

УДК 611.814.1:616.36-088.811.5-091.8-092.9

## СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПРИ 20-СУТОЧНОМ ПОДПЕЧЕНОЧНОМ ХОЛЕСТАЗЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ УРСОФАЛЬКОМ

О.В. Барабан<sup>1</sup>; С.В. Емельянчик<sup>2</sup>, доцент, к.м.н.;

С.М. Зиматкин<sup>1</sup>, профессор, д.б.н.

<sup>1</sup>Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

<sup>2</sup>Кафедра зоологии и физиологии человека и животных,

УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купаль»

Межуниверситетская лаборатория «Биомед»

*Цель данного исследования заключалась в определении структурных и метаболических изменений в гистаминергических нейронах мозга крысы на 20 сутки холестаза и при коррекции урсофальком. Установлены изменения размеров и формы, нарушение активности некоторых ферментов в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крыс. Урсофальк уменьшает выраженность этих изменений.*

**Ключевые слова:** гистаминергические нейроны, мозг, холестаз, урсодезоксихолевая кислота, гистохимия, морфометрия.

*The aim of this study was to determine the structural and metabolic alterations in the histaminergic neurons of the brain on the 20th day of cholestasis and their correction with ursofalk. The changes of the size, the shape and disturbance of some enzymes in cytoplasm of the histaminergic neurons (subgroups E2) of rat's hypothalamus, are established, ursofalk decreasing these changes.*

**Key words:** histaminergic neurons, brain, cholestasis, ursodeoxycholic acid, histochemistry, morphometry.

### Введение

Подпеченочная (механическая) желтуха развивается при препятствии току желчи из желчных протоков в 12-перстную кишку. Причинами её могут быть обтурация печёночного или общего желчного протока, ампулы 12-перстной кишки конкрементами, паразитами, опухолями; рак поджелудочной железы, желчного пузыря, печени, 12-перстной кишки; кисты и хроническое воспаление поджелудочной железы, лимфогранулематоз, послеоперационное сужение общего желчного протока; атрезия (гипоплазия) желчных путей [7]. Холестаз приводит к уменьшению массы тела и всасыванию в кишечнике витаминов А, Д, Е, К, а также кальция; во многих органах нарушаются процессы перекисного окисления липидов, изменяется текучесть мембран и активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы [10, 11]. При этом в сыворотке крови пациентов повышается уровень конъюгированного билирубина, активность печеночной фракции щелочной фосфатазы,  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, а также уровень общего холестерина и конъюгированных желчных кислот [11].

У больных механической желтухой в 90% случаев наблюдаются неврологические симптомы, а в 80% – симптомы диффузного поражения головного мозга, проявляющиеся в виде рефлексов орального автоматизма. Электроэнцефалографическое исследование подтверждает диффузный

характер изменений при отсутствии очаговых нарушений головного мозга. Значительное место у таких больных занимают поражения периферических нервов – полинейропатии [9]. Морфологическое исследование головного мозга собак при экспериментальном холестазах обнаружило простую атрофию, пикноз ядер, нейронофагию в нервных клетках базальных ядер, скорлупы, красного ядра, а также в таламусе, коре больших полушарий и черной субстанции [13]. Наши собственные предварительные гистологические исследования показали, что наибольшие изменения в нейронах мозга крыс развиваются на 10-20 сутки подпеченочного холестаза [2].

Однако при холестазах совершенно не изучено состояние гистаминергических нейронов гипоталамуса, которые могут играть важную роль в формировании гепатоцеребральной патологии. Они участвуют в регуляции различных функций, систем и реакций организма: нейроэндокринной и сердечно-сосудистой систем, кровотока в мозге, температуры тела, сна и бодрствования, гибернации, пищевого и питьевого поведения, памяти, обучения и др. [1, 12]. Известно, что гистаминергические нейроны головного мозга млекопитающих локализируются только в заднем гипоталамусе. Они объединены в пять скоплений – ядер (E1-E5), пространственно взаимосвязанных между собой и постепенно переходящих одно в другое [3, 4]. Наиболее

удобным и репрезентативным для изучения популяции гистаминергических нейронов мозга является ядро E2, т.к. оно самое крупное и содержит более половины всех гистаминергических нейронов мозга [4].

Урсодезоксихолевая кислота – желчная третичная гидрофильная кислота, образующаяся в печени путём изомеризации вторичных желчных кислот. Введение в организм ее лекарственной формы – урсофалька, снижает содержание билирубина в сыворотке крови при токсическом поражении печени  $CCl_4$  [16], оказывает благоприятное влияние на биохимические показатели сыворотки при первичном билиарном циррозе [17] и вызывает растворение холестериновых камней [22]. Урсофальк увеличивает устойчивость мембран щеточной каемки и угнетает процессы перекисного окисления липидов [21]. Учитывая вышеизложенное, мы решили использовать урсофальк для предупреждения и коррекции холестатических изменений в гистаминергических нейронах гипоталамуса.

Цель данного исследования – установить изменения размеров и формы, а также активности ферментов в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крысы на 20 сутки холестаза и влияние на них урсофалька.

#### Материалы и методы

Исследование проведено на 21 крысах-самцах породы Вистар, массой  $250 \pm 60$  грамм. Их содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными. Подпечёночный холестаз моделировали путём перевязки двумя лигатурами с последующей перерезкой между ними общего желчного протока (на 3-5 мм ниже места слияния долевых протоков) под общим эфирным наркозом. Для изучения возможной коррекции состояния, вызванного холестазом, части опытных крыс ежедневно, в течение двадцати суток вводили урсофальк вместе с пищей в концентрации 10-15 мг/кг массы. Животным контрольной группы производили ложную операцию, и на протяжении всего эксперимента у них сохранялся физиологический отток желчи. Через 20 суток после операции животным забивали декапитацией под эфирным наркозом. Быстро вскрывали черепную коробку, извлекали головной мозг и выделяли из него гипоталамус, который замораживали и хранили в жидком азоте. Серийные фронтальные срезы заднего гипоталамуса толщиной 20 мкм готовили в криостате при температуре – 15°C, ориентируясь по схемам стереотаксического атласа [19]. Гистаминергическое ядро E2 находили по схемам расположения гистаминергических ядер гипоталамуса [3, 4].

Криостатные срезы гипоталамуса окрашивали на выявление активности основного гистаминкатаболизирующего фермента MAO Б (моноамин:  $O_2$ -оксидоредуктаза (дезаминирующая) типа Б; КФ 1.4.3.4) [5], который служил маркерным ферментом гистаминергических нейронов [4] и по Нисслю [8]. Для изучения особенностей метаболизма

гистаминергических нейронов криостатные срезы обрабатывали на выявление активности MAO Б (в течение 45 минут), оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса – сукцинатдегидрогеназы (сукцинат: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1), с гликолизом – лактатдегидрогеназы (L-лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27), с транспортом электронов – НАДН-дегидрогеназы (НАДН: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.6.99.3) и НАДФН-дегидрогеназы (НАДФН<sub>2</sub>: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.6.1.1) с пентозофосфатным путем – глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (D-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.49), и кислотной фосфатазы – маркерного фермента лизосом (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; КФ 3.1.3.2) [20].

Количественную оценку размеров и формы нейронов проводили измерением следующих параметров: минимального и максимального диаметров, периметра, площади и объема нейронов, форм-фактора и фактора элонгации на препаратах, окрашенных по Нисслю и на MAO Б (в течение 90 минут). В каждой экспериментальной группе измеряли 120-160 нейронов. Количественную оценку активности изучаемых ферментов проводили цитофотометрически, определяя оптическую плотность полученного осадка на максимуме поглощения окрашенного продукта реакции. Относительную активность ферментов выражали в единицах оптической плотности, умноженных на 1000. В каждой исследуемой группе оценивали 150-200 нейронов.

Морфометрические и цитофотометрические исследования проводили при помощи компьютерного анализатора изображения «Bioscan NT» 2.0. Полученные цифровые данные обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows.

#### Результаты и обсуждение

Через 20 суток после перевязки общего желчного протока при анализе гистологических препаратов, окрашенных по Нисслю, обнаружены изменения размеров перикарионов гистаминергических нейронов у опытных животных. Статистически достоверное увеличение максимального диаметра на 6,0% ( $Z = 2,8$ ;  $p = 0,005$ ) и периметра – на 3,3% ( $Z = 2,3$ ;  $p = 0,021$ ). При этом площадь и объем гистаминергических нейронов, а также значение фактора элонгации также возрастали, хотя и не достоверно при использовании методов непараметрической статистики (рис. 1). То есть гистаминергические нейроны мозга при холестазе увеличиваются в размерах и приобретают более вытянутую, веретеновидную форму. Морфометрические показатели, полученные от опытных животных, которым вводили урсофальк, приближаются к значениям у контрольных животных и статистически достоверно от них не отличаются (рис. 1).

Двадцатисуточный холестаз ведет к значительному нарушению активности ферментов в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 ги-

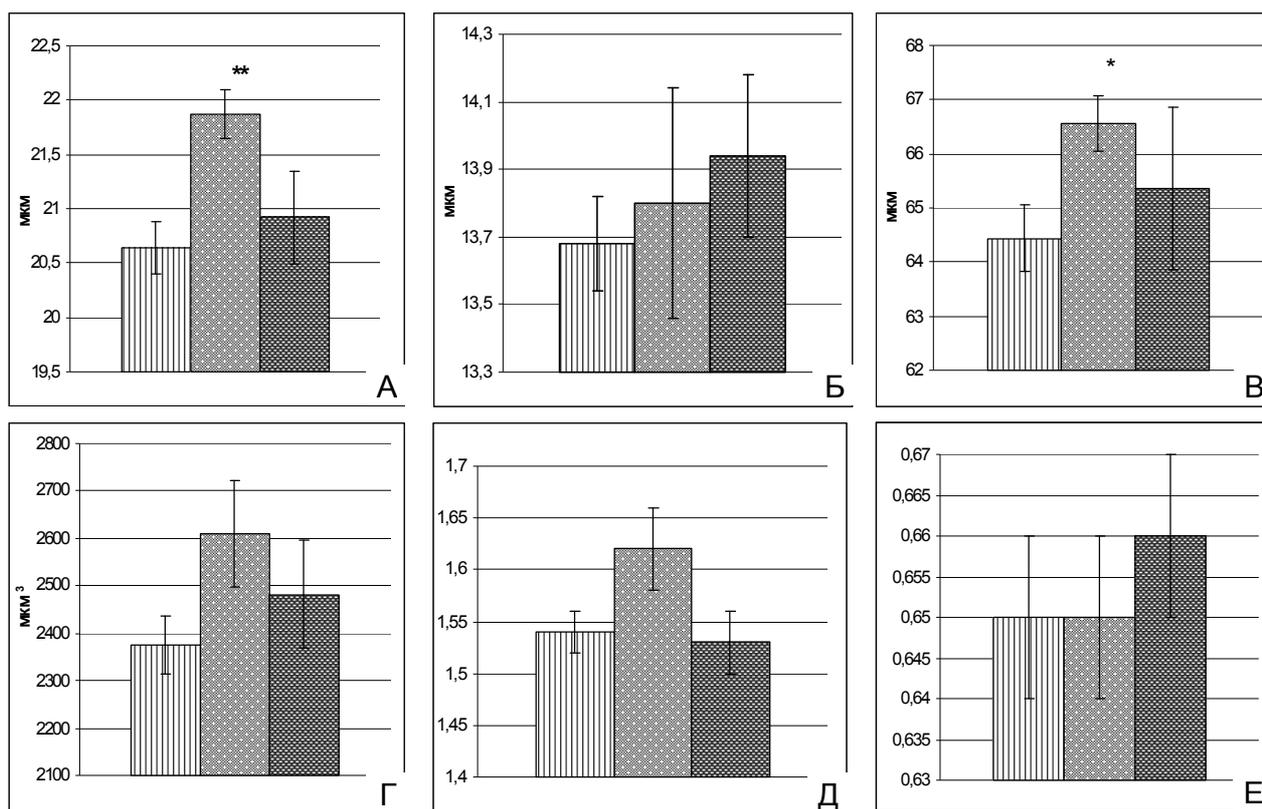


Рис. 1. Изменение размеров и формы перикарионов гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крысы на 20 сутки подпечёночного холестаза и при введении урсофалька.

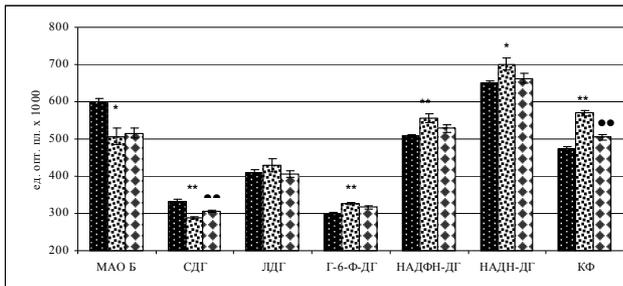
Значения максимального диаметра (А), минимального диаметра (Б), периметра (В), объёма (Г), фактора элонгации (Д) и форм-фактора (Е); ▨ – контроль, ▨ – холестаз, ▨ – холестаз + урсофальк (различия между контрольными и опытными образцами значимы: \* – при  $p < 0,05$ ; \*\* – при  $p < 0,01$ )

поталамуса. Активность MAO Б и СДГ снижается на 15,4% ( $Z = 2,51$ ;  $p = 0,011$ ) и 13,5% ( $Z = 3,10$ ;  $p = 0,002$ ) соответственно. Активность других ферментов напротив, повышается: Г-6-Ф-ДГ – на 8,9% ( $Z = 3,2$ ;  $p = 0,002$ ), НАДФН-ДГ – на 9,4% ( $Z = 2,9$ ;  $p = 0,004$ ), НАДН-ДГ – на 7,9% ( $Z = 2,5$ ;  $p = 0,01$ ), КФ – на 20,2% ( $Z = 2,9$ ;  $p = 0,004$ ). Активность ЛДГ в гистаминергических нейронах существенно не изменена ( $Z = 0,6$ ;  $p = 0,56$ ) (рис. 2).

Низкая активность маркерных ферментов митохондрий, СДГ и MAO Б свидетельствует о нарушении в гистаминергических нейронах митохондриальных энергетических процессов и окислительного фосфорилирования. При этом в них компенсаторно усиливаются внемитохондриальные энергетические процессы, характеризующиеся высокой активностью НАДФН-ДГ, НАДН-ДГ и Г-6-Ф-ДГ. Активация маркерного фермента лизосом КФ указывает на усиление процессов внутриклеточного переваривания поврежденных макромолекул и органелл. В целом состояние гистаминергических нейронов после 20-суточного холестаза свидетельствует о значительных нарушениях их строения, метаболизма и функциональной активности, отражающих повреждение нейронов и компенсаторные процессы в них. Возможно, эти изменения связаны с повышением уровня свободного билирубина в крови при среднетяжёлых и тяжёлых формах застойных желтух [7]. Обладая способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, не-

конъюгированный билирубин оказывает токсическое действие на нейроны и приводит к повреждению митохондрий (вызывая нарушения энергетического метаболизма и апоптоз) и цитоплазматических мембран (вызывая окислительный стресс и нарушение транспорта нейротрансмиттеров) [15, 18].

Введение урсофалька опытными животными частично предупреждает и нормализует нарушения размеров и формы, а также активности ферментов гистаминергических нейронов, вызываемые холестазом. Так, активность MAO Б под действием урсодезоксихолевой кислоты несколько увеличилась по сравнению с опытной группой без урсофалька, хотя и осталась ниже, чем у контрольных животных. Активность СДГ достоверно возросла на 6,3% ( $Z = 3,0$ ;  $p = 0,003$ ) по сравнению с холестатическими животными не получавшими урсофальк, хотя и не достигла уровня контрольных животных. Значение активности НАДФН-ДГ и НАДН-ДГ снизилось на 4,5% и 5,5% и статистически не отличалось от контроля ( $Z = 1,9$ ;  $p = 0,063$ ) и ( $Z = 0,7$ ;  $p = 0,475$ ). Активность Г-6-Ф-ДГ осталась повышенной, хотя и в меньшей степени, чем у опытных животных без урсофалька. Активность ЛДГ у не леченых животных также приближается к контролю. Активность КФ у холестатических крыс, получавших урсофальк, возросла значительно меньше, хотя и осталась выше, чем в контроле (рис. 2).



**Рис. 2.** Активность ферментов в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крысы через на 20 сутки подпечёночного холестаза и при введении урсофалька.

■ – контроль, ▨ – холестаз, ▩ – холестаз + урсофальк;

\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  при сравнении с контролем;  
 \*\* –  $p < 0,01$  при сравнении с опытными образцами без урсофалька

Как видно из полученных данных, использование урсофалька в период холестаза приводит к меньшим нарушениям в гистаминергических нейронах гипоталамуса. По-видимому, урсодезоксихолевая кислота оказывает на гистаминергические нейроны мозга как прямое действие, так и опосредованное, через нормализацию гепатоцитов встраиваясь в их мембраны, снижая ПОЛ [21]. Она уменьшает продукцию собственных желчных кислот [6] и нормализует обменные процессы в организме.

### Выводы

1. При 20-суточном подпечёночном холестазе у крыс наблюдаются изменения размеров и формы гистаминергических нейронов гипоталамуса, а также значительные нарушения активности ключевых ферментов их метаболизма: дегидрогеназ сукцината, глюкозо-6-фосфата, НАДН и НАДФН, а также кислой фосфатазы и MAO.

2. Урсодезоксихолевая кислота оказывает защитное действие, предупреждая и корригируя структурные и метаболические нарушения гистаминергических нейронов мозга при холестазе.

### Литература

1. Анищик О.В., Зиматкин С.М. Центральная гистаминергическая система в норме и при некоторых патологических состояниях // Известия НАН Беларуси. Сер. Мед.-биол. наук. – 2002. – № 2. – С. 94-102.
2. Барабан О.В., Емельяничук С.В. Метаболизм гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крысы при экспериментальном холестазе // Актуальные проблемы морфологии: сб. тр. междунар науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию БГМУ; редкол.: П.Г. Пивченко. – Минск. – 2006. С. 18-19.
3. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Анищик О.В. Гистаминергическая нейронная система мозга // Морфология. – 2003. – Т. 123, вып. 2. – С. 97-105.
4. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Стрик О.Н. Пространственная организация и морфометрическая характеристика гистаминергических нейронов мозга крысы // Морфология. – 2005. – № 2. – С. 27-30.
5. Зиматкин С.М., Цыдик В.Ф. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге // Морфология. – 1994 – Т. 106, вып. 4. – С. 157-161.

6. Новикова Р.И., Тюменцева С.Г. Печеночная недостаточность / Клінічні лекції – 2002. – № 4. – С. 42-51.
7. Подымова С.Д. Болезни печени (руководство для врачей). М.: Медицина, 1998. – 703 с.
8. Ромейс Д. Микроскопическая техника. – М.: Изд. Ин. Лит-ры. 1953. – 718с.
9. Емельяничук С.В., Зиматкин С.М. Изменения нервной системы при холестазе // Журнал ГрГМУ. – 2005, – № 4. – С. 40-42.
10. Феофилов Г.Л., Воробьев И.В., Семенов А.В. и др. Антиоксиданты в комплексном лечении острого холецистита у больных пожилого и старческого возраста // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 1992. – Т. 148. – № 1. – С. 16-21.
11. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. – 858с.
12. Brown R.E., Stevens D.R., Haas H.L. The physiology of brain histamine // Prog.Neurobiol. – 2001 – Vol. 63. – P. 637-672.
13. Furukawa Y. Histological changes in the brain due to experimental obstructive jaundice // Nippon Geka Gakkai Zasshi. – 1991. – Vol. 92 – P. 37-45.
14. Haas H., Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the noradrenergic system // Nat.Rev.Neurosci. – 2003. – Vol. 4. – P. 121-130.
15. Hansen T. W. Bilirubin brain toxicity // J.Perinatol. – 2001. – Vol. 21 Suppl 1. – P. S48-S51.
16. Kulcsar-Gergely J., Kulcsar A. Studies on the effect of ursodeoxycholic acid on rats with acute carbontetrachloride injury // Arzneimittelforschung. – 1997. – Vol. 47. – № 5. P. 659-661.
17. Nikolovska D., Vasilev P., Mikhova A. Treatment of primary biliary cirrhosis with ursodeoxycholic acid // Vutr.Boles. – 2000. – Vol. 32. – № 1. – P. 25-27.
18. Ostrow J. D., Pascolo L., Brites D., Tiribelli C. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity // Trends Mol.Med. – 2004. – Vol. 10. – № 2. P. 65-70.
19. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. – New York: Academic Press. 2nd ed., 1986.
20. Pearse A.G.E. Гистохимия теоретическая и прикладная. М.: Изд. Ин. Лит-ры. 1962. – 962 с.
21. Plakhotnik S. V. Kharchenko N.V., Synel'nyk O.D., Shvets' N.I. The effect of hepatoprotectors on the level of blood lipid peroxidation in patients with chronic hepatitis // Lik.Sprava. – 1997. – Vol. 5. – P. 132-135.
22. Williams C. N., Al Knawy B., Blanchard W. Bioavailability of four ursodeoxycholic acid preparations // Aliment.Pharmacol.Ther. – 2000. – Vol. 14. – № 9. – P. 1133-1139.

### Resume

#### STRUCTURAL AND METABOLIC CHANGES IN THE HISTAMINERGIC NEURONS OF THE RAT'S HYPOTHALAMUS ON THE 20TH DAY OF CHOLESTASIS AND THEIR CORRECTION WITH URSOFALK

O.V. Baraban, S.V.Yemelyanchik, S.M. Zimatkin  
 Grodno State Medical University  
 Ya. Kupala Grodno State University  
 «Biomed» interuniversity laboratory

It was found that 20-days cholestasis leads to the alteration of size and shape of the hypothalamus histaminergic neurons in rats. The significant changes of the activity of dehydrogenases of succinate, glucose-6-phosphate, NADH and NADPH, as well as acid phosphatase and monoamine oxidase type B take place. The administration of ursofalk partly prevents the development of the structure and metabolic changes of histaminergic neurons of brain.

Поступила 23.01.07