

© Коллектив авторов, 2019
УДК 611.814.1.018:612.67:599.323.4

*В. В. Порсева*¹, *М. Б. Корзина*², *А. А. Спиричев*², *П. А. Вишнякова*²,
*Д. А. Аряева*², *А. Д. Ноздрачев*³, *П. М. Маслюков*²

ИЗМЕНЕНИЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НЕЙРОНОВ НЕКОТОРЫХ ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА ПРИ СТАРЕНИИ

¹ Кафедра патологической физиологии (зав. — проф. В. П. Михайлов); ² кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. П. М. Маслюков), ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России; ³ кафедра общей физиологии (зав. — проф. А. Г. Марков), ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Цель исследования — выявление изменений иммуногистохимических характеристик нейронов дугообразного (ДЯ), вентромедиального (ВМЯ) и дорсомедиального (ДМЯ) ядер гипоталамуса у крыс при старении.

Материал и методы. Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар в возрасте 3–4 мес (5 особей) и 12–18 мес (5 особей) с использованием иммуногистохимических методов.

Результаты. При старении в ДМЯ относительное содержание кальбиндин-иммунопозитивных нейронов уменьшается, а кальретицин-иммунопозитивных нейронов в ДМЯ и ВМЯ увеличивается. У старых животных количество нейронов, иммунопозитивных к нейрональной синтазе оксида азота, и степень иммунофлуоресценции к ней увеличивались во всех исследуемых ядрах. У старых крыс наблюдается увеличение плотности нейропептид Y-иммунопозитивных волокон в ВМЯ и снижение в ДМЯ.

Выводы. При старении нейрхимический состав нейронов изменяется преимущественно в области вентромедиального и дорсомедиального ядер гипоталамуса.

Ключевые слова: гипоталамус, вентромедиальное ядро, дорсомедиальное ядро, нейроны, старение, иммуногистохимия

Введение. Гипоталамус — филогенетически старый отдел промежуточного мозга, который играет важную роль в поддержании постоянства внутренней среды и обеспечении интеграции функций автономной, эндокринной, соматической систем. Есть предположение об участии гипоталамуса в механизмах старения, при этом важная роль отводится вентромедиальному (ВМЯ) и дорсомедиальному (ДМЯ) ядрам гипоталамуса [12, 14]. ВМЯ и ДМЯ участвуют в регуляции трофики и поддержании энергетического гомеостаза, а также в контроле периферических циркадианных ритмов [11]. К числу важнейших ядер промежуточной гипоталамической области, участвующих в поддержании гомеостаза, относятся и дугообразное ядро (ДЯ) [12].

В процессе возрастного развития изменяются цитохимические характеристики нейронов центральной и периферической нервной системы. В частности, происходят изменения содержания кальций-связывающих белков кальбиндина (КБ) и кальретицина (КР), нейропептидов, в том числе

нейропептида Y (НПУ), а также синтазы оксида азота (nNOS) [1, 8]. При старении происходят изменения экспрессии различных гипоталамических нейротрансмиттеров и гормонов [7]. Имеются сравнительно мало данных относительно нейрхимических особенностей гипоталамических нейронов при старении.

Цель исследования — выявление изменений иммуногистохимических характеристик нейронов дугообразного, вентромедиального и дорсомедиального ядер гипоталамуса у крыс при старении.

Материал и методы. Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар в возрасте 3–4 мес и 24–30 мес (по 5 животных в каждой группе). 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 внутрибрюшинно) животных перфузировали транскардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS, 0,01M, pH 7,4) (Биолот, Россия), затем 4 % раствором параформальдегида

Сведения об авторах:

Порсева Валентина Вячеславовна, кафедра патологической физиологии; *Корзина Марина Борисовна*, *Спиричев Андрей Андреевич*, *Вишнякова Полина Александровна*, *Аряева Дарья Андреевна*, *Маслюков Петр Михайлович* (e-mail: mprm@ysmu.ru), кафедра нормальной физиологии с биофизикой, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

Ноздрачев Александр Данилович (e-mail: a.d.nozdrachev@mail.ru), кафедра общей физиологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

(Sigma, США) на PBS. После перфузии головной мозг извлекали и иссекали участок гипоталамуса, содержащий ДЯ, ВМЯ и ДМЯ согласно координатам атласа мозга крыс [10], после чего помещали 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 pNOS, использовали первичные антитела козы (Abcam, США) в разведении 1:300. Для идентификации КБ, КР и НПУ применяли антитела кролика (Abcam, США) в разведении 1:500, 1:100 и 1:500 соответственно. Вторичные антитела осла против козы или кролика были конъюгированы с флюорохромом флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC, Jackson Immunoresearch, США) в разведении 1:100, дающим зеленую флюоресценцию. Негативный контроль проводили с отсутствием первичных или вторичных антител. Для расчета доли иммунопозитивных нейронов производили мечение всей нейронной популяции красителем Neuro Trace Red, (Molecular Probes, США) в разведении 1:500, который является селективным красителем вещества Ниссля 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 относительного содержания иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали программу 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, срез которых 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 сред-

них величин определяли по методикам ANOVA, критериям Вилкоксона и Манна—Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Результаты показали, что КБ, КР, pNOS и НПУ выявляются у молодых и старых животных, однако иммунореактивность к вышеуказанным маркерам различается у молодых и старых крыс.

Кальбиндин-иммунопозитивные (КБ-ИП) нейроны обладали интенсивной флюоресценцией в ДЯ и ДМЯ (рис. 1, таблица).

Интенсивность иммунофлюоресценции к КБ у нейронов в ВМЯ была ниже ($p < 0,001$). В ДЯ и ВМЯ не наблюдалось различий по процентному содержанию КБ-ИП-нейронов между молодыми и старыми крысами (рис. 2).

В ДМЯ процентное содержание КБ-ИП-нейронов уменьшалось у старых животных ($p < 0,001$). Интенсивность иммунофлюоресценции КБ-ИП-нейронов во всех трех ядрах при старении не менялась (см. таблицу).

Кальретинин (КР) не обнаруживался в ДЯ в обеих группах. Интенсивно флюоресцентные КР-ИП-нейроны выявлялись в ДМЯ и ВМЯ. При старении в ДМЯ и ВМЯ относительное содержание КР-ИП-нейронов значимо увеличивалось (см. рис. 2). Степень иммунофлюоресценции КР-ИП-нейронов в ДМЯ и ВМЯ при старении не изменялась (см. таблицу). У молодых животных pNOS не определялась в ДЯ, а в ДМЯ и ВМЯ выявлялись pNOS-ИП-нейроны со слабой иммунофлюоресценцией. Содержание pNOS-ИП у 3-месячных крыс в ДМЯ составляло $41 \pm 3,2\%$, в ВМЯ — $58 \pm 7,4\%$. У старых животных количество pNOS-ИП-нейронов и степень иммунофлюоресценции к pNOS увеличивались во всех исследуемых ядрах. При этом у старых крыс появлялись в большом количестве pNOS-ИП-нейроны в ДЯ ($86 \pm 4,5\%$), в ДМЯ и ВМЯ все нейроны (100%) приобретали ИП к pNOS.

Интенсивно флюоресцирующие НПУ-ИП-волокна выявлялись в ДЯ у молодых и старых крыс, при этом степени иммунофлюоресценции ($77 \pm 5,1$ и $71 \pm 3,9$ соответственно) ИП-волокон между возрастными группами были одинаковы. У молодых крыс выявлялась плотная сеть интенсивно флюоресцирующих НПУ-ИП-волокон в ДМЯ ($47 \pm 2,3$), в ВМЯ степень флюоресценции НПУ-ИП-волокон была существенно меньше ($15 \pm 0,9$). При старении наблюдались обратные изменения распределения НПУ-ИП-волокон в ДМЯ и ВМЯ. У старых крыс иммунофлюоресценция к НПУ значительно увеличивалась в ВМЯ ($61 \pm 3,7$) и существенно снижалась в ДМЯ ($23 \pm 1,8$).

Интенсивность иммунофлюоресценции нейронов, иммунопозитивных к кальбиндину (КБ), кальретинину (КР) и нейрональной синтазе оксида азота (pNOS), в вентромедиальном (ВМЯ), дорсомедиальном (ДМЯ) и дугообразном (ДЯ) ядрах гипоталамуса крыс

Иммуно-мечение	Возраст, мес	ДЯ	ДМЯ	ВМЯ
КБ	3–4	$47 \pm 2,8$	$43 \pm 1,3$	$18 \pm 1,2^{**}$
	24–30	$49 \pm 2,3$	$38 \pm 1,4$	$16 \pm 1,5^{**}$
КР	3–4	–	$39 \pm 2,4$	$40 \pm 2,1$
	24–30	–	$37 \pm 2,8$	$38 \pm 1,6$
pNOS	3–4	–	$18 \pm 1,4$	$18 \pm 1,4$
	24–30	$27 \pm 2,1$	$34 \pm 2,4^*$	$38 \pm 2,5^*$

* Различия значимы по сравнению с молодыми животными при $p < 0,001$; ** различия значимы по сравнению с ДЯ и ДМЯ при $p < 0,001$.

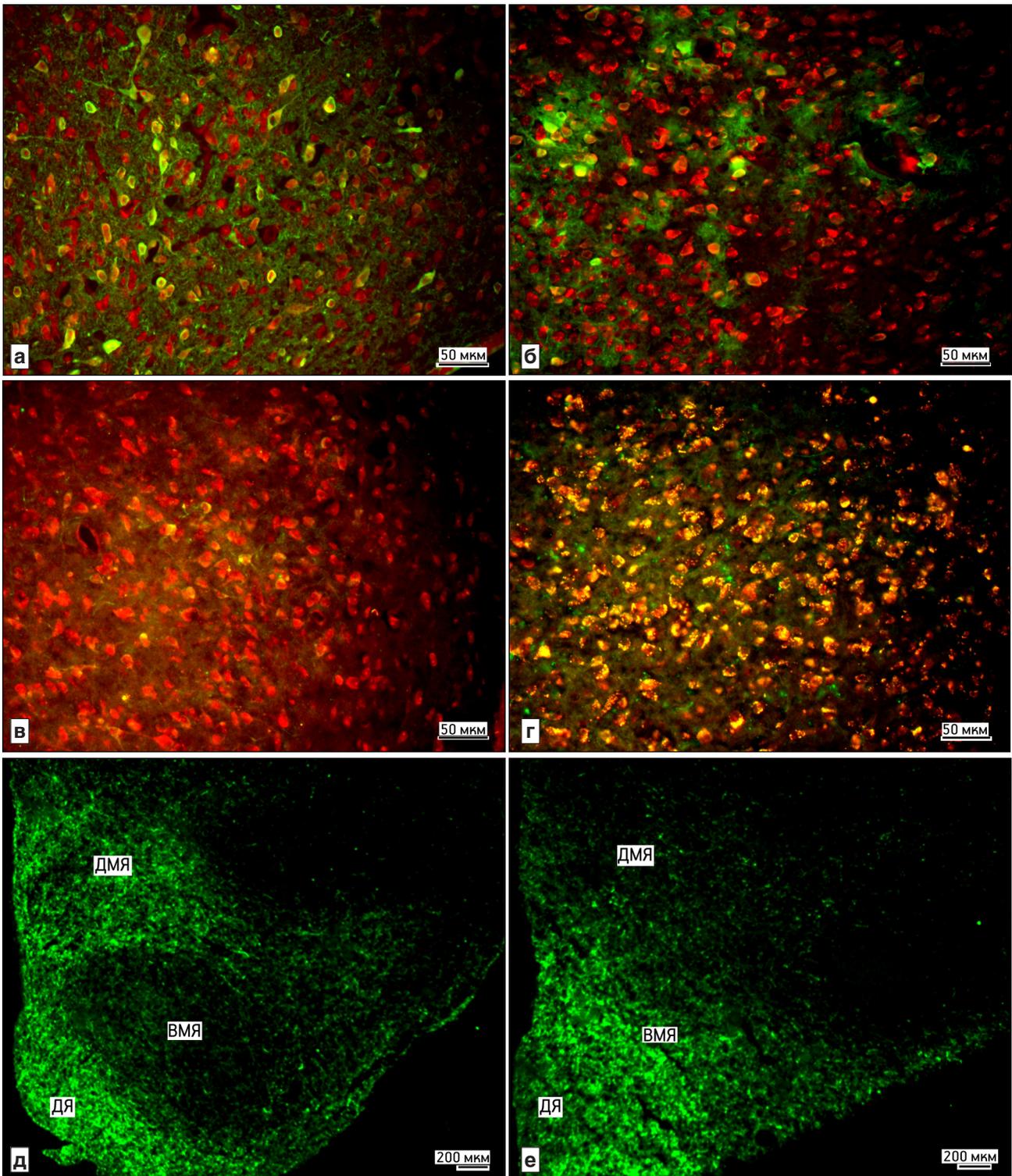


Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция к кальбиндину (а, б), нейрональной синтазе оксида азота (в, г), нейропептиду Y в дорсомедиальном ядре (а–г) и группе ядер гипоталамуса (д, е) молодых (а, в, д) и старых крыс (б, г, е).

Двойное флюоресцентное иммуномечение: кальбиндин, нейрональная синтаза оксида азота, нейропептид Y (зеленый, FITC) и Neuro Trace Red (красный). ВМЯ — вентромедиальное ядро; ДМЯ — дорсомедиальное ядро; ДЯ — дугообразное ядро

Средняя площадь сечения ИП-нейронов в ДЯ, ДМЯ и ВМЯ варьировала от $119 \pm 9,6$ до $137 \pm 8,2$ μm^2 у крыс обеих групп. Нейроны различных ядер, ИП к различным маркерам, не отличались по этому показателю.

Обсуждение полученных данных. К одной из наиболее известных и глубоко разработанных концепций в геронтологии следует отнести элевационную теорию старения, придающую ключевое значение возрастному повышению

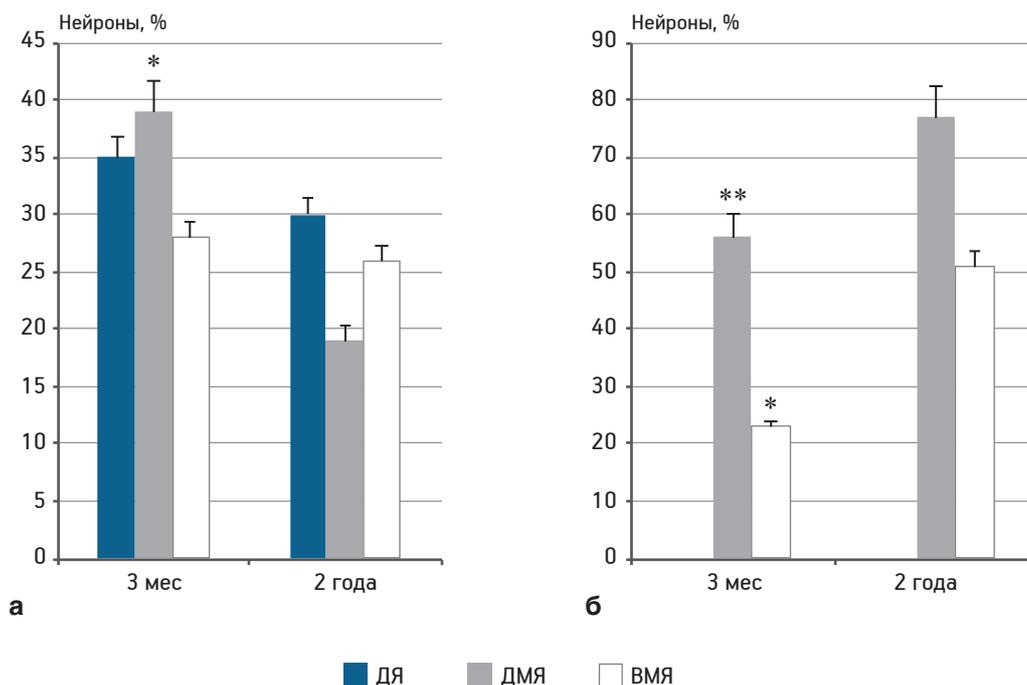


Рис. 2. Процентное содержание нейронов, иммунопозитивных к кальбиндину (а) и кальретинину (б) в вентромедиальном (ВМЯ), дорсомедиальном (ДМЯ) и дугообразном (ДЯ) ядрах.

* Различия значимы при $p < 0.001$, ** при $p < 0.01$ по сравнению со старыми крысами

порога чувствительности гипоталамуса к гомеостатическим сигналам [6]. ВМЯ и ДМЯ гипоталамуса, ответственные за регуляцию обмена веществ и энергии в организме, предположительно играют важную роль и в процессах старения [4].

Среди факторов, регулирующих развитие синапсов и их пластичность, большое значение имеет поддержание определенной концентрации ионов кальция. КБ и КР играют роль кальциевых сенсоров и участвуют в поддержании уровня кальция в клетках [13]. В литературе имеются данные о возрастном снижении экспрессии КБ и КР в коре больших полушарий у грызунов, что делает клетки более чувствительными к изменениям концентрации ионов кальция [2]. Избыточный кальциевый ток, направленный внутрь нейронов, своеобразная перегрузка нейронов кальцием в настоящее время рассматриваются как важные механизмы старения мозга, в частности, дегенерации нейронов и развития возраст-зависимой патологии [9].

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]. Данные настоящего исследования свидетельствуют, что при старении иммунофлюоресценция к nNOS увеличивалась в ДЯ, ДМЯ и ВМЯ, что соответствует ранее

полученным данным о возрастании экспрессии nNOS в преоптической области, супраоптическом и паравентрикулярном ядрах, а также в ДЯ у старых крыс [6].

Согласно литературным данным, в ДЯ с возрастом снижается содержание проопиомеланокортина и НПУ [7]. Мы обнаружили, что при старении наблюдается увеличение плотности НПУ-ИП-волокон в ВМЯ и снижение в ДМЯ.

Заключение. Таким образом, при старении изменяется нейрохимический состав исследованных ядер гипоталамуса. При этом уменьшается процент КБ-ИП-, увеличивается доля КР-ИП- и nNOS-ИП-нейронов, изменяется плотность НПУ-содержащих волокон в ВМЯ и ДМЯ.

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: А. А. С., П. А. В., Д. А. А.

Статистическая обработка данных: М. Б. К.

Анализ и интерпретация данных: В. В. П, А. Д. Н.

Написание текста: П. М. М.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д., Емануйлов А.И. Возрастные особенности экспрессии кальций-связывающих белков в нейронах ганглиев автономной нервной системы //

- Успехи геронтол. 2016. Т. 29, № 2. С. 247–253 [Masliukov 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.].
2. Ahn J.H., Hong S., Park J.H., Kim I.H., Cho J.H., Lee T.K., Lee J.C., Chen B.H., Shin B.N., Bae E.J., Jeon Y.H., Kim Y.M., Won M.H., Choi S.Y. Immunoreactivities of calbindin-D28k, calretinin and parvalbumin in the somatosensory cortex of rodents during normal aging // *Mol. Med. Rep.* 2017. Vol. 16 (5). P. 7191–7198. doi: 10.3892/mmr.2017.7573
 3. 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
 4. Dacks P.A., Moreno C.L., Kim E.S., Marcellino B.K., Mobbs C.V. Role of the hypothalamus in mediating protective effects of dietary restriction during aging // *Front. Neuroendocrinol.* 2013. Vol. 34, № 2. P. 95–106. doi: 10.1016/j.yfrne.2012.12.001
 5. Dilman V.M., Anisimov V.N. Hypothalamic mechanisms of ageing and of specific age pathology — I. Sensitivity threshold of hypothalamo-pituitary complex to homeostatic stimuli in the reproductive system // *Exp. Gerontol.* 1979. Vol. 14. P. 161–174.
 6. Ferrini M., Wang C., Swerdloff R.S., Sinha Hikim A.P., Rajfer J., Gonzalez-Cadavid N.F. Aging-related increased expression of inducible nitric oxide synthase and cytotoxicity markers in rat hypothalamic regions associated with male reproductive function // *Neuroendocrinology*. 2001. Vol. 74, № 1. P. 1–11.
 7. Kim K., Choe H.K. Role of hypothalamus in aging and its underlying cellular mechanisms // *Mech. Ageing Dev.* 2019. Vol. 177. P. 74–79. doi: 10.1016/j.mad.2018.04.008
 8. Masliukov P.M., Emanuilov A.I., Moiseev K., Nozdrachev A.D., Dobrotvorskaya S., Timmermans J.P. Development of non-catecholaminergic sympathetic neurons in para- and prevertebral ganglia of cats // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2015. Vol. 40. P. 76–84.
 9. Mattson M.P. Calcium and neurodegeneration // *Aging Cell.* 2007. Vol. 6, № 3. P. 337–350.
 10. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 7th Edition. Elsevier: Academic Press, 2013. 472 p.
 11. Satoh A., Imai S.I., Guarente L. The brain, sirtuins, and ageing // *Nat. Rev. Neurosci.* 2017. Vol. 18, № 6. P. 362–374. doi: 10.1038/nrn.2017.42
 12. Seoane-Collazo P., Fernø J., Gonzalez F., Diéguez C., Leis R., Nogueiras R., López M. Hypothalamic-autonomic

control of energy homeostasis // *Endocrine*. 2015. Vol. 50, № 2. P. 276–291. doi: 10.1007/s12020-015-0658-y

13. 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.
14. Zhang Y., Kim M.S., Jia B., Yan J., Zuniga-Hertz J.P., Han C., Cai D. Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs // *Nature*. 2017. Vol. 548, № 7665. P. 52–57. doi: 10.1038/nature23282

Поступила в редакцию 16.04.2019

Получена после доработки 04.06.2019

CHANGES OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF NEURONS OF THE MIDDLE GROUP OF THE HYPOTHALAMIC NUCLEI DURING AGING

V. V. Porseva¹, M. B. Korzina², A. A. Spirichev², P. A. Vyshnyakova², D. A. Aryaeva², A. D. Nozdrachev³, P. M. Masliukov²

The aim of the study — to identify differences in the immunohistochemical characteristics of the neurons of the arcuate (ARC), ventromedial (VMH) and dorsomedial (DMH) hypothalamus between young and old rats.

Material and methods. The work was performed on male Wistar rats aged 3–4 months and 2–2,5 years using immunohistochemical methods.

Results. In DMH, the percentage of calbindin (CB)-immunoreactive (IR) of neurons is significantly reduced, and the percentage of calretinin (CR)-IR of neurons increases in DMH and VMH during aging. In old animals, the number of neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-IR neurons and the degree of immunofluorescence to nNOS increased in all studied nuclei. In old rats, there is an increase in the density of neuropeptide Y-IR fibers in the VMH and a decrease in the DMH.

Conclusions. The neurochemical composition of the nuclei of the middle group (mainly DMH and VMH) of the hypothalamus changes during aging.

Key words: *hypothalamus, middle group of nuclei, aging, immunohistochemistry*

¹ Department of Pathophysiology, ² Department of Normal Physiology, Yaroslavl' State Medical University, 5 Revolutsionnaya St., Yaroslavl', 150000; ³ Department of General Physiology, St. Petersburg State University, 7–9 University Emb., St. Petersburg, 199034