

## ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ НЕЙРОНОВ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКОГО ЯДРА E2 ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ ТРИДЦАТИМИНУТНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И РЕПЕРФУЗИИ

Кузнецова В.Б., Криштофик Е.И., Козляковская О.О.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

*Исследования проведены на 15 лабораторных крысах с целью выявить ультраструктурные особенности нейронов гистаминергического ядра E2 мозга крысы после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга и реперфузии. Установлено, что в гиперхромных нейронах после тридцатиминутной ишемии и тридцатиминутной реперфузии значительно прогрессируют вызванные гипоксией признаки деструкции ультраструктур, ответственных за энергетические и синтетические процессы.*

**Ключевые слова:** ишемия, реперфузия, головной мозг, гистамин, нейроны, крысы.

### Введение

Ишемические поражения головного мозга являются третьей по частоте причиной смерти в большинстве промышленно развитых стран. Механизмы повреждения клеток, вызванные ишемией, включают: эксайтотоксичность, окислительный стресс, образование свободных радикалов, апоптоз и воспаление, в конечном счете вызывая гибель нейронов [4].

Из-за высокой распространенности и неблагоприятного прогноза ишемические заболевания головного мозга являются приоритетными для медицины. Наряду с патогенетическими изменениями при ишемии огромный интерес вызывают реперфузионные изменения. Вслед за восстановлением кровотока, который может возникнуть как спонтанно, так и после медикаментозной или хирургической коррекции, возникает каскад патологических процессов, связанных с реперфузией – постишемический реперфузионный синдром [2]. Острая церебральная ишемия, в особенности следующий за ней период реперфузии – поступление крови в область ишемии – сопровождаются активацией выработки свободных кислородных радикалов. Следствием увеличения их концентрации является целый ряд процессов, приводящих к повреждению мозговой ткани из-за образования липидных перекисей, денатурации белков, инактивации энзимов, повреждения нуклеиновых кислот и ДНК, высвобождения ионов кальция из внутриклеточных хранилищ и поступления их в цитоплазму из внеклеточной жидкости, разрушения цитоскелета. Воздействие свободных радикалов приводит к нарушению функции гематоэнцефалического барьера, эндотелиальной дисфункции со стойкой вазодилатацией, срывом ауторегуляции мозгового кровотока [5].

Церебральная ишемия провоцирует ферментативные процессы, приводящие к нейрональным повреждениям. Гистамин снижает силу повреждений, вызванных ишемией, через гистаминовые H<sub>2</sub> рецепторы, если вводится перед индукцией ишемии. Постишемическое введение гистидина, предшественника гистамина и антагониста H<sub>3</sub> рецепторов тиоперамида, смягчает как последствия инфаркта мозга, так и отдаленные последствия гибели нейронов. Высвобождение гистамина из нервных окончаний гистаминергических нейронов усиливается во время ишемии [3].

В головном мозге гистамин локализуется главным образом в гистаминергических нейронах; небольшое количество гистамина находится в тучных клетках рыхлой соединительной ткани. Гистаминергическая нейронная система (единственное место синтеза нейронального гистамина) представлена гистаминергическими нейронами, тела которых ло-

кализуются в заднем гипоталамусе. В порядке убывания размеров отдельные гистаминергические ядра располагаются следующим образом: E<sub>2</sub> > E<sub>4</sub> > E<sub>3</sub> > E<sub>5</sub> > E<sub>1</sub>. Большая часть нейронов (54%) сосредоточена в ядре E<sub>2</sub>. Нейроны гистаминергических ядер гипоталамуса крысы метаболически гетерогенны: в разных гистаминергических ядрах гипоталамуса крысы они различаются по активности дегидрогеназ, отражающих интенсивность окислительного метаболизма и энергетическое обеспечение процессов биосинтеза и MAO Б, отражающего интенсивность окислительного дезаминирования гистамина. Активность этих ферментов в нейронах ядра E<sub>2</sub> максимальна. Гистамин в ЦНС действует через три типа рецепторов: H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> (постсинаптические) и H<sub>3</sub> (пресинаптические авторецепторы). Гистаминовые рецепторы, принадлежащие к семейству рецепторов, связанных с G-белками, широко и гетерогенно распределены в мозге и периферических тканях [1, 6].

Ввиду протективного влияния центрального гистамина на ишемизированную зону головного мозга представляет особый интерес изучение после субтотальной ишемии и последующей реперфузии структурного состояния нейронов ядра E<sub>2</sub> как наиболее репрезентативного из гистаминергических ядер.

**Цель исследования** – описать особенности и дать морфометрическую характеристику ультраструктур нейронов гистаминергического ядра E<sub>2</sub> мозга крысы после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга и тридцатиминутной реперфузии.

### Материалы и методы

Исследования проведены на 15 белых крысах-самцах в возрасте 4-6 месяцев, массой 190-210 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария, на полноценном рационе. Соблюдались все правила гуманного обращения с животными. Все эксперименты одобрены этическим комитетом ГрГМУ. Выбор экспериментальных животных был обусловлен сходством ангиоархитектоники головного мозга крыс и человека. Первую группу животных составили контрольные крысы (n=5), вторую группу – крысы с субтотальной тридцатиминутной ишемией головного мозга (n=5), третью группу – крысы после субтотальной 30-минутной ишемии головного мозга и последующей 30-минутной реперфузии (n=5). Ишемию головного мозга моделировали путём перевязки двух общих сонных артерий на 30 минут. Контрольную группу составили ложнопериоперированные животные, которым воспроизводились наркотизация, кожный разрез и выделение артерий без последующей перевязки сосудов. Декапитацию животных, находящихся под глубоким тиопенталовым наркозом, прово-

дили с 900 до 1100 утра: у животных первой группы – через 30 мин. после ложной операции; у животных второй группы – сразу по истечении 30-минутной ишемии; у животных третьей группы – после субтотальной 30-минутной ишемии головного мозга и последующего 30-минутного восстановления кровотока в обеих общих сонных артериях. Черепную коробку быстро вскрывали, извлекали головной мозг и выделяли из него гипоталамус. Образцы мозга, предварительно выдержав в парах азота, замораживали путем погружения в жидкий азот, где хранили до начала исследования. Во всех исследованиях в каждой экспериментальной группе использовали 5 животных с количественной оценкой не менее пяти нейронов в срезах гистаминергического ядра E2 гипоталамуса животного. Это обеспечило достаточный объем выборки для последующего количественного анализа.

Для электронно-микроскопического исследования выбрано гистаминергическое ядро E2 как самое репрезентативное с наибольшим количеством гистаминергических нейронов. Два фронтальных криостатных среза гипоталамуса, толщиной 20 мкм и 60 мкм, готовили при  $-150^{\circ}\text{C}$  на уровне  $P \approx -3.80$  (3,8 мм кзади от брегмы). Первый срез монтировали на предметное стекло. В дальнейшем его окрашивали на выявление специфического маркера MAO B. Второй срез в камере криостата помещали в 1% Os-фиксатор. В дальнейшем, под контролем маркированного среза (окрашенного на выявление MAO B), выделяли зоны, содержащие изучаемую структуру (гистаминергическое ядро E2 гипоталамуса крысы). Далее материал обезвоживали и заключали в заливочную смолу. Срезы изготавливали на ультрамикротоме MT-7000 (США). Полученные препараты изучали в электронном микроскопе JEM - 1011 (JEOL). Для морфометрии ультраструктур нейронов гистаминергического ядра E2 использовали программу iTEM.

Результаты морфометрических исследований обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows. Все данные результатов исследований, представленные в этой статье, являются статистически достоверными ( $p \leq 0,05$ ).

#### **Результаты исследований и обсуждение**

В нейронах гистаминергического ядра E2 выявлены нейроны в различном морфофункциональном состоянии. Во второй и третьей группах чаще, чем в первой группе, встречаются гиперхромные нейроны.

Гиперхромные нейроны составляют основную массу от всех нейронов гистаминергического ядра E2 во второй и третьей группах. Ядра гиперхромных нейронов угловато-округлые, с извилистой кариолеммой. Периметр ядер гиперхромных нейронов гистаминергического ядра E2 второй группы на 45% больше, а выпуклость (convexity) кариолеммы на 10% меньше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы. В третьей группе периметр ядер гиперхромных нейронов на 38% больше, а выпуклость (convexity) кариолеммы на 8% меньше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы. Площадь, максимальный и минимальный диаметры, фактор элонгации не выявили статистически значимых изменений у животных опытных групп по сравнению с контрольной группой.

В гиперхромных нейронах второй группы количество пор на 1 мкм кариолеммы на 67%, количество рибосом на 1 мкм внешней мембраны кариолеммы на 60% больше, чем соответствующие

показатели у животных контрольной группы. В гиперхромных нейронах третьей группы целостность наружной мембраны кариолеммы часто нарушена, количество пор на 1 мкм кариолеммы на 33% меньше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы и на 150% меньше, чем во второй группе; количество рибосом на 1 мкм внешней мембраны кариолеммы на 20% меньше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы и в 2 раза меньше, чем во второй группе.

Хроматин в гиперхромных нейронах мелкозернистый, распределён равномерно, встречаются лишь небольшие участки гетерохроматина. В отдельных участках кариоплазмы видны плотные зёрнышки мелких размеров – интерхроматиновые гранулы, которые встречаются либо поодиночке, либо небольшими скоплениями. При сравнении с первой и третьей группами ядра гиперхромных нейронов после 30-минутной ишемии более светлые.

Во всех нейронах гистаминергического ядра E2 как в контрольной, так и в опытных группах встречается, как правило, одно ядрышко. В третьей группе осмиофильность ядрышка гиперхромных нейронов значительно ниже, чем во второй и в первой группах. Отмечено смещение ядрышка к периферии и массовый выход из него гранул рибонуклеопротеинов (РНП) рибосомного типа, наподобие ядрышкоподобного облака-тени. Площадь ядрышек гиперхромных нейронов гистаминергического ядра E2 второй группы на 44% больше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы.

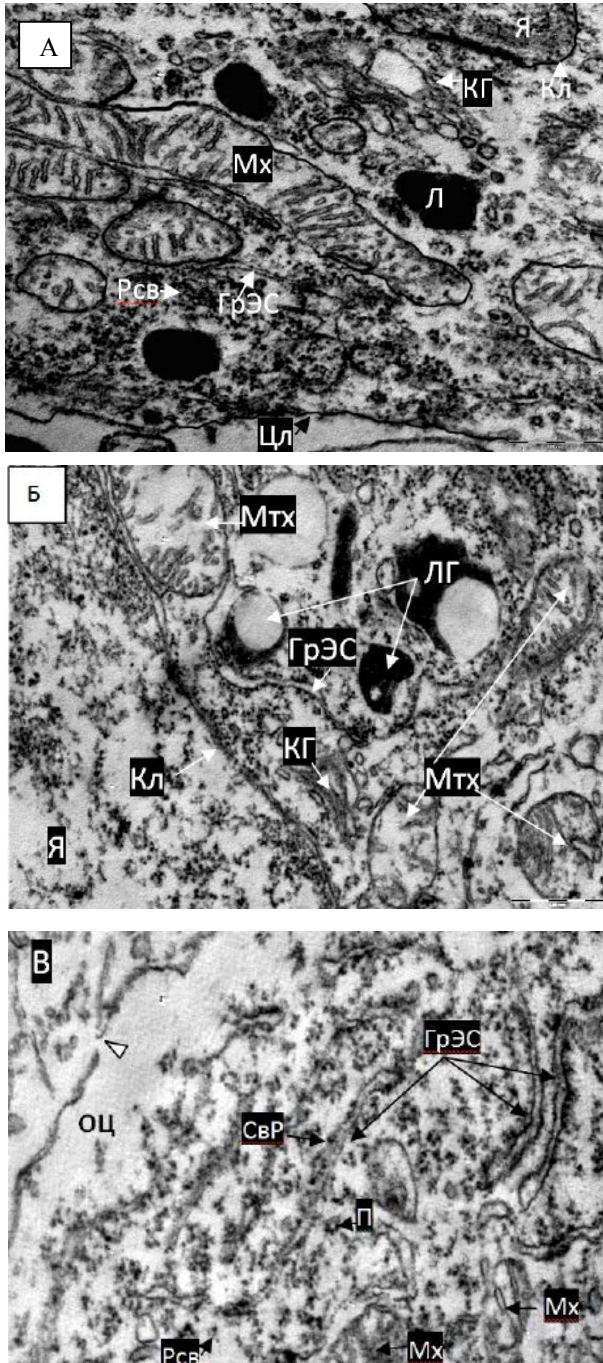
Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС) и гладкая эндоплазматическая сеть (ГлЭС) нейронов гистаминергического ядра E2 второй и третьей групп представлены широкими, лежащими почти параллельно, цистернами, разделёнными промежутками разной величины как в гипер- так и в гипохромных нейронах, с преобладанием в последних. В третьей группе значительно уменьшаются коммуникации между канальцами ГрЭС и ГлЭС гиперхромных нейронов, а также сообщения канальцев ГрЭС с кариолеммой.

Количество рибосом на 1 мкм поверхности цистерн ГрЭС гиперхромных нейронов во второй группе на 38% больше, чем соответствующий показатель у животных контрольной группы. В третьей группе – на 25% меньше, чем в первой – контрольной группе и на 83% меньше, чем во второй группе. Минимальный диаметр цистерн ГрЭС нейронов во второй группе в 2,5 раза больше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы. В третьей группе – на 278% больше, чем в первой – контрольной группе, и на 50% больше, чем во второй группе.

Количество свободных рибосом на 1 мкм<sup>2</sup> перикарионов гиперхромных нейронов гистаминергического ядра E2 во второй группе на 46% больше, чем соответствующий показатель у животных контрольной группы. В третьей группе – на 33% меньше, чем в первой – контрольной группе, и на 118% меньше, чем во второй группе.

Количество цистерн аппарата Гольджи гиперхромных нейронов гистаминергического ядра E2 во второй группе на 50% больше, чем соответствующий показатель у животных контрольной группы. В третьей группе – на 50% меньше, чем во второй группе. Суммарная площадь всех цистерн одного КГ в нейронах второй группы на 28% больше, чем в контрольной группе. Количество вакуолей со стороны cis-поверхности комплекса Гольджи в ги-

перхромных нейронах второй группы в 2,25 раза больше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы. В третьей группе – на 25% больше, чем в контрольной группе. Количество вакуолей у trans-поверхности комплекса Гольджи не дал статистически значимых различий у опытных животных по сравнению с контрольной группой.



ГрЭС – гранулярная эндоплазматическая сеть, Я – ядро, Мтх – митохондрии, КГ – комплекс Гольджи, П – полисомы, КЛ – кариолемма, - нарушение целостности цитолеммы, ОЦ – отечность цитоплазмы, СвР – рибосомы на поверхности ГрЭС, Рсв – свободные рибосомы, Л – лизосомы, ЛГ – липофусциновые гранулы

**Рисунок 1. – Гиперхромные нейроны гистаминергического ядра E2. А. Первая группа (контроль). Электронограмма ув. х 40000. Б. Вторая группа (ишемия). Электронограмма ув. х 40000. В. Третья группа (ишемия/реперфузия). Электронограмма ув. х 50000**

Митохондрии в перикарионах гиперхромных нейронов гистаминергического ядра E2 второй и третьей групп отёчные, значительно расширены в минимальном диаметре и короче в максимальном диаметре, распределены по цитоплазме неравномерно, чаще небольшими скоплениями по внешнему краю вещества Ниссля. В нейронах третьей группы кресты, внешняя и внутренняя мембраны часто подвержены деструкции. Количество митохондрий в гиперхромных нейронах гистаминергического ядра E2 второй группы на 11%, площадь митохондрий на 44%, минимальный диаметр на 11%, форм-фактор на 20%, диаметр межмембранного пространства на 32% больше, а максимальный диаметр на 43%, фактор элонгации на 43%, количество крест на 39% меньше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы. Количество митохондрий в гиперхромных нейронах третьей группы на 6% меньше, чем в первой группе, и на 18% меньше, чем во второй группе. Площадь митохондрий гиперхромных нейронов третьей группы на 53%, минимальный диаметр на 9%, форм-фактор на 13%, диаметр межмембранного пространства в крестах на 30% больше, а максимальный диаметр на 32%, количество крест на 46% меньше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы. Фактор элонгации на 41% меньше, чем соответствующий показатель у животных контрольной группы и на 4% больше, чем во второй группе (табл.1).

**Таблица 1. – Морфометрические показатели митохондрий гиперхромных нейронов гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крысы. Ме[IQR]**

| Параметры   | Первая группа (Контроль) | Вторая группа (Ишемия) | Третья группа (ишемия/реперфузия) |
|---|--------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Площадь сечения одной митохондрии, мкм <sup>2</sup> | 0,21 [0,17] **1          | 0,31 [0,39] **1        | 0,33[0,37] **3                    |
| периметр, мкм                                       | 2,7[1,8]                 | 2,8 [1,5]              | 2,96[1,50]                        |
| минимальный диаметр, мкм                            | 0,48[0,14] **1           | 0,53[0,22] **1         | 0,52[0,23] **3                    |
| максимальный диаметр, мкм                           | 1,44[0,8] **1            | 0,81[0,31] **1         | 0,98[0,51] **3                    |
| форм-фактор (Shape Factor)                          | 0,41[0,45] *1            | 0,49[0,38] *1          | 0,47[0,38] **3                    |
| фактор элонгации (Elongation)                       | 2,85[1,7] **1            | 1,62[0,3] **1,2        | 1,69[0,54] **2,3                  |
| количество крест                                    | 13[8] **1,3              | 8[6] **1               | 7[6] **3                          |
| диаметр межмембранного пространства в крестах       | 0,022 [0,006] **1,3      | 0,029 [0,012] **1      | 0,028 [0,019] **3                 |
| Количество митохондрий в срезе нейрона              | 18[3] **1,3              | 20[4] **1,2            | 17[2] **2,3                       |

Примечание - различия достоверны, \* -  $p \leq 0,05$ ; \*\* - различия достоверны  $p \leq 0,001$ ; \*1 – различия между группами «контроль» и «ишемия»; \*2 – различия между группами «ишемия» и «ишемия/реперфузия»; \*3 – различия между группами «контроль» и «ишемия/реперфузия»

Проведенные морфометрические исследования показали, что общее количество лизосом в гиперхромных нейронах гистаминергического ядра E2 второй группы животных на 13% больше, чем у животных контрольной группы. Количество первичных лизосом в нейронах на 33% меньше, а вторичных и третичных лизосом в 2,5 раза больше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы. Общее количество лизосом в гиперхромных нейронах гистаминергического ядра E2 третьей группы животных на 25% больше, чем у животных контрольной группы. Количество первичных лизосом на 33% меньше, а вторичных и третичных лизосом в 2,5 раза больше, чем соответствующие показатели у животных контрольной группы.

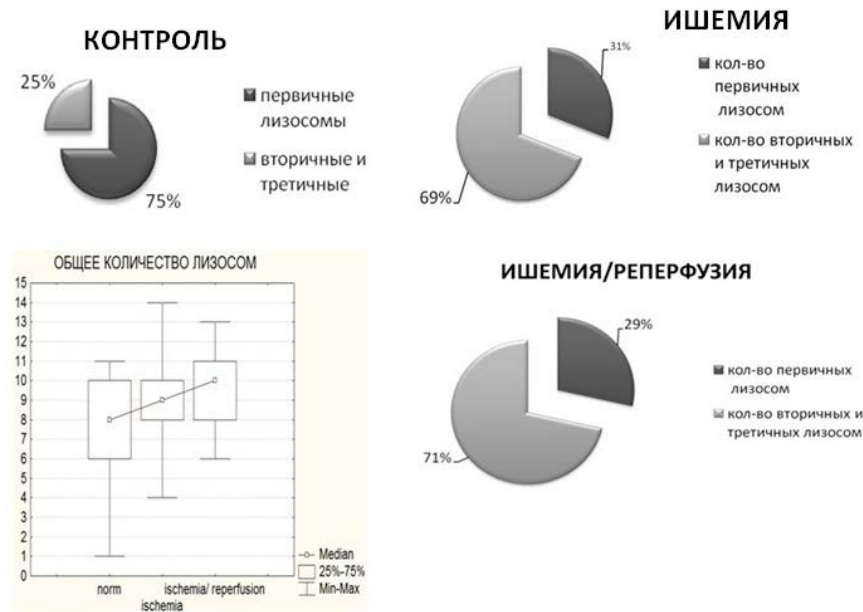


Диаграмма 1. – Количество лизосом в гиперхромных нейронах гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крысы

В цитоплазме гиперхромных нейронов гистаминергического ядра E2 второй и особенно третьей групп, по сравнению с нейронами контрольной группы, можно отметить увеличение количества слоистых образований, окруженных элементарной мембраной – мультивезикулярных телец (МВТ), содержащих округлые и эллипсоидные пузырьки, а также филаменты, гранулы, неправильной формы плотные массы и мембраны. Матрикс МВТ разный по плотности. Иногда в гиперхромных нейронах после ишемии можно встретить плотное скопление рибосом разных размеров, напоминающие ядрышко – ядрышкоподобные образования цитоплазмы.

Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры тел гиперхромных нейронов гистаминергического ядра E2 показало, что после 30-минутной субтотальной ишемии головного мозга в нейронах гистаминергического ядра E2 появляются признаки деструкции, связанные с гипоксией и стрессом, о чём свидетельствует округление митохондрий, уменьшение количества крист, расширение их межмембранного пространства, увеличение общего количества лизосом, с преобладанием вторичных и третичных лизосом. К признакам, подтверждающим наличие деструктивного процесса в нейронах можно отнести и расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети и комплекса Гольджи, однако это явление можно рассматривать и как активацию синтетической деятельности гистаминергических

### Литература

1. Зиматкин, С. М. Гистохимические особенности нейронов гистаминергических ядер гипоталамуса крысы / С. М. Зиматкин, В. Б. Кузнецова // Новости медико-биологических наук НАН Беларуси. - 2004. - №2. С.62-66.
2. Максимович, И. Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга / И. Е. Максимович. - Гродно, 2004. - 184с.
3. Adachi, N. Anti-inflammatory action by histamine H(2) receptor stimulation is a likely mechanism responsible for the improvement / N. Adachi // Academic Journal Cerebral ischemia

### ИШЕМИЯ

■ кол-во первичных лизосом  
■ кол-во вторичных и третичных лизосом

### ИШЕМИЯ/РЕПЕРФУЗИЯ

■ кол-во первичных лизосом  
■ кол-во вторичных и третичных лизосом

нейронов. Об активации синтетической деятельности можно судить и по тому, что при сохранении площади и формы ядер нейронов гистаминергического ядра E2, увеличиваются размер ядрышек и извилистость кариолеммы, количество пор на 1 мкм кариолеммы, количество рибосом на 1 мкм внешней мембраны кариолеммы, количество рибосом на 1 мкм поверхности цистерн гранулярной эндоплазматической сети, количество свободных рибосом на 1 мкм<sup>2</sup> перикарионов, количество цистерн аппарата Гольджи, суммарная площадь всех цистерн одного КГ, количество вакуолей со стороны cis-поверхности комплекса Гольджи. В гиперхромных нейронах гистаминергического ядра E2 третьей группы (ишемия/реперфузия) преобладают признаки деструкции: отечность цитоплазмы, повреждение целостности цитолеммы, кариолеммы, митохондриальных крист, внешней и внутренней мембраны, отечность митохондрий, увеличение количества мультивезикулярных телец возможно из-за вакуолизации митохондрий вследствие разрушения крист, расширение цистерн ГрЭС. В гиперхромных нейронах третьей группы по сравнению с нейронами того же вида второй группы менее выражены признаки энергетических процессов (уменьшение количества митохондрий и их деструкция) и синтетических процессов (уменьшение количества пор в кариолемме, просветление матрикса ядрышка, групповая миграция его компонентов к кариолемме, уменьшение количества рибосом на внешней мембране кариолеммы и на поверхности ГрЭС, уменьшение количества цистерн комплекса Гольджи).

### Выводы

1. После 30-минутной субтотальной ишемии головного мозга в гиперхромных нейронах присутствуют признаки деструкции ультраструктур, вызванные гипоксией, но преобладают изменения ультраструктур нейронов, указывающие на активацию синтетических процессов.
2. В гиперхромных нейронах после 30-минутной ишемии и 30-минутной реперфузии значительно прогрессируют вызванные гипоксией признаки деструкции ультраструктур, ответственных за энергетические и синтетические процессы.

### Литература

1. Zimatkin, S. M. Gistohimicheskie osobennosti neuronov gistami-nergicheskikh yader gipotalamusa kryisy / S. M. Zimatkin, V. B. Kuznetsova // Novosti medikobio-logicheskikh nauk NAN Belarusi. - 2004. - №2. S.62-66.
2. Maksimovich, I. E. Rol oksida azota v patogeneze ishemicheskikh i reperfuzioinyih povrezhdeniy mozga / N. E. Maksimovich. - Grodno, 2004. - 184s.
3. Adachi, N. Anti-inflammatory action by histamine H(2) receptor stimulation is a likely mechanism responsible for the improvement / N. Adachi // Academic Journal Cerebral

and brain histamine. – 2005. – Vol. 50, №2. – P. 637-672.

4. Bramlett, H. M. Synuclein aggregation: possible role in traumatic brain injury / H. M. Bramlett, W.D. Dietrich // Exp Neurol. – 2003. – Vol. 184, № 1. – P. 27-30.

5. Kontos, H. Oxygen radicals in cerebral ischemia / H. Kontos // Stroke. – 2001. – Vol. 32. – P. 2712–2716.

6. Zimatkin, S. M. Spatial organization and morphometric characteristics of histaminergic neurons in the rat brain / S. M. Zimatkin, V. B. Kuznetsova, O. N. Strik // Neuroscience and Behavioral Physiology. – Vol. 36, №. 5. – 2006. – P. 55.

ischemia and brain histamine. – 2005. – Vol. 50, №2. – P. 637-672.

4. Bramlett, H. M. Synuclein aggregation: possible role in traumatic brain injury / H. M. Bramlett, W. D. Dietrich // Exp Neurol. – 2003. – Vol. 184, № 1. – P. 27-30.

5. Kontos, H. Oxygen radicals in cerebral ischemia / H. Kontos // Stroke. – 2001. – Vol. 32. – P. 2712–2716.

6. Zimatkin, S. M. Spatial organization and morphometric characteristics of histaminergic neurons in the rat brain / S. M. Zimatkin, V. B. Kuznetsova, O. N. Strik // Neuroscience and Behavioral Physiology. – Vol. 36, №. 5. – 2006. – P. 55.

## ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF NEURONS OF HISTAMINERGIC NUCLEUS E2 IN RAT HYPOTHALAMUS AFTER SUBTOTAL THIRTY-MINUTE CEREBRAL ISCHEMIA AND REPERFUSION

*Kuzniatsova V.B., Kryshchik Ye.I., Kazliakouskaya V.A.*

Educational Establishment «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

---

*The studies were conducted on 15 laboratory rats. The purpose of this research was to reveal the ultrastructural features of the neurons of the histaminergic nucleus E2 in rat brain after subtotal thirty-minute cerebral ischemia and reperfusion. It was proved that hypoxia-induced signs of destruction of the ultrastructures responsible for energy and synthetic processes progressed significantly in the hyperchromic neurons after thirty minutes of ischemia and reperfusion.*

**Key words:** ischemia, reperfusion, brain, histamine, neurons, rats

---

Адрес для корреспонденции: e-mail: verak27@mail.ru

Поступила 02.02.2015