nucleus // J. Chem. Neuroanat. 2014. Vol. 61–62. P. 20–32. doi: 10.1016/j.jchemneu.2014.06.008
- Heizmann C. W. Ca²⁺-Binding Proteins of the EF-Hand Superfamily: Diagnostic and Prognostic Biomarkers and Novel Therapeutic Targets // Methods Mol. Biol. 2019. Vol. 1929. P. 157–186.
- Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 7th Edition. New York: Academic Press, 2013. 472 p.
- Schwaller B. The regulation of a cell's Ca (2+) signaling toolkit: the Ca (2+) homeostasome // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. Vol. 740. P. 1–25.
- Smith J. K. Exercise, Obesity and CNS Control of Metabolic Homeostasis: A Review // Front. Physiol. 2018. Vol. 9. P. 574. doi: 10.3389/fphys.2018.00574

Поступила в редакцию 11.04.2019
Получена после доработки 02.05.2019

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE NEURONS OF RAT VENTROMEDIAL AND DORSOMEDIAL HYPOTHALAMIC NUCLEUS

K. Yu. Moiseev¹, A. I. Emanuilov², P. M. Maslyukov¹

Objective — to identify the localization, percentage and morphometric characteristics of neurons immunoreactive (IR) to neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and calbindin (CB) in the ventromedial (VMH) and dorsomedial (DMH) rat hypothalamic nuclei.

Material and methods. The work was performed on female Wistar rats aged 3–4 months using immunohistochemical methods.

Results. nNOS-IR and CB-IR neurons were detected in the VMH and DMH. VMH and DMH had heterogeneous neurochemical composition. The largest percentage of intensely fluorescent CB-IR neurons was demonstrated in DMH in the ventral region of the nucleus, while in the VMH CB-IR neurons with weak fluorescence were detected in large numbers in the ventrolateral region. In all areas of DMH and VMH, nNOS-IR neurons with low fluorescence intensity were demonstrated. The average cross-sectional area of CB-IR and nNOS-IR cells in the VMH and DMH was not significantly different from immunonegative neurons.

Conclusions. The neurons of the VMH and DMH hypothalamic nuclei, which are involved in the regulation of metabolism in the body, contain nNOS and CB. In turn, VMH and DMH have heterogeneous neurochemical composition.

Key words: *hypothalamus, ventromedial nucleus, dorsomedial nucleus, neuronal nitric oxide synthase, calbindin*

¹ Department of Normal Physiology, ² Department of Human Anatomy, Yaroslavl' State Medical University, 5 Revolutionsnaya St., Yaroslavl' 150000