

УДК 611.81+611-018.82): 547.781.5 (047)

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОНОВ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКОГО ЯДРА E2 ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ

С.М. Зиматкин д.б.н., профессор; В.Б. Кузнецова;

Р.И. Кравчук к.б.н.

Кафедра гистологии и ЦНИЛ ГГМУ

Исследование проведено на взрослых крысах-самцах Вистар. Описан метод подготовки образцов мозга для электронно-микроскопического исследования с использованием криостатных срезов и гистохимического контроля на MAO B, который позволяет избирательно изучать ультраструктуру мелких гистаминергических ядер гипоталамуса крысы. Дана ультрамикроскопическая характеристика нейронов гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крысы. Цитоплазма изученных нейронов богата органеллами, а в нейропиле выявляются многочисленные активные синапсы. В целом, ультраструктура нейронов гистаминергического ядра E2 хорошо коррелирует с высокой метаболической активностью, показанной ранее гистохимически, и свидетельствует об их высокой функциональной активности.

Ключевые слова: головной мозг, гистаминергические нейроны, ультраструктура.

The studies were carried out on adult Wistar rats. The method of preparation of the brain samples for electron microscopy using crioslides and histochemical control for MAO B is described. It lets to investigate specifically the fine structure of the small histaminergic nucleus of rat hypothalamus. The fine structure description of the neurons of hypothalamus histaminergic nucleus E2 is given. The cytoplasm of the neurons studied is full of organelles, in the neuropil numerous active synapses are revealed. In general, the fine structure of neurons of histaminergic nucleus E2 correlates well with the high metabolic activity of these neurons which was shown histochemically earlier and testifies their high functional activity.

Keywords: brain, histaminergic neurons, fine structure.

Гистамин – биогенный диамин, широко распространённый в тканях животных и человека. Он является биологически активным соединением, участвующим в передаче межклеточных сигналов, в том числе и в ЦНС, где он выполняет функции нейромедиатора. В головном мозге гистамин локализуется преимущественно в гистаминергических нейронах, которые локализуются только в заднем гипоталамусе, где они образуют 5 скоплений (ядер, групп E1-E5), а их отростки распространяются во все отделы мозга [9, 11, 13]. Гистамин действует на клетки-мишени через гистаминовые (H) рецепторы трёх типов, которые широко и гетерогенно распределены в мозге. Гистамин образуется в мозге из гистидина с помощью фермента гистидиндекарбоксилазы (ГДК) и инактивируется (метилируется) с помощью гистаминметилтрансферазы, а затем окисляется с помощью моноаминоксидазы типа B (MAO B) и альдегиддегидрогеназы [2, 6, 9]. Высокая активность MAOB гистохимически выявляется во всех гистаминергических нейронах гипоталамуса [3] и может служить хорошим маркером этих нейронов [1]. Центральный гистамин участвует в регуляции различных функций, систем и реакций организма: нейроэндокринной и сердечно-сосудистой систем, кровотока мозга, температуры тела, сна и бодрствования, пищевого и пить-

евого поведения, памяти и обучения, и др. Предполагается участие гистамина мозга в патогенезе многих патологических состояний и заболеваний: мышечная слабость, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, эпилепсия, морфиновая наркомания, и др. [2, 6, 9]. Всё это определяет важность исследования гистаминергической нейронной системы мозга для биологии и медицины.

В предыдущих работах для ультраструктурной характеристики гистаминергических нейронов мозга крысы использовали традиционные методы подготовки тканей. При этом в качестве маркера использовали ГДК, которую выявляли с помощью специфических антител [10, 16].

Целью настоящего исследования явилась разработка метода подготовки образцов мозга для прицельной электронной микроскопии мелких структур мозга и его использование для ультраструктурной характеристики нейронов гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крысы. Выбор ядра E2 обусловлен тем, что в нём сосредоточено больше половины всех гистаминергических нейронов мозга крысы.

Материалы и методы

Исследования проведены на 5 белых крысах – самцах Вистар в возрасте 3-4 мес., массой 190-210 г. Животных содержали в стандартных условиях

вивария, на полноценном рационе. Соблюдались все правила гуманного обращения с животными. Забой животных, находящихся под глубоким эфирным наркозом, проводили с 9⁰⁰ до 11⁰⁰ утра. После декапитации крыс вскрывали черепную коробку, 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.

Два соседних фронтальных криостатных среза гипоталамуса, толщиной 20 мкм и 60 мкм, готовили при -15°C на уровне $P \approx -3.80$ [14]. Первый срез монтировали на предметное стекло, быстро расправляли и размораживали в криостате, а затем подсушивали при комнатной температуре. В дальнейшем его окрашивали гистохимическим методом на выявление активности МАО Б [3, 5]. Второй срез в камере криостата помещали в предварительно охлажденный до +4°C 1% Os-фиксатор. После чего его извлекали из камеры криостата во флаконе с фиксатором и фиксировали дополнительно в течение 2 часов при +4°C в двух порциях 1% Os-фиксатора, приготовленного на буфере Миллонига pH 7,4 [12]. В дальнейшем, после промывки в р-ре (буфер Миллонига (pH 7,4) (20мл) + сахара (900мг)), проводили обезвоживание материала в 50% и 70% спиртах. После этого под контролем маркированного среза (окрашенного на выявление МАО Б) вырезали зоны, содержащие гистаминергическое ядро E2 гипоталамуса крысы. Далее материал выдерживали ночь при +4°C в 2% уранилацетате, растворенном в 70% спирте. Дальнейшее обезвоживание материала проводили в спиртах возрастающей концентрации, смеси ацетона и спирта, ацетоне. После обезвоживания материал заключали в заливочную смолу, с предварительным проведением через смеси смолы (Аралдит М + Аралдит Н + Дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона. Срезы изготавливали на ультрамикротоме MT-7000 (США). На окрашенных метиленовым синим полутонких срезах толщиной 0,5 мкм уточняли локализацию гистаминергического ядра E2. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом [17] и цитратом свинца [15]. При этом сеточки опускали в каплю раствора уранилацетата и выдерживали 30 мин. под темной крышкой при комнатной температуре. Затем их промывали 50% спиртом 3 сек. и в 2-х порциях бидистиллированной воды по 5 сек., и переносили в каплю контраста Реёнольдса на 10 мин. Промывали в 3-х порциях воды по 10 сек. Препараты изучали в электронном микроскопе ПЭМ-100 (Украина). Получаемое изображение препаратов фотографировали при помощи цифровой камеры Cannon S45 (Япония) с разрешением 4 мегапикселя.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что разработанный нами метод подготовки образцов мозга для электронно-микроскопического исследования с использованием криостатных срезов и гистохимического контроля на МАОБ позволяет избирательно изучать ультраструктуру нейронов мелких гистаминергических ядер гипоталамуса крысы, в частности, ядра E2 (Рис. 1). При этом ультраструктура перикарионов нейронов и нейропиля гистаминергического ядра E2 хорошо выявляется. В клетках сохраняется целостность биологических мембран клеток, в том числе во всех мембранных органеллах, включая и митохондрии. Получаемая при этом электронно-микроскопическая картина несколько уступает по качеству таковой при традиционной подготовке образцов для электронно-микроскопического исследования.

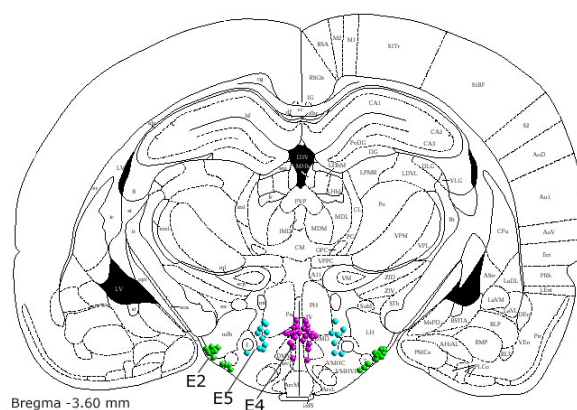


Рис. 1. Локализация гистаминергического ядра E2 на схеме фронтального среза мозга крысы [14].

В результате исследования установлено, что ядра гистаминергических нейронов крупные, располагаются в центре перикарионов, отличаются неправильной формой: чаще всего веретеновидной, реже палочковидной, иногда подковообразной. Хроматин мелкозернистый, с формированием рыхлых гранулярных скоплений в центре и более плотных на периферии ядра. Ядрышко компактное, преимущественно гранулярным компонентом, имеющее, как правило, эксцентричное положение в ядре. Мембраны, составляющие ядерную оболочку, местами смыкаются и образуют типичные поры. Небольшое количество рибосом прикрепляется к наружной поверхности ядерной оболочки.

Цитолемма нейронов гистаминергического ядра E2 крысы имеет структуру. Локальные отклонения от основной структуры плазматической мембраны встречаются в области синапсов, а также в местах образования сложных пузырьков. Цитоплазма нейронов гистаминергического ядра гипоталамуса крысы богата органеллами. Митохондрии многочисленны, овальной и круглой формы, преимуще-

ственно мелких и средних размеров, окружены двойной мембраной (наружной и внутренней) и имеют внутренний матрикс умеренной электронной плотности. Наружная мембрана митохондрий гладкая, внутренняя образует складки в виде многочисленных пластинчатых крист (рис. 1). Хорошо развиты гранулярная (ГрЭС) и гладкая (ГлЭС) эндоплазматическая сеть, цистерны которой, как правило, располагаются упорядоченно, с содержанием на наружной поверхности умеренного количества связанных рибосом. Помимо упорядоченной ГрЭС, встречаются небольшие, беспорядочно разбросанные каналы и цистерны (рис. 2). В цитоплазматическом матриксе, между мембранами ГрЭС выявляется значительное количество свободных рибосом, преимущественно в виде полисом. В цитоплазме перикарионов нейронов хорошо развит комплекс Гольджи (КГ), представленный как пластинчатыми структурами, так и большим количеством крупных и мелких вакуолей. КГ чаще всего локализуется возле ядра (рис. 2). В цитоплазме нейронов гистаминергических ядер гипоталамуса крысы встречаются многочисленные первичные лизосомы мелких размеров, заполненные гомогенным зернистым веществом равномерной плотности, и лизосомы более крупных размеров и с более гетерогенным содержимым (вторичные лизосомы), некоторые из которых содержат расположенные по периферии вакуоли низкой плотности – липидолизосомы (рис. 2). В цитоплазме нейронов часто обнаруживаются мультивезикулярные тельца. Это сферические образования, окружённые мембраной, содержащие различные количества небольших округлых или эллипсоидных мембранных пузырьков, а также другие включения, среди кото-

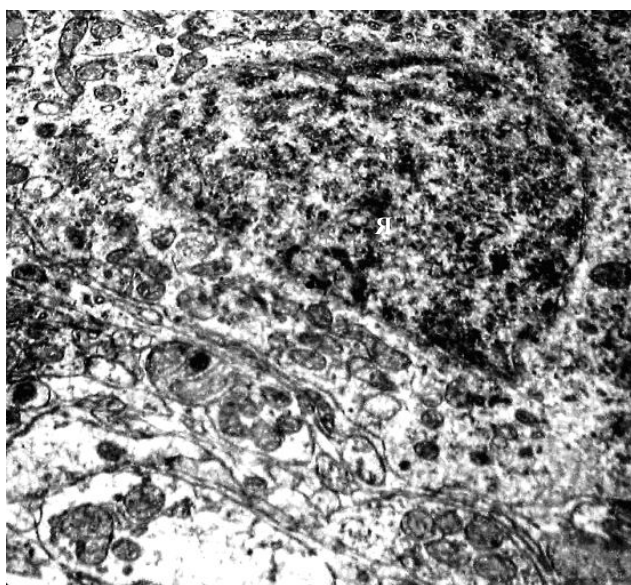


Рис. 2. Перикарион нейрона гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крысы. Выявляется крупное округлое ядро (Я), многочисленные митохондрии в цитоплазме. Цифровая электронограмма. Ув.х 7000.

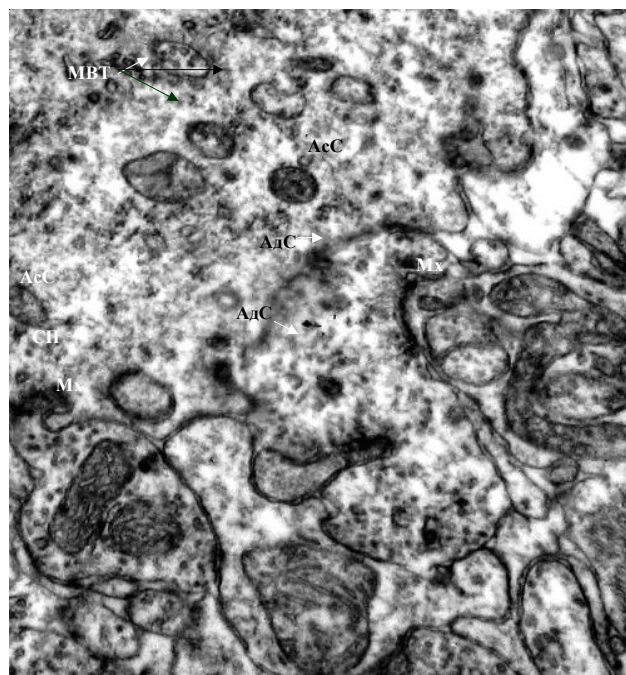


Рис. 3. Край перикариона нейрона и нейропил гистаминергического ядра E2. Видны мультивезикулярные тельца (МВТ), аксосоматические (АсС) и аксодендритические (АдС) синапсы с синаптическими пузырьками (СП) и крупными митохондриями (Мх). Цифровая электронограмма. Ув.х 22000

рых регистрируются гранулы, филаменты, электронно-плотные массы и мембраны (рис. 3).

В нейропиле гистаминергических ядер гипоталамуса крысы встречаются немногочисленные миелиновые нервные волокна, большое количество фрагментов дендритов, не покрытых миелиновой оболочкой, окруженных глиальными клетками: олигодендроцитами и отростками астроцитов. Часто выявляются отростки астроцитов, цитоплазма которых обладает низкой электронной плотностью. При изучении синаптического аппарата гистаминергических нейронов хорошо определяются аксосоматические, аксо-дендритические и, изредка, аксо-аксональные синапсы (рис. 3). В аксо-соматических синапсах пост- и пресинаптические мембраны имеют одинаковую толщину. Синаптическая щель равна расстоянию между мембранами соседних с областью синапса участков (рис. 3). Два эти признака позволяют отнести аксо-соматические синапсы, характерные для гистаминергических нейронов, ко II типу межнейрональных контактов по строению синаптических мембран [8] или симметричным межнейрональным контактам [7]. Синаптические пузырьки в этих синапсах светлые (незначительно осмиофильны по сравнению с окружающей цитоплазмой), округлые, крупные ($\approx 80-120$ нм), распределены по всей площади просвета аксона. Небольшое количество пузырьков (8-20) находится у пресинаптической мембраны. В аксодендритических синапсах постсинаптическая мембрана толще пресинаптической, утолщение постсинаптической мембраны представлено субси-

наптической сетью, скоплением электронно-плотных точечных и нитевидных субстанций. При этом межсинаптическая щель больше, чем расстояние между мембранами соседних с областью синапса участков. Вышеперечисленные признаки позволяют отнести аксо-дендритические синапсы, характерные для гистаминергических нейронов, к I типу межнейрональных контактов [8] или асимметричным межнейрональным контактам [7]. Синаптические пузырьки в этих синапсах такие же, как в аксо-дендритических синапсах. Немногочисленные аксо-аксональные синапсы по строению синаптических мембран относятся ко II типу межнейрональных контактов [8] или к симметричным межнейрональным контактам [7].

Представленная нами электронно-микроскопическая картина в целом не отличается от таковой, описанной другими исследователями с использованием других маркеров гистаминергических нейронов [10, 18, 16], а также группы E1 [18] и E4 [18, 10]. Ультраструктура нейронов гистаминергического ядра E2 хорошо коррелирует с высокой метаболической активностью этих нейронов, выявленных в нашем предыдущем исследовании гистохимически [4]. В частности, высокой активности маркерных ферментов митохондрий, сукцинатдегидрогеназы и MAO, соответствует большое количество митохондрий в их цитоплазме, а высокой активности дегидрогеназы восстановленного НАДФ – развитая цитоплазматическая сеть.

Заключение

Предложенный метод подготовки образцов мозга для электронно-микроскопического исследования с использованием криостатных срезов и гистохимического контроля на MAO B позволяет избирательно изучать ультраструктуру мелких гистаминергических ядер гипоталамуса крысы.

Дана ультрамикроскопическая характеристика нейронов гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крысы. Ядра этих нейронов складчатые, содержат мелкозернистый хроматин и ядрышко, прилежащее к ядерной оболочке, имеющей много пор. Цитоплазма изученных нейронов богата органеллами, а в нейропиле выявляются многочисленные активные синапсы. В целом, ультраструктура нейронов гистаминергического ядра E2 хорошо коррелирует с высокой метаболической активностью этих нейронов, показанной гистохимически, и свидетельствует об их высокой функциональной активности.

Литература

1. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Анищик О.В. Гистаминергическая нейронная система мозга // Морфология. – 2003. - Т. 123, Вып. 2. - С. 97-105.
2. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Стрик О.Н., Виноградова Л.Е., Лис Р.Е. Структурно-метаболическая характеристика гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы // Труды Гродненского госу-

- дарственного медицинского университета (к 45-летию университета). – Гродно: ГрГМУ, 2003. - С. 24-26.
3. Зиматкин С.М., Цыдик В.Ф. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге. // Морфология. - 1994. - Т. 106, № 4-6. - С. 157-161.
4. Кузнецова В.Б., Виноградова Л.Е., Зиматкин С.М. Гистохимическая характеристика гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы. // Анатомическая конференция. - Гродно: ГГМУ, 2003. - С. 105-106.
5. Цыдик В.Ф., Зиматкин С.М., Лелевич В.В. Топографическое распределение моноаминоксидаз А и В в мозге крысы. Развитие и морфологические аспекты нейроэндокринных и нейротканых отношений в организме. - Минск, 1998. - С. 68-70.
6. Brown R.E., David R. Stevens, Helmut L. Haas. The physiology of brain histamin. // Progress in Neurobiology. - 2001. - V. 63. - P. 1-35.
7. Collonier M. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. // Brain Res. - 1969. - V. 15. - P. 548-551.
8. Gray E.G. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. // J. Anat. (Lond.). - 1959. - V. 93. - P. 420-423.
9. Haas H. and Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. // Nat. Rev. Neurosci. - 2003. - V. 4 (2). - P. 121-130.
10. Hayashi H., Takagi H., Takeda N., Kubota Y., Tohyama M., Watanabe T. and Wada H. Fine structure of histaminergic neurons in the caudal magnocellular nucleus of the rat as demonstrated by immunocytochemistry using histidine decarboxylase as a marker. // J. Comp. Neurol. - 1984. - V. 229. - P. 233-245.
11. Inagaki N., Toda K., Taniuchi I., Panula P., Yamatodani A., Tohyama M., Watanabe T. and Wada H. The five subgroups of the tuberomammillary nucleus of the rat: an analysis of the histaminergic efferent projections to the medial preoptic area and inferior colliculus. // Exp. Brain Res. - 1990. - V. 80. - P. 374-380.
12. Millonig G. Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions in fixation. // J. Appl. Physics. - 1961. - V. 32. - P. 1637-1643.
13. Panula P., Airaksinen M.S., Pirvola U., Kotilainen E. A histamine-containing neuronal system in human brain. // Neurosciencie. - 1990. - V. 34. - P. 127-132.
14. Paxinos G., Watson C., The rat brain in stereotaxic coordinates. Compact third edition CD-ROM. Academic press, New York, 1997.
15. Reynolds E. S., The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. // J. Cell Biol. - 1963. - V. 17. - P. 208-212.
16. Tohyama M., Tamiya R., Inagaki N., Takagi H. Morphology of histaminergic neurons with histidine decarboxylase as a marker., Histaminergic neurones: morphology and function. // Ed. Watanabe, T., Wada, H., CRC Press. - 1991. - P. 107-126.
17. Watson M. L., Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. // J. Biophys. Biochem. Cyt. - 1958. - V. 4. - P. 475-478.
18. Wouterlood F. G., Sauren T. M. H. F. and Steinbusch H. W. M. Histaminergic neurones in the rat brain: correlative immunocytochemistry, Golgi impregnation, and electron microscopy. // J. Comp. Neurol. - 1986. - V. 252. - P. 227-244.

Resume

ELECTRON MICROSCOPY STUDIES OF NEURONS OF HISTAMINERGIC NUCLEUS E2 OF RAT HYPOTHALAMUS

S.M.Zimatkin, V.B.Kuznetsova, R.I.Kravchuk.

The method of preparation of the brain samples for electron microscopy using crioslides and histochemical control for MAO B is described. It lets to investigate specifically the fine structure of the small histaminergic nucleus of rat hypothalamus. The fine structure description of the neurons of hypothalamus histaminergic nucleus E2 is given. The cytoplasm of the neurons studied is full of organelles, in the neuropil numerous active synapses are revealed. In general, the fine structure of neurons of histaminergic nucleus E2 correlates well with the high metabolic activity of these neurons which was shown histochemically earlier and testifies their high functional activity.