

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ КАРДИОАКТИВНЫХ БЕЛОК-ГОРМОНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В МИКРОСТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

АБРАМЯН С. С., *ЧИЛАГ А., СРАПИОНЯН Р. М.,

**МЕСРОПЯН Н. Г., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии им. Г. Х. Буятыана АН Армении, Ереван

* I Институт анатомии Земмельвейского университета, Будапешт

** Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Локализация белка-носителя гипоталамического коронарорасширяющего гликопептида—нейрогормона Г (БНГ), изолированного и характеризованного ранее, была обнаружена в мозгу крыс по иммуноцитохимическому методу. В наших экспериментах обнаружены два типа иммуноокрашенных структур. К первому типу относятся глиальные элементы, вероятнее всего соответствующие астроцитам; бергмановская глия и клетки в перивентрикулярных органах. Меченые глиоциты широко распространены в мозгу, но клетки *Rugifolii cortex* окрашиваются сильнее, чем клетки других корковых отделов. Перивентрикулярная и супраоптическая части гипоталамуса содержат БНГ—иммунопозитивные клетки, которые, вероятнее всего, являются глиальными, но их характеристика пока нами не уточнена. Второй тип—это варикозные и извилистые отростки чисто нейронального характера часто связаны с телами мультиполярных клеток. Этот тип меченения ограничен двумя ядрами вентрального миндалевидного тела, кортикального ядра и ядра бокового обонятельного тракта. Иммуноокраска против БНГ не давала перекрестную реакцию с глиальным фибриллярным кислым белком (ГФКБ) и отчетливо отличалась от иммунометки, наблюдаемой с антисывороткой против предсердно-натрийуретического пептида (ПНП). Остается выяснить, представляют ли эти два типа иммуноокраски отдельные антигены.

Возможно, глиальный компонент указывает на роль этих клеток в захвате нейрогормона Г из (или в высвобождении в) общей циркуляции. Также обсуждается возможная связь между БНГ и другими кардиоактивными пептидами, обнаруженными ранее в миндалевидном теле (нейротензин, FMRF-amide—кардиоактивный пептид моллюска).

В 1964 г. в магнотеллюлярных ядрах гипоталамуса быка был обнаружен специфический белок, обладающий коронарорасширяющим

свойством [1]. В дальнейшем указанный белок был дифференцирован на три белка (гликопротеина), с аналогичным направлением действия [2—4]. Эти белки были не только носителями [5] ранее открытых Галояном коронарорасширяющих гипоталамических гликопептидов К, С и Г [6], но и предшественниками указанных соединений [7, 8].

По принципу родства с соответствующими нейrogормонами К, С и Г они были названы БНК, БНС и БНГ. Как было установлено, белки-носители являются N-гликозидносвязывающими, маннозобогатыми гликопротеинами с M_r от 20 до 39 кД [7]. В предыдущих работах [9, 10] удалось продемонстрировать радиоиммунологическим методом преимущественное их содержание в синантосомах (70%) и в нейросекреторных гранулах магноцеллюлярных ядер гипоталамуса (30%). Однако гистологическая локализация этих комплексов не установлена.

Учитывая вышесказанное, представлялось интересным проведение иммуногистохимических исследований для выяснения распределения одного из этих комплексов (БНГ) в различных микроструктурах мозга, что и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы

Выделение и очистка антигена. Из гипоталамуса крупного рогатого скота путем рефракционирования высаливанием сернокислым аммонием в пределах насыщения 0,3—0,4 выделяли кардиотропные водорастворимые белки. Смеси высоленных белков подвергали диализу против дистиллированной воды, затем против веронал-мединалового буфера, pH 7,8, и лиофилизировали. Дальнейшее фракционирование и очистку полученного лиофилизата проводили по общепринятой в нашей лаборатории схеме [6]: 1—гель-фильтрация на колонке (3×50 см) с сефадексом G-100, уравновешенным борно-боратным буфером (pH 8,0) со скоростью 50 мл/ч; 2—ИОХ на колонке (3×50 см) с ДЕАЕ-ц, уравновешенная 0,005 М фосфатным буфером (pH 6,5), с помощью градиентной элюции (0,02—0,5 М NaCl) со скоростью 40 мл/ч с небольшим понижением pH (6,5—5,0); 3—реохроматография на колонке (1,5×30 см) с ДЕАЕ-ц со скоростью 30 мл/ч.

Спектры поглощения снимали в УФ-области 280 нм на спектрофотометре «Unicum SP-800» и «СФ-26А».

Биологическую активность определяли измерением объемной скорости крови, оттекающей из коронарного синуса кошки за единицу времени под уретановым наркозом [11].

Получение антитела. Антисыворотку против БНГ получили по следующей схеме [12]: лиофилизированный БНГ (1 мг/0,2 мл буфера) смешивали до получения гомогенной эмульсии с 0,2 мл полного адьюванта Фрейнда и вводили равными порциями в область обоих подколенных лимфоузлов задних конечностей кроликов. Повторную иммунизацию проводили через месяц после первого ввода по

0,4 мл свежеприготовленной эмульсии (1 мг/мл буфера) в область левого подколенного лимфоузла и внутримышечно с правой стороны, а также 0,2 мл—в ушную вену. Отбор крови после иммунизации проводили из ушной вены на 7-, 9-, 11-й дни.

Специфичность антисыворотки проверяли иммунодиффузией, в результате которой иммунопреципитация против БНГ-антигена имела место при разбавлении 1:16, но при замещении БНГ-антигена БНК и БНС антигенами преципитацию не обнаружили. В очищенном БНГ-антигене по процедуре RIA [13] не возникала активность предсердно-натрийуретического фактора, основанного на определении 28 АА предсердно-натрийуретического пептида крыс (К. Racz, Земмельвейсский университет медицины, личное сообщение).

Иммуногистохимия. Взрослые крысы линии Альбино обоих полов умерщвлялись перфузией через левый желудочек сердца фиксатором Замбони (содержащий 4%-ный параформальдегид и 0,4%-ную пикриновую кислоту в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4), что следовало сразу же за промывкой физиологическим раствором. Мозги извлекались из черепа с последующей фиксацией в том же фиксаторе в течение ночи и промывали несколько раз 0,1 М фосфатным буфером. Изготовлены свободноплавающие 50—60 мкм срезы: фронтальные—из выбранных областей мозга на вибротоме и поперечные—из предсердий сердца на фригемате и криостате. Для иммуногистохимии был применен немеченый антитело-ферментный метод [14]. Фоновая пероксидазная активность подавлялась инкубацией срезов в 1%-ной перекиси водорода 5—10 мин. Неспецифическое связывание антител блокировалось 20%-ной нормальной козьей сывороткой. В различных экспериментах были использованы следующие первичные антитела: анти-БНГ (полученный по вышеописанному методу 1:1000 и 1:20000; анти-ГФКБ 1:1600; анти-вазопрессии (полученный по G. Traut, INSERM 156 Lille, любезно предоставленный доктором T. Wenger) 1:5000; антисыворотка против предсердно-натрийуретического фактора сердца крыс—ПНФ (Gutkowska et al. 1984, любезно предоставленная доктором K. Racz) 1:100). Инкубация срезов в первичных антителах длилась 48 ч. Контрольные срезы инкубировали в присутствии нормальной кроличьей сыворотки (1:1000 разбавление) без первичного антитела. В качестве вторичного антитела использовался козий анти-кроличий Ig („Human“ Serological Company, Венгрия, 1:30 разбавление) 1,5 ч, после чего срезы подвергались воздействию кроличьего пероксидаз-антипероксидазного комплекса (DAKOPATTS, 1:80 и 1:100) 1 ч и проявлялись 2,4-диаминобензидином („Sigma“ США.) в качестве хромогена (0,05%) в присутствии 0,03% H_2O_2 .

Результаты исследования

В наших экспериментах были обнаружены две формы иммуоокраски против БНГ. Первая форма соответствует общей окраске в астроцитах. При высоких титрах антисыворотки против БНГ выявля-

ются в основном глиальные клетки (астроциты) во всех исследованных областях мозга, включая кортикальные области (рис. 1), бергмановскую глию в мозжечке (рис. 2), перивентрикулярные органы (рис. 4) и гипоталамические области (рис. 5). Из кортикальных областей самая сильная окраска в rugiform cortex-e. При низкой концентрации антисыворотки БНГ-подобная иммунореактивность, вероятно, ограничивается глиальными клетками гипоталамической области, преимущественно в перивентрикулярной зоне и венотрамединальных областях (рис. 5), а глиальные волокна и несколько тел клеток всегда проявляют иммунореактивность также в супраоптическом ядре (рис. 7) и субфронтальном органе (рис. 4).

При преабсорбции БНГ-антисыворотки с БНГ-антигеном (100 мкг на мл антисыворотки) или при замещении БНГ-антисыворотки нормальной кроличьей сывороткой перикарион астроцитов не выявлялся.

Выявление и распределение астроцитов БНГ-антисывороткой имеет сходство с таковыми в присутствии антисыворотки глиального фибриллярного кислого белка, но, в отличие от БНГ-иммунореактивности окраска с ГФКБ не исчезала при преабсорбции антисыворотки к ГФКБ с БНГ-антигеном. Также интересно отметить, что в то время как обычно ГФКБ хорошо окрашивает радиально расположенные отростки бергмановской глии без какой-либо значительной окраски перикариона этих клеток, иммунпероксидазный конечный продукт окраски БНГ выявляется в основном в перикарионе бергмановской глии (рис. 2).

В соответствии с различиями между астроглиальными формами различных областей мы наблюдали перикапиллярные формы с типичными окончаниями (рис. 3), протоплазматические или волокнистые астроциты с хорошо развитой системой отростков (рис. 1). В супраоптическом ядре можно ясно различить маленькие БНГ-позитивные клетки, в ряде случаев наделенные длинными и прямыми отростками, которые едва заметны среди слабых контуров крупных неокрашенных, но вазопрессин-позитивных клеток (рис. 6, 7). В участках наиболее устойчивого БНГ-мечения (вентральные и перивентрикулярные гипоталамические области) размер и распределение иммунопозитивных клеток напоминает типичную астроглию. Однако точная характеристика этих клеток остается необъяснимой. Глиальные клетки, напоминающие астроциты, часто давали иммунометку с БНГ также в белом веществе.

БНГ-подобная иммунореактивность обнаруживалась также в тонких и извилистых волокнах с объемистой варикозностью и в нескольких маленьких полигональных или веретенообразных перикарионах (рис. 8, 9). Иногда мы наблюдали тела клеток в явном контакте с этими варикозными волокнами (рис. 9). Эта форма, чисто нейрональная, наблюдалась нами в ядре бокового обонятельного тракта (ОТ) и по краям кортикального амгдалоидного ядра (КАЯ). Подобно глиальному компоненту, этот тип иммуноокрашивания также исчезает при преабсорбции антисыворотки против БНГ со своим ан-

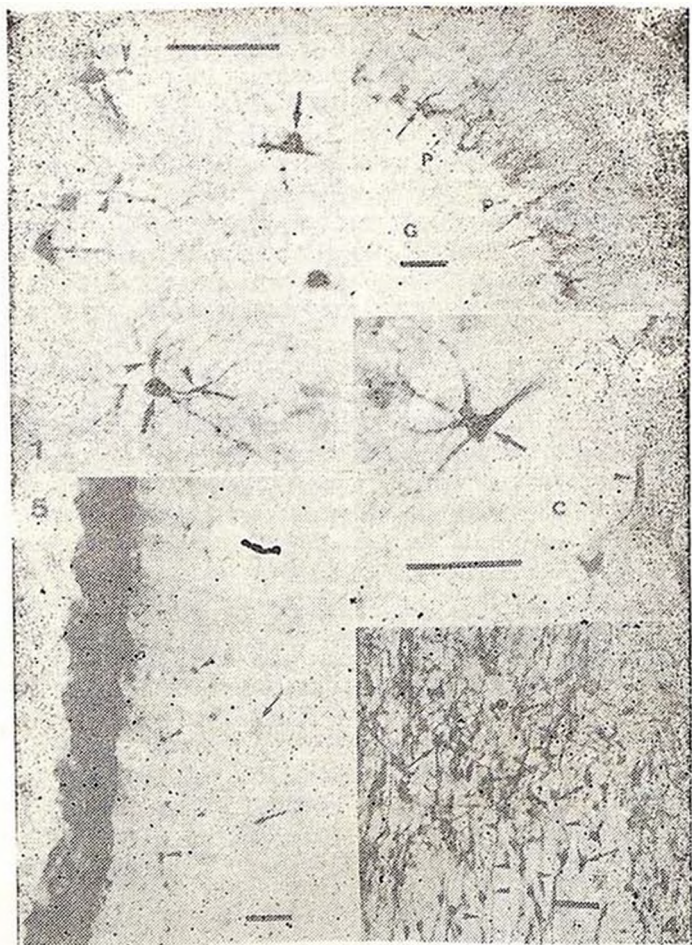


Рис. 1. БНГ-иммунопозитивные клетки в rugiform cortex с перикариомом овальной или неправильной формы (стрелки). Тонкие отростки без определенной пространственной ориентации с множественными разветвлениями (головки стрелок). Эти клетки напоминают астроциты. Масштаб: 50 мкм

Рис. 2. БНГ-иммунопозитивная клетка с множественным отростком вокруг сосуда (стрелка). Слабо окрашенные тела клеток в местах, соответствующих бермисовской глии (стрелки), с сильно окрашенными длинными и прямыми радиально направленными волокнами, которые заполняют всю ширину молекулярного слоя (головки стрелок). Клетки Пуркинье (Р) и зернистый слой (G) лишены иммунореактивности. Масштаб: 100 мкм

Рис. 3. БНГ-иммунопозитивная клетка с множественным отростком вокруг сосуда (стрелка). Видны также тонкие волокна, напоминающие отростки астроцитов (головки стрелок) вблизи каналия (С). Масштаб: 50 мкм

Рис. 4. Субфорикулярный орган содержит густую сеть БНГ-иммунопозитивных тел клеток и волокон. Тела клеток (стрелки) веретенообразной формы, с длинными и тонкими, параллельно расположенными отростками (головки стрелок). Масштаб: 100 мкм

Рис. 5. БНГ-иммуноокраска в перивентрикулярной области третьего желудочка. Среди слабых контуров иммунонегативных тел клеток (стрелки) преобладают темнокрашенные БНГ-иммунопозитивные, напоминающие глию клетки неправильной формы с множеством отростков (головки стрелок). Отмечается сильная окраска субэпидимальной зоны. Масштаб: 100 мкм

тигеном. В вышеуказанных областях варикозные волокна были обнаружены даже при использовании наиболее низкой концентрации антисыворотки.

В срезах ЦНС нам не удалось выявить окрашенные глиальные или нейрональные структуры с использованием анти-ПНФ, примененного в условиях, подобных иммуноокраске с анти-БНГ. Это же анти тело проявило специфичную гранулярную окраску в кардиомиоцитах предсердия на срезах, полученных из сердца крыс (не демонстрировано).

Обсуждение результатов

Наличие БНГ-подобной иммунореактивности во множестве глиальных клеток свидетельствует о том, что это вещество довольно широко распространено в ЦНС. Гипоталамическая перивентрикулярная локализация БНГ (наиболее похожая на глиальную, хотя природа типов этих клеток точно не установлена) соответствует предыдущим данным, полученным радиоиммунным способом [9]. Наличие БНГ-иммунопозитивных клеток в одном из макроцеллюлярных гипоталамических ядер (супраоптическое ядро) также было подтверждено в данной работе. Здесь также клетки напоминают глию, но их тип не уточнен, и не исключено, что они являются мелкими нейронами.

Преабсорбция антисыворотки с БНГ-антигеном показывает, что наблюдаемая иммуноокраска соответствует очищенному БНГ-антигену и не дает перекрестной реакции с глиальным фибриллярным кислым белком (хорошо известный астроглиальный маркер) [15, 16], несмотря на то, что большинство БНГ-иммунопозитивных глиальных клеток имеет четкий вид астроцитов. По представленным данным связь с другими компонентами, описанными ранее [17—19] как маркеры глии (S-100, 14-3-2) также не может быть установлена. БНГ может быть представлен как интегральный состав нейроглии (вероятно, астроглии) во многих областях мозга.

Наше внимание привлекает возможная роль БНГ в глиальных клетках. Другая интересующая нас проблема следующая: синтезируется ли это вещество в глиальных клетках или первоначально аккумулируется ими? В последнем случае глиоциты, которые контактируют с перикапиллярной средой, способны всасывать белок-гормональные комплексы, в частности БНГ, из циркулирующей крови. Наличие БНГ-подобной иммунореактивности в циркумвентрикулярных органах, как показано в данной работе, свидетельствует о возможности высвобождения БНГ из мозга в общую циркуляцию [9].

БНГ-антиген явно лишен иммуногистохимически определенной ПНФ активности, хотя из-за существования множества различных астроцитов, этот вывод должен быть интерпретирован с осторожностью. ПНФ представлен во многих структурах ЦНС, включая гипоталамические перивентрикулярные области [20] но он большей частью находится в нейронах, а не в глии. При использовании при-



Рис. 6. Вазопрессин-иммунопозитивные клетки в супраоптическом ядре. Выделяются сильно окрашенный перикарион с толстыми проксимальными дендритами (стрелки) и густое сплетение варикозных волокон (головки стрелок). Масштаб: 50 мкм

Рис. 7. БНГ-иммунопозитивные структуры в супраоптическом ядре. На фоне крупных иммунонегативных клеток (звездочки) видны интенсивно окрашенные мелкие клетки с отдельными длинными и тонкими отростками (головки стрелок). Масштаб: 50 мкм

Рис. 8. БНГ-иммунопозитивные варикозные волокна в ядре бокового обонятельного тракта. Некоторые из этих волокон представлены в виде извилистых петель (стрелки). Масштаб: 100 мкм

Рис. 9. Увеличение микрофотографии БНГ-иммунопозитивных волокон и тел клеток в ядре бокового обонятельного тракта. Показаны мультиполярные тела клеток (стрелки) с тонкими окончаниями, некоторые из которых явно контактируют со сравнительно крупными варикозностями (головки стрелок). Масштаб: 50 мкм

меняемой нами антисыворотки против ПНФ иммунопозитивные к ПНФ структуры в ЦНС не обнаружены, но с этой же антисывороткой обнаружена характерная окраска кардиомиоцитов предсердия. Таким образом, БНГ-подобная иммунореактивность в ЦНС отличается от ПНФ.

БНГ-иммунопозитивные тела клеток и отростки в ОТ и КАЯ миндалевидного тела представляют чисто нейрональный компонент распределения БНГ. Окраска кажется совершенно специфичной для этих ядер, и вид извилистых варикозных волокон подобен другим пептидсодержащим структурам. Мы полагаем, что еще рано приписывать какие-либо специфические функции БНГ в миндалевидном комплексе, но интересно отметить, что возможная функциональная связь между этой областью и сердцем описана в литературе [21]. Более того, наличие других различных нейропептидов продемонстрировано в вышеуказанных миндалевидных ядрах [22]. В частности, обнаружены нейропептиды с известным кардиоваскулярным эффектом, такие как нейротензинсодержащие волокна в ОТ и КАЯ, нейротензинпозитивные клетки только в КАЯ и FMRF-amide-позитивные волокна в КАЯ [23—27]. Предположение о возможной связи между этими кардиоактивными пептидами и БНГ требует дальнейших исследований.

Хотя БНГ-антиген первоначально получен из гипоталамуса, анатомическая близость центрального миндалевидного тела наводит на мысль, что возможную часть этого ядерного комплекса могли препарировать с тканями, взятыми для приготовления антигена. В данном случае пептидный компонент, узнаваемый антисывороткой БНГ, вероятно, первоначально образуется в миндалевидном теле, представляющем или сам БНГ, или, возможно, родственный пептид, не идентичный с БНГ.

Авторы признательны др. T. Wenger (II Институт анатомии Земмельвейского университета медицины, Будапешт) за любезное предоставление антисыворотки к вазопрессину, К. Rácz (Клиника терапии внутренних органов, Земмельвейский университет) за предоставление анти-ПНФ, проф. M. Palkovits и д-ру M. Kálmán (I Институт анатомии, Земмельвейский университет) за ценные обсуждения, M. Szász за проявленную техническую помощь.

IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF HYPOTHALAMIC CARDIOACTIVE PROTEIN-HORMONAL COMPLEXES IN RAT BRAIN MICROSTRUCTURES

ABRAMYAN S. S., *CSILLAG A., SRAPIONYAN R. M., **MESROPYAN N. G.,
GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan.

*First Department of Anatomy, Zimmels University of Medicine,
Budapest, Hungary

**Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian
Republic, Yerevan

Localization of the protein carrier of a coronarydilating hypothalamic glycopeptide, „neurohormone G“ (PCG) isolated and characterized previously, was described in rat brain by immunochemical method. Two types of structures were immunostained in our material: (1) glial elements most probably corresponding to astrocytes, Bergmann glia and cells of circumventricular organs. Glial labeling was widespread in the brain, although cells of pyroform cortex appeared to be more affected than those of other cortical regions. Periventricular and supraoptic regions of hypothalamus contain PCG immunopositive cells, which are most probably glial but their characterization is as yet ambiguous. (2) Varicose and tortuous fibres of clearly neuronal character, often in association with multipolar cell bodies. This type of labeling was confined to two nuclei of ventral amygdala, the cortical nucleus and the nucleus of the lateral olfactory tract. Immunostaining against PCG did not cross-react with glial fibrillary acidic protein and it differed distinctly from the immunolabeling observed with an antiserum against atrial natriuretic peptide. It remains to be elucidated whether the two types of immunostaining represent a single antigenic epitope. The glial component may be indicative of a role of these cells in the uptake from (or release into) general circulation of neurohormone G. The possible connection between PCG and other cardioactive peptides found previously in amygdala (neurotensin, FMRFamide) is also discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 38, № 5, с. 305—307, 1964.
2. Галоян А. А., Срапионян Р. М. Докл. АН АрмССР, т. 32, № 4, с. 210—213, 1966.
3. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Геворкян Г. Г. Биол. журн. Армении, т. 20, № 4, с. 3—8, 1967.
4. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Алексанян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 51, № 2, с. 125—128, 1970.
5. Срапионян Р. М., Джамбазян Т. А., Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга. Изд. АН АрмССР, т. 6, с. 157—160, 1970.
6. Галоян А. А. Изв. АН АрмССР, т. 16, № 4, с. 3—18, 1963.
7. Срапионян Р. М. Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 109—116, 1987.
8. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, Изд. АН АрмССР, т. 11, № 17, с. 97—104, 1976.

9. Срапионян Р. М., Абеян Ж. Г., Галоян А. А. *Вопр. мед. химии*, т. 31, № 2, с. 20—24, 1985.
10. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Саакян Ф. М., Галоян А. А. *Вопр. биохимии мозга*, т. 13, с. 67—68, 1979.
11. Morawitz P. Z., Zahn A. *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, v. 116, p. 364—367, 1914.
12. Амброзиус Х.—В кн.: *Иммунологические методы* (под ред. Г. Фримеля), М., Медицина, с. 14—15, 1987.
13. Gudkowska J., Horky K., Thibault G., Januszewicz P., Cantin M., Genest J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 125, p. 315—325, 1964.
14. Sternberger L. A., Hardy P. H. Jr., Cuculis J. J., Meyer H. G. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 18, p. 315—333, 1970.
15. Bignami A., Dahl D., Rueger D. C.—In: *Adv. Cell. Neurology*, (eds. S. Fedoroff, L. Hertz), v. 1, p. 286—313, New York, Akad. Press, 1980.
16. Eng L. F., Vanderhaegen J. J., Bignami A., Gerstl B. *Brain Res.*, v. 28, p. 351—354, 1971.
17. Hyden H., McEwen B. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 2, p. 354—358, 1966.
18. Moore B. W., Perez V. J., Gehring M. J. *Neurochem.*, v. 15, p. 265—272, 1968.
19. Rende M., Zucco M., Cocchi D., Michetti F. *Proc. 8th Meeting Int. Soc. Neurochem.*, Nottingham, UK, p. 70, 1981.
20. Standaert D. G., Needleman P., Saper C. B. *J. Comp. Neurol.*, v. 253, p. 315—341, 1986.
21. Савенко Л. Д. *Журн. эксперим. и клин. мед.*, т. 26, № 2, с. 119—123, 1986.
22. Palkovits M.—In: *Frontiers in Neuroendocrinology*, (eds. I. Martini, W. F. Ganong), v. 10, p. 1—44, New York, Raven Press, 1988.
23. Emson P. C., Goedert M., Horsfield P., Rioux F., Pierre S. *St. J. Neurochem.*, v. 38, p. 992—999, 1982.
24. Jennes L., Stumpf W. E., Kallwas P. W. *J. Comp. Neurol.*, v. 210, p. 211—224, 1982.
25. Roberts G. W., Woodhams P. L., Polak J. M., Crow T. J. *Neuroscience*, v. 7, p. 99—131, 1982.
26. Weher E., Evans C. J., Samuelsson S. J., Burchas J. D. *Science*, v. 214, p. 1243—1251, 1981.
27. Williams R. G., Dockray G. J. *Brain Res.*, v. 276, p. 213—229, 1983.

Поступила 16. IV. 1990