

УДК 616.831-005.4:616.831.4:616.8-091.81-018-092.9

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ ПОСЛЕ СУБТОТАЛЬНОЙ ТРИДЦАТИМИНУТНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В.Б. Кузнецова, Е.И. Криштофик

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Исследования проведены на 12 лабораторных крысах, с целью выявить морфометрические особенности нейронов гистаминергических ядер и гистохимические особенности ядра E2 в условиях субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга. Установлено, что в условиях субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга нейроны ядра E5 уменьшаются в размере, размеры нейронов других гистаминергических ядер не меняются. Форма нейронов и параметры ядер нейронов всех гистаминергических ядер не изменяются. В гистаминергическом ядре E2 окислительный метаболизм, энергетическое обеспечение процессов биосинтеза гистамина и окислительное дезаминирование гистамина усиливается.

Ключевые слова: ишемия, головной мозг, гистамин, нейроны, крысы

Введение. Ишемические заболевания головного мозга, благодаря высокой распространенности и неблагоприятному прогнозу, являются приоритетными для медицины. Церебральная ишемия провоцирует ферментативные процессы, приводящие к нейрональным повреждениям. Гистамин снижает силу повреждений, вызванных ишемией, через гистаминовые H_1 рецепторы, если вводится перед индукцией ишемии. Постишемическое введение гистидина, предшественника гистамина и антагониста H_3 рецепторов тиоперамида смягчает как последствия инфаркта мозга, так и отдаленно гибель нейронов. Высвобождение гистамина из нервных окончаний гистаминергических нейронов усиливается во время ишемии [5].

Гистамин - биогенный диамин, участвующий в передаче межклеточных сигналов, в том числе и в головном мозге, где он выполняет функции нейромедиатора. В головном мозге гистамин локализуется главным образом в гистаминергических нейронах; небольшое количество гистамина находится в тучных клетках рыхлой соединительной ткани [7].

Центральный гистамин участвует в регуляции различных функций, систем и реакций организма. Предполагается участие центрального гистамина в патогенезе многих патологических состояний и заболеваний: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, эпилепсия, морфиновая наркомания и др. [7].

Гистамин в ЦНС действует через три типа рецепторов: H_1 , H_2 (постсинаптические) и H_3 (пресинаптические авторецепторы, опосредующие аутоингибирование синтеза и выделения гистамина) [7]. Гистаминовые рецепторы широко и гетерогенно распределены в мозге и периферических тканях и принадлежат к семейству рецепторов, связанных с G-белками [7].

Гистамин синтезируется в организме из L-гистидина с помощью фермента гистидиндекарбоксилазы (ГДК). Специфические и эффективные системы обратного захвата гистамина в ЦНС не обнаружены. В мозге гистамин метаболизируется ферментом гистамин-N-метилтрансферазой в теле-метилгистамин, который затем превращается с помощью моноаминоксидазы типа Б (МАО Б) в N-теле-метилимидазолацетальдегид, а затем с помощью фермента альдегиддегидрогеназы в N-теле-метилимидазолуксую кислоту.

Биохимические и электрофизиологические исследования, методы перерезки мозга и введения метки доказали существование центральной гистаминергической нейронной системы с расположением тел гистаминергических

нейронов и единственного места синтеза нейронального гистамина в заднем гипоталамусе [6]. Общий объем скоплений перикарионов гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы (гистаминергических ядер) составляет около 0,5 мм³. В порядке убывания размеров отдельные гистаминергические ядра располагаются следующим образом: E2 > E4 > E3 > E5 > E1 [3]. Большая часть нейронов (54%) сосредоточена в ядре E2. Нейроны различных гистаминергических ядер отличаются по форме и метаболически гетерогенны. Активность ферментов (дегидрогеназ и МАО Б) в нейронах ядра E2 максимальна. Нейроны внутри каждого гистаминергического ядра также неоднородны по интенсивности окислительного метаболизма [2, 4, 8].

На основании всего вышесказанного можно заключить: а) гистамин снижает силу повреждений, вызванных ишемией; б) гистамин играет роль нейротрансмиттера в мозге млекопитающих; в) в головном мозге гистамин локализуется преимущественно в гистаминергических нейронах; г) высвобождение гистамина из нервных окончаний гистаминергических нейронов усиливается во время ишемии. Однако структурно-метаболическое состояние гистаминергических нейронов при ишемии головного мозга не изучено.

Цель исследования - дать морфометрическую характеристику нейронов гистаминергических ядер мозга крысы, выявить гистохимические особенности нейронов гистаминергического ядра E2 (как наиболее репрезентативного) в условиях субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга.

Материалы и методы. Исследования проведены на 12-ти 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 крысы и человека. Первую группу животных составили контрольные крысы (n=6), вторую группу - крысы с субтотальной тридцатиминутной ишемией головного мозга (n=6). Ишемию головного мозга моделировали путем 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, проводили у опытных животных сра-

зу по истечении 30-минутной ишемии, у контрольных через 30 минут после ложной операции, с 9⁰⁰ до 11⁰⁰ утра. Быстро 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. Во всех исследованиях в каждой экспериментальной группе использовали не менее 5 животных с количественной оценкой не менее пяти нейронов в срезах каждого гистаминаргического ядра гипоталамуса животного. Это обеспечило достаточный объём выборки для последующего количественного анализа.

Для морфологических и гистохимических исследований серийные криостатные срезы гипоталамуса крысы толщиной 20 мкм окрашивали по Ниссию и на выявление активности оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса сукцинатдегидрогеназы (СДГ); с гликолизом лактатдегидрогеназы (ЛДГ); с пентозофосфатным путем глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г-6-Ф), дегидрогеназы восстановленного НАДФ (НАДФН ДГ). Параллельно на соседних срезах изучали активность моноаминоксидазы типа Б (МАО Б) [1], ключевого фермента метаболизма гистамина, которая служила маркером гистаминаргических нейронов [4, 8].

Препараты изучались при помощи светового микроскопа Biolag (Германия). С помощью компьютерного анализатора изображения "Биоскан" были определены размеры нейронов гистаминаргических ядер гипоталамуса. Для количественной оценки активности изучаемых ферментов проводили цитофотометрию всех гистохимических препаратов.

Результаты морфометрических и гистохимических исследований обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows.

Результаты исследований и обсуждение

Морфометрические исследования гистаминаргических нейронов мозга крысы показали, что в условиях субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга статистически достоверные изменения отмечены в ядрах E5: уменьшение площади тел нейронов на 26% ($z=2,81$; $p<0,05$), периметра на 13% ($z=2,62$; $p<0,05$), минимального диаметра на 19% ($z=2,03$; $p<0,05$), максимального диаметра на 14% ($z=2,06$; $p<0,05$) и E2 уменьшение максимального диаметра тел нейронов на 12% ($z=2,33$; $p<0,05$) (рис. 1)

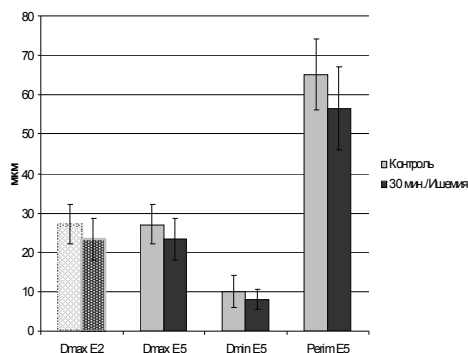
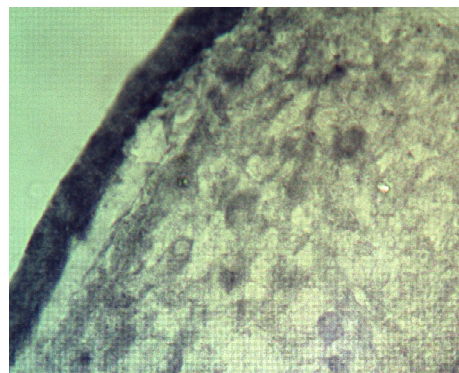


Рисунок 1 - Размеры тел нейронов в E2, E5 гистаминаргических ядрах гипоталамуса крысы в норме, контроле, и после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга

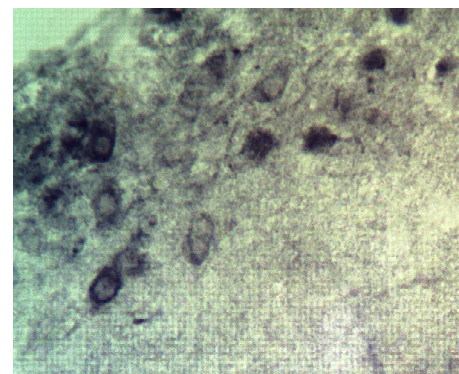
Морфометрические исследования ядер нейронов гистаминаргических E1-E5 ядер мозга крысы после суб-

тотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга показали, что площадь, максимальный и минимальный диаметры, форм-фактор, фактор элонгации не выявили статистически значимых изменений у опытных животных по сравнению с контрольной группой.

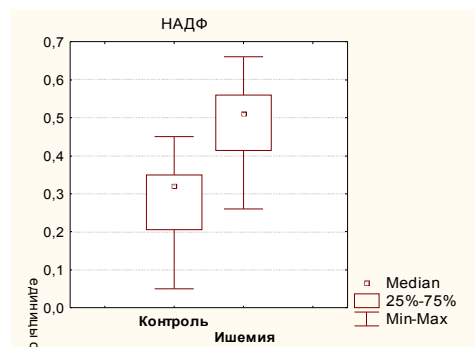
Гистохимические исследования нейронов ядра E2 гистаминаргической системы в мозге крысы показали, что по активности НАДФ и Г-6-Ф ДГ внемитохондриальные энергетические процессы после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга усиливаются (НАДФ ДГ на 59% ($z=-8,09$; $p<0,05$); Г-6-Ф ДГ на 36% ($z=-8,14$; $p<0,05$) (рис. 2 и 3).



А



Б



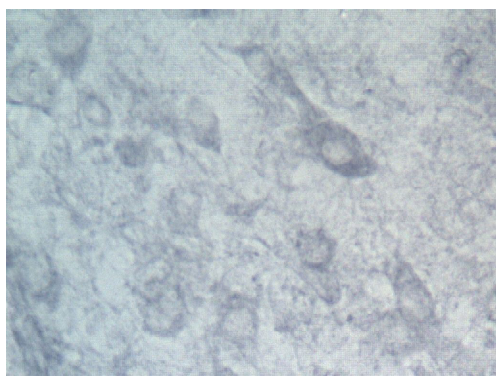
В

А. Контроль. Фронтальный срез в области задне-базального гипоталамуса крысы ($P=-4.30$ mm). Об.х40. Цифровая микрофотография.

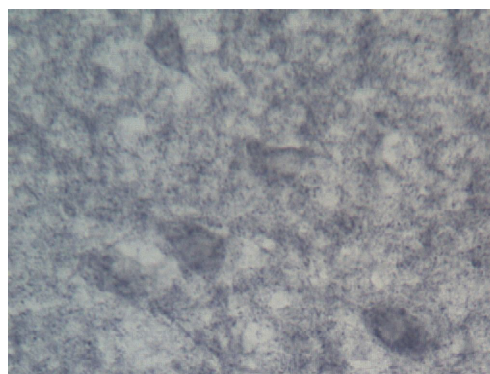
Б. Опыт - после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга. Фронтальный срез в области задне-базального гипоталамуса крысы ($P=-4.30$ mm). Об.х40. Цифровая микрофотография.

В. Диаграмма - активность НАДФ ДГ в нейронах гистаминаргического ядра E2 мозга крысы (в единицах оптической плотности).

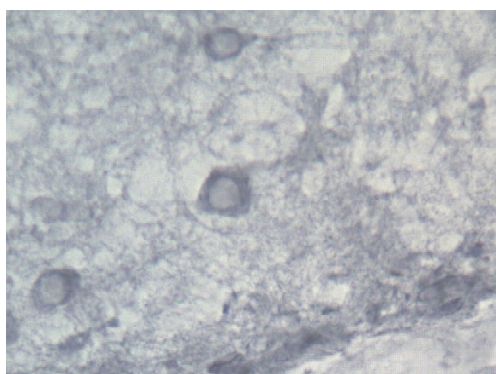
Рисунок 2 - Активность НАДФ ДГ в нейронах гистаминаргического ядра E2 мозга крысы (в единицах оптической плотности)



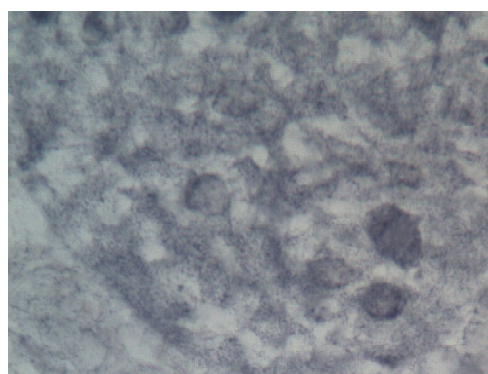
А



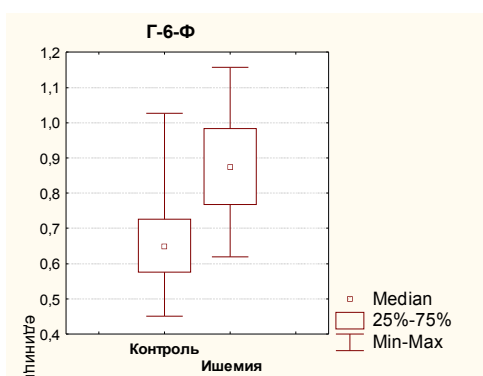
А



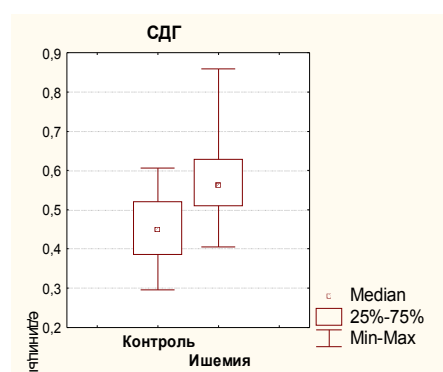
Б



Б



В



В

А. Контроль. Фронтальный срез в области задне-базального гипоталамуса крысы (P=-4.30 mm). Об.х20. Цифровая микрофотография.

Б. Опыт - после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга. Фронтальный срез в области задне-базального гипоталамуса крысы (P=-4.30 mm). Об.х20. Цифровая микрофотография.

В. Диаграмма - активность Г-6-Ф ДГ в нейронах гистаминергического ядра E2 мозга крысы (в единицах оптической плотности).

Рисунок 3 - Активность Г-6-Ф ДГ в нейронах гистаминергического ядра E2 мозга крысы (в единицах оптической плотности)

А. Контроль. Фронтальный срез в области задне-базального гипоталамуса крысы (P=-4.30 mm). Об.х40. Цифровая микрофотография.

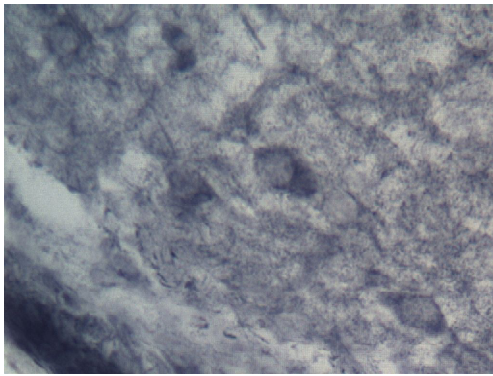
Б. Опыт - после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга. Фронтальный срез в области задне-базального гипоталамуса крысы (P=-4.30 mm). Об.х40. Цифровая микрофотография.

В. Диаграмма - активность СДГ в нейронах гистаминергического ядра E2 мозга крысы (в единицах оптической плотности).

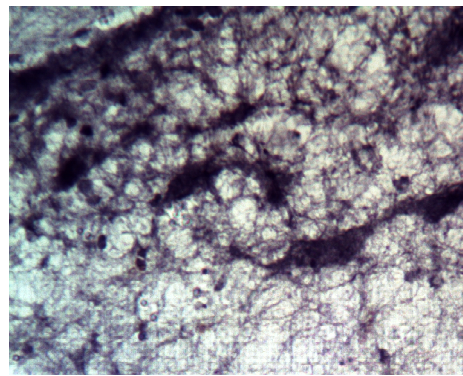
Рисунок 4 - Активность СДГ в нейронах гистаминергического ядра E2 мозга крысы (в единицах оптической плотности)

Митохондриальные энергетические процессы (по активности СДГ) также усиливаются на 24% ($z=-7,64$; $p<0,05$) (табл. 2). Также на 31% ($z=-9,2$; $p<0,05$) увеличива-

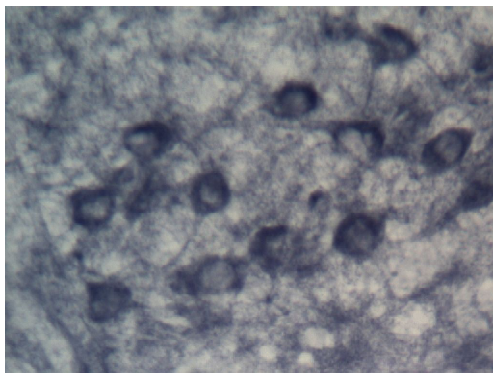
ется активность ЛДГ, которая является одним из ключевых ферментов поздних этапов гликолиза, протекающих в анаэробных условиях (рис. 4 и 5).



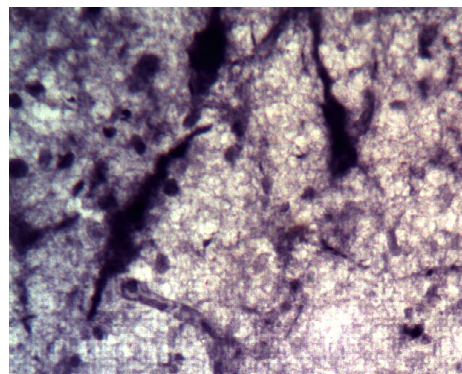
А



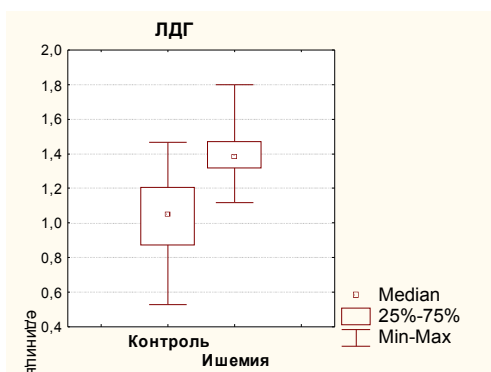
А



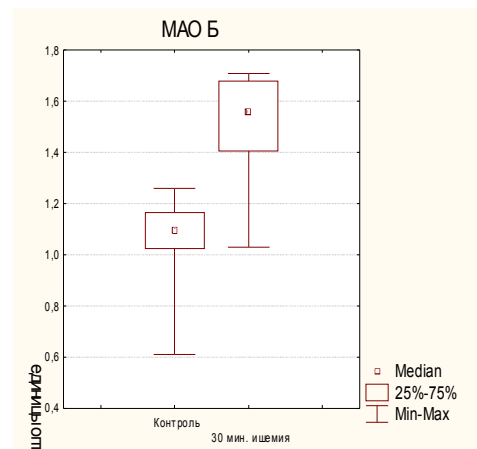
Б



Б



В



В

А. Контроль. Фронтальный срез в области задне-базального гипоталамуса крысы (P=-4.30 mm). Об.х40. Цифровая микрофотография.

Б. Опыт - после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга. Фронтальный срез в области задне-базального гипоталамуса крысы (P=-4.30 mm). Об.х40. Цифровая микрофотография.

В. Диаграмма - активность ЛДГ в нейронах гистаминергического ядра E2 мозга крысы (в единицах оптической плотности).

Рисунок 5 - Активность ЛДГ в нейронах гистаминергического ядра E2 мозга крысы (в единицах оптической плотности)

МАО Б	Me	Min	Max	L	Up	IQR
Контроль	1,10	0,61	1,26	1,03	1,17	0,14
Ишемия	1,56	1,03	1,71	1,41	1,68	0,28

А. Контроль. Фронтальный срез в области задне-базального гипоталамуса крысы (P=-4.30 mm). Об.х40. Цифровая микрофотография.

Б. Опыт - после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга. Фронтальный срез в области задне-базального гипоталамуса крысы (P=-4.30 mm). Об.х40. Цифровая микрофотография.

В. Диаграмма - активность MAOB в нейронах гистаминергического ядра E2 мозга крысы (в единицах оптической плотности).

Рисунок 6 - Активность MAOB в нейронах гистаминергического ядра E2 мозга крысы (в единицах оптической плотности)

Активность МАО Б, ключевого фермента метаболизма гистамина, статистически значимо (на 42%) выше ($z=-9,98$; $p<0,05$), чем в контроле (рис. 6).

Следовательно после субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга в нейронах гистаминергического ядра E2 энергетические и синтетические процессы, а также процессы окислительного дезаминирования гистамина усиливаются.

Выводы

1. В условиях субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга нейроны ядра E5 уменьшаются в размере, нейроны ядра E2 уменьшаются лишь в максимальном диаметре, размеры нейронов других гистаминергических ядер не меняются. Форма нейронов и параметры ядер нейронов всех гистаминергических ядер не изменяются.

2. Размеры и форма гистаминергических нейронов E1, E2, E3, E4 ядер не меняются в условиях субтотальной тридцатиминутной ишемии головного мозга, при этом в гистаминергическом ядре E2 окислительный метаболизм, энергетическое обеспечение процессов биосинтеза гистамина и окислительное дезаминирование гистамина усиливается.

Литература

1. Зиматкин, С.М. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге крысы / С.М. Зиматкин, В.Ф. Цыдик // Морфология. 1994. № 4. С. 157-161.

2. 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.

3. Зиматкин, С.М. Пространственная организация и морфометрическая характеристика гистаминергических нейронов мозга крысы / С.М. Зиматкин, В.Б. Кузнецова, О.Н. Стрик // Морфология. 2005. Т. 127, № 2. С. 27-30.

4. Кузнецова, В.Б. Активность моноаминоксидазы Б и де-гидрогеназ в нейронах гистаминергических ядер мозга крысы / В.Б. Кузнецова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2004. № 2. С. 39-42.

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

6. 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 / N.Inagaki [et al.] // Exp. Brain Res. 1990. Vol. 80. P. 374-380.

7. Panula, P. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus / P. Panula, Y. Yang // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984. Vol. 81. P. 2572-2576.

8. 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. 2006. Vol. 36, №. 5. P. 55.

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE HISTAMINERGIC NEURONS OF THE RATS HYPOTHALAMUS AFTER SUBTOTAL THIRTY MINUTE CEREBRAL ISCHEMIA

V.B. Kuznetsova, E.I. Krishtofik

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

Investigations were conducted on 12 laboratory rats. The purpose of this study is to identify the histochemical and morphometric features of neuronal histaminergic nucleus E2 in rat brain subtotal thirty minute cerebral ischemia. It was established that in conditions of a thirty minute subtotal ischemia of the brain neurons of the nucleus E5 reduced in size, the size of histaminergic neurons of other nuclei did not change. The shape of the nuclei of neurons and neuronal specification of histaminergic nuclei do not change. In histaminergic nucleus E2 oxidative metabolism, energy supply of the process of biosynthesis of histamine and oxidative deamination of histamine increased.

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

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

Поступила 05.03.2013