

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© С. М. Зиматкин, А. В. Заерко, 2019
УДК 578.6:611.018.8

С. М. Зиматкин, А. В. Заерко

МЕТОДИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ГИПОТАЛАМУСА

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — д-р биол. наук проф. С. М. Зиматкин),
УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Беларусь

Цель — разработка иммуногистохимической методики выявления гистаминергических нейронов в гипоталамусе крыс.

Материал и методы. Исследование выполнено на образцах гипоталамуса 10 беспородных белых крыс-самцов в возрасте 45 и 90 сут. Для избирательного выявления гистаминергических нейронов на парафиновых срезах гипоталамуса проведена иммуногистохимическая реакция на антитела к моноаминоксидазе типа Б.

Результаты. Описана методика избирательного выявления гистаминергических нейронов гипоталамуса на парафиновых срезах гипоталамуса с помощью иммуногистохимической реакции на антитела к моноаминоксидазе типа Б.

Выводы. Методика позволяет выявлять гистаминергические нейроны в парафиновых срезах гипоталамуса.

Ключевые слова: гистаминергические нейроны, гипоталамус, головной мозг крысы, моноаминоксидаза Б

Гистаминергическая система мозга играет важную роль в регуляции функций нейроэндокринной и сердечно-сосудистой систем организма, процессов сна и бодрствования, терморегуляции, гомеостаза, пищевого и питьевого поведения, памяти и обучения, а также в патогенезе таких заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, эпилепсия, морфиновая наркомания, алкоголизм и др. [1, 2, 8]. Гистаминергическая система мозга состоит из нейронов, синтезирующих, транспортирующих и выделяющих гистамин, и гистаминовых рецепторов, на которые он воздействует. Тела гистаминергических нейронов (Гн) головного мозга млекопитающих локализируются только в задней гипоталамической области, где образуют пять скоплений — ядер (E1–E5) [3]. При этом аксоны гистаминергических нейронов распространяются во все отделы мозга [2].

Для морфофункционального исследования Гн применяются две иммуногистохимические методики: с использованием антител против гистамина [10] и фермента его синтеза гистидиндекарбоксилазы [11, 12]. Нами было предложено использовать в качестве маркера для выявления Гн активность моноаминоксидазы типа Б (МАО Б), которая является ключевым ферментом метаболизма гистамина в мозгу. Известно, что метаболизм является единственным способом удаления гистамина после завершения нейротрансмиссии Гн, поскольку система обратного захвата гистамина в них отсутствует, в отличие от других типов

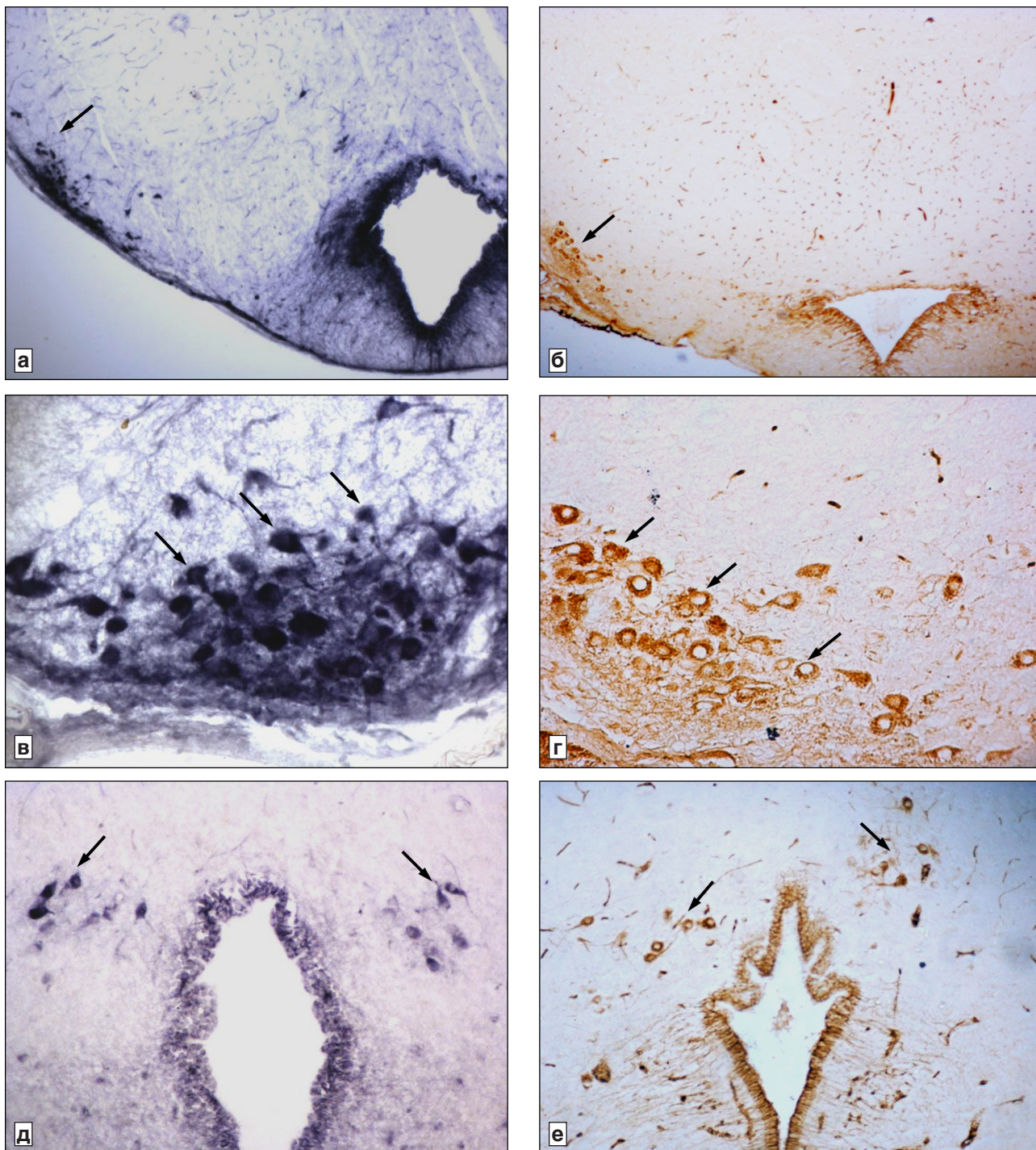
аминергических нейронов, имеющих специфические транспортёры своих медиаторов для их обратного захвата [7, 9]. Используя разработанную нами гистохимическую методику избирательного определения в мозгу активности МАО Б [4], мы установили, что все Гн гипоталамуса, в отличие от других типов нейронов, имеют высокую активность МАО Б. Другие типы нейронов гипоталамуса МАО Б не содержат. Следовательно, определяя гистохимически в криостатных срезах гипоталамуса активность МАО Б, можно избирательно выявлять гистаминергические нейроны мозга [5, 6]. Недостатками этой методики являются: 1) необходимость заморозки образцов, что часто сопровождается их повреждением; 2) необходимость хранения образцов в жидком азоте, что ограничивает его срок; 3) невозможность использования методики для парафиновых срезов мозга, которые более широко используются в гистологических исследованиях мозга, чем криостатные срезы.

Целью настоящего исследования была разработка иммуногистохимической методики выявления гистаминергических нейронов в парафиновых срезах гипоталамуса крыс.

Материал и методы. Исследование проведено на 10 беспородных белых крысах-самцах в возрасте 45 и 90 сут. Все опыты выполнены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 30.01.2018 г.). Образцы

Сведения об авторах:

Зиматкин Сергей Михайлович (e-mail: smzimatkin@mail.ru), Заерко Анастасия Викторовна, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, УО «Гродненский государственный медицинский университет», 230009, Беларусь, г. Гродно, ул. Горького, 80



Гистаминергические нейроны в ядре E2 (а–г) и E4 (д–е) гипоталамуса крысы (стрелки).

а, в, д — гистохимический метод выявления активности MAO Б; б, г, е — иммуногистохимический метод выявления белка MAO Б. Цифровая микрофотография. Ув.: а, б — 40; в, г — 200; д, е — 100

гипоталамуса замораживали в жидком азоте с помощью криостата CM 1850 (Leica Microsystems GmbH, Германия), готовили серийные криостатные срезы толщиной 10 мкм, которые обрабатывали гистохимически на выявление активности MAO Б [4–6]. Этот метод выявления Гн был взят в качестве прототипа. Другие кусочки гипоталамуса фиксировали в цинк-этанол-формалине при +4 °С (на ночь), а затем заключали в парафин. С помощью микротомы (LeicaRM 2125 RTS, Германия) изготавливали серийные парафиновые срезы толщиной 5 мкм и монтировали их на предметные

стекла. Срезы инкубировали с 3 % H_2O_2 в течение 10 мин для устранения эндогенной активности пероксидазы. Затем промывали в фосфатном буферно-солевом растворе (PBS), pH 7,4, по 2 мин×3. Наносили нормальную козью сыворотку для блокировки неспецифического окрашивания (на 30 мин при 37 °С). Промывали в PBS, pH 7,4, по 2 мин×3. Затем срезы обрабатывали первичными поликлональными кроличьими антителами против MAO Б (Elabscience, cat.No.EPP15673 (Китай) в разведении 1:100 при +4 °С, 20 ч, во влажной камере. Промывали в PBS, pH 7,4, 2 мин×3. Связавшиеся

первичные антитела выявляли с помощью набора детекции (Elabscience cat.No. E-IR-R213 (Китай), нанося поочередно при комнатной температуре Reagent 1: Polymer Helper (20 мин), Reagent 2: Polyperoxidase-anti-mouse/rabbit IgG (25 мин) и промывали в PBS, pH 7,4, 2 мин×3. Затем добавляли 50 мкл DAB Chromogen в 1 мл DAB Substrate, перемешивали и наносили на срез. Инкубировали 1 мин 20 с. Реакцию прекращали промыванием срезов в PBS, pH 7,4, с последующим обезвоживанием в спиртах возрастающей концентрации, просветлением в ксилоле и заключением в полистирол.

Результаты исследования. В полученных иммуногистохимических препаратах гипоталамуса избирательно и четко выявлялись Гн (рисунок).

Высокая иммунореактивность МАО Б выявлялась в их цитоплазме, умеренная — в их отростках (нейропиле), а в ядрах нейронов она отсутствовала. Их локализация точно соответствовала Гн, определяемым в криостатных срезах гипоталамуса с помощью гистохимической методики выявления активности МАО Б. Нейроны другой медиаторной природы этой методикой в гипоталамусе не выявлялись. При этом высокую активность и иммунореактивность МАО Б определяли в эпиндимокцитах, выстилающих желудочки мозга, умеренную — в эндотелии кровеносных капилляров мозга. Однако их окраска не мешала выявлению самих Гн в гипоталамусе. В других отделах мозга МАО Б определялась в разных типах нейронов, особенно в серотонинергических нейронах ядер шва моста, в которых МАО Б участвует в метаболизме серотонина. Однако в гипоталамусе МАО Б выявлялась только в Гн. Поскольку тела Гн мозга расположены только в гипоталамусе, это позволяет использовать методику для избирательного выявления этих нейронов в этом отделе промежуточного мозга.

Обсуждение полученных данных. Преимуществами предлагаемой иммуногистохимической методики выявления Гн по сравнению с гистохимическим методом на выявление активности МАО Б в криостатных срезах является: 1) более чёткое выявление нейронов (вероятно, из-за использования более тонких срезов и меньшей диффузии продуктов реакции из-за фиксации); 2) возможность использования материала через длительное время после его забора, так как он может храниться неограниченное время в парафиновых блоках; 3) возможность сравнения полученных препаратов с препаратами, окрашенными по Нисслю или при помощи других общепринятых нейрогистологических методик, а также и другими иммуногистохимическими методиками на соседних срезах или при двойном иммуноочечении в тех же нейронах. Вместе с тем, следует

отметить, что предлагаемая методика позволяет выявлять в гипоталамусе не только Гн, но и танициты и кровеносные капилляры, а в других отделах мозга — и нейроны другой нейромедиаторной природы.

Таким образом, предлагаемая иммуногистохимическая методика с учётом указанных ограничений позволяет выявлять гистаминергические нейроны в парафиновых срезах гипоталамуса крысы.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: С. М. З.

Сбор и обработка материала: А. В. З.

Статистическая обработка данных: А. В. З.

Анализ и интерпретация данных: С. М. З., А. В. З.

Написание текста: С. М. З., А. В. З.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анищик О.В., Зиматкин С.М. Центральная гистаминергическая система в норме и при некоторых патологических состояниях // Вести НАН Беларуси. Сер. мед. биол. наук. 2002. № 2. С. 94–102 [Anishchik O.V., Zimatkin S.M. Central histaminergic system in normal and in certain pathological conditions // Vesti NAN Belarusi. Ser. med. biol. nauk. 2002. № 2. P. 94–102. In Russ.].
2. Зиматкин С.М. Гистаминергические нейроны мозга. Минск: Новое знание, 2015. 319 с. [Zimatkin S.M. Histaminergic brain neurons. Minsk: Novoe znanie, 2015. 319 p. In Russ.].
3. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Стрик О.Н. Пространственная организация и морфометрическая характеристика гистаминергических нейронов мозга крысы // Морфология. 2005. Вып. 2. С. 27–30 [Zimatkin S.M., Kuznetsova V.B., Strik O.N. Spatial organization and morphometric characteristics of histaminergic neurons in the rat brain // Morfologiya. 2005. № 2. P. 27–30. In Russ.].
4. Зиматкин С.М., Цыдик В.Ф. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозгу // Морфология. 1994. № 4–6. С. 157–161 [Zimatkin S.M., Cydik V.F. A histochemical method for studying the activity of monoamine oxidase A and B in the brain // Morfologiya. 1994. № 4–6. P. 157–161. In Russ.].
5. Кузнецова В.Б., Лис Р.Е., Зиматкин С.М. Активность моноаминоксидазы В и дегидрогеназ в нейронах гистаминергических ядер мозга крысы // Журн. Гроднен. гос. мед. ун-та. 2004. Вып. 3. С. 18–21 [Kuznetsova V.B., Lis R.E., Zimatkin S.M. The activity of monoamine oxidase B and dehydrogenases in the neurons of histaminergic rat brain nuclei // Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2004. № 3. P. 18–21. In Russ.].
6. Способ выявления гистаминергических нейронов мозга: патент BY 9178 / С.М.Зиматкин, В.Б.Кузнецова. Опубл. 30.09. 2005 [The method of detecting histaminergic neurons in the brain: patent BY 9178 / S.M.Zimatkin, V.B.Kuznetsova. Publ. 30.09. 2005. In Russ.].
7. Brown R.E., Stevens D.R., Haas H.L. The physiology of brain histamine // Prog. Neurobiol. 2001. Vol. 63, № 6. P. 637–672.

8. Panula P., Nuutinen S. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. Vol. 14, № 7. P. 472–487. doi: 10.1038/nrn3526
9. Haas H., Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system // *Nat. Rev. Neurosci.* 2003. Vol. 4, № 2. P. 121–130. doi: 10.1038/nrn1034
10. Panula P., Yang H.-Y.T., Costa E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1984. Vol. 81, № 8. P. 2572–2576.
11. Watanabe T., Taguchi Y., Hayashi H., Tanaka J., Shiosaka S., Tohyama M., Kubota H., Terano Y., Wada H. Evidence for the presence of a histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis // *Neurosci. Lett.* 1983. Vol. 39, № 3. P. 249–254.
12. Watanabe T., Taguchi Y., Shiosaka S., Tanaka J., Tohyama M., Wada H., Kubota H., Terano Y. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker // *Brain Res.* 1984. Vol. 295, № 1. P. 13–25.

Поступила в редакцию 07.03.2019

Получена после доработки 10.05.2019

METHOD FOR VISUALIZATION OF BRAIN HISTAMINERGIC NEURONS IN HYPOTHALAMUS

S. M. Zimatkin, A. V. Zaerko

Objective — the development of immunohistochemical method for visualization of brain histaminergic neurons in the rat hypothalamus.

Material and methods. The study was carried out on the samples of hypothalamus of 10 outbred albino male rats aged 45–90 days. For the selective detection of histaminergic neurons on paraffin sections of the hypothalamus, an immunohistochemical reaction was performed with anti-monoamine oxidase type B antibodies.

Results. The method was described for the selective detection of histaminergic neurons in the hypothalamus on the paraffin sections of hypothalamus by immunohistochemical reaction with anti-monoamine oxidase type B antibodies.

Conclusions. The method allows to visualize histaminergic neurons on paraffin sections of the hypothalamus.

Key words: *histaminergic neurons, hypothalamus, rat brain, monoamine oxidase B*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, 80 Gorky St., Grodno 230009, Belarus