

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ МОЗГА 45-СУТОЧНОГО ПОТОМСТВА КРЫС, ПОТРЕБЛЯВШИХ ЭТАНОЛ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Заерко А. В. (*wersall_91@mail.ru*), Федина Е. М. (*phedina.katerina@mail.ru*),
Зиматкин С. М. (*smzimatkin@mail.ru*)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Введение. Потребление алкоголя матерью в период беременности нарушает строение и функции головного мозга потомства. Гистаминергические нейроны гипоталамуса при этом не изучались.

Цель исследования. Оценка морфофункционального состояния гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса 45-суточного потомства крыс, потреблявших алкоголь в период беременности.

Материал и методы. Опыты выполнены на самках беспородных белых крыс, потреблявших 15% раствор этанола в период беременности, и их 45-суточном потомстве с применением гистологических, гистохимических, морфо- и цитофотометрических, статистических методов исследования.

Результаты. У крыс опытной группы наблюдается уменьшение размеров тел гистаминергических нейронов, снижение активности сукцинатдегидрогеназы и моноаминоксидазы типа Б, повышение активности кислой фосфатазы, дегидрогеназ лактата и глюкозо-6-фосфата.

Выводы. Потребление алкоголя самками крыс на протяжении всей беременности нарушает структуру и метаболизм развивающихся гистаминергических нейронов гипоталамуса их потомства.

Ключевые слова: гистаминергические нейроны, этанол, постнатальное развитие.

Введение

В связи с широким распространением потребления алкоголя среди женщин детородного возраста проблема нарушений у потомства, вызванных антенатальным воздействием алкоголя, представляется важной и актуальной, особенно в связи с необходимостью улучшения демографической ситуации в нашей республике [1]. Множественные и разнообразные эффекты этилового спирта на центральную нервную систему не оставляют сомнений в его негативном влиянии на функции основных нейромедиаторных систем. В этом отношении особый интерес представляет гистаминергическая система, поскольку пути метаболизма гистамина и этанола в головном мозге имеют общий фермент – альдегиддегидрогеназу, что является метаболической основой для их взаимодействия в ЦНС [2, 3].

Гистаминергические нейроны играют важную роль в регуляции многих функций, систем и реакций организма: нейроэндокринной и сердечно-сосудистой, кровотока мозга, температуры тела, сна и бодрствования, пищевого и питьевого поведения, памяти и обучения [4]. Предполагается участие центрального гистамина в патогенезе многих патологических состояний и заболеваний: мышечная слабость, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, эпилепсия, морфиновая наркомания, алкоголизм и др. Известна высокая чувствительность развивающегося мозга к алкоголю [5, 6]. Однако изучение постнатального развития гистаминергических нейронов у потомства крыс, потреблявших этанол в период беременности, не проводилось, что определяет важность и актуальность настоящего исследования.

Цель: оценка морфофункционального состояния гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса 45-суточного потомства крыс, потреблявших алкоголь в период беременности.

Материал и методы

Опыты выполнены на 12 самках беспородных белых крыс с начальной массой 230 ± 20 г и их потомстве. Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 30.01.2018). Самки опытной группы на протяжении беременности потребляли 15% раствор этанола в качестве единственного источника питья, самкам контрольной группы предлагалась вода. После родов все самки получали в качестве питья только воду. Декапитация крысят (всего 12) осуществлялась на 45-е сутки после рождения, быстро извлекали головной мозг, вырезали гипоталамус и замораживали его в парах жидкого азота. В криостате Leica CM 1850 (Leica Microsystems GmbH, Германия) готовили серийные фронтальные срезы заднего гипоталамуса толщиной 12 мкм, часть из которых окрашивали по методу Ниссля (0,1% водным раствором тионина) для оценки строения гистаминергических нейронов, остальные срезы обрабатывали на выявление активности оксидоредуктаз, связанных: с циклом Кребса – сукцинатдегидрогеназы (СДГ), с гликолизом – лактатдегидрогеназы (ЛДГ), с пентозофосфатным путем – глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-ф-ДГ), моноаминоксидазы типа Б (МАО Б) – ключевого фермента метаболизма гистамина и маркера гистаминергических нейронов мозга, а также на выявление активности кислой фосфатазы (КФ) – маркерного фермента лизосом. При идентификации исследуемого ядра E2 гистаминергической нейронной системы мозга крысы использовали соответствующие топографические схемы [1].

Гистологические и гистохимические препараты изучали, фотографировали и анализировали с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), встроенной цифровой видеокамеры Leica (DFC 320, Германия) при увеличении объектива микроскопа $\times 40$, а также программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). В каждой экспериментальной группе в ядре E2 гипоталамуса оценивали не менее 120-150 нейронов, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа.

В исследуемой популяции гистаминергических нейронов ядра E2 проводили анализ типов клеток по степени хромотофилии (интенсивности окраски) цитоплазмы, выявляя нормохромные (умеренное окрашивание), гипохромные (слабое окрашивание), гиперхромные (интенсивное окрашивание) нейроны и клетки-тени (очень слабое окрашивание). Количественную оценку размеров и формы гистаминергических нейронов проводили на окрашенных по методу Ниссля микропрепаратах, обводя курсором контуры перикарионов нейронов, с получением следующих параметров: минимального и максимального диаметров, периметра, площади, объема нейронов, форм-фактора и фактора элонгации. Цитофотометрическое исследование проводили, определяя оптическую плотность полученного осадка хромогена в цитоплазме нейронов на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакции.

Полученные данные обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Количественные результаты представляли в виде «Me (LQ; UQ)», где Me – медиана, LQ – верхняя граница нижнего квартиля, UQ – нижняя граница верхнего квартиля. Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test). Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,05$, где p – критическое значение уровня значимости).

Результаты и обсуждение

При анализе гистаминергических нейронов по степени хромотофилии цитоплазмы обнаружено уменьшение количества нормохромных нейронов на 3,80% ($p=0,037$) и возрастание числа клеток-теней на 55,01% ($p=0,012$) в опытной группе (рис. 1, табл. 1), что свидетельствует о долгосрочных нарушениях структуры гистаминергических нейронов после антенатальной алкоголизации.

В частности, увеличение числа клеток-теней свидетельствует о тяжелых изменениях нейронов.

У потомства крыс, потреблявших алкоголь в период беременности, в гистаминергических нейронах мозга обнаружено уменьшение периметра, площади и объема перикарионов гистаминергических нейронов на 25,70% ($p=0,012$),

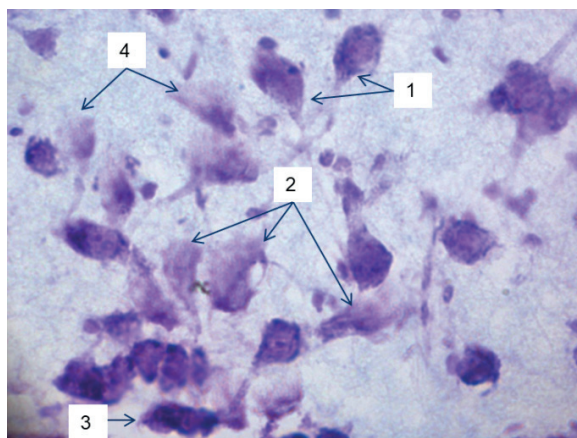


Рисунок 1. – Гистаминергические нейроны ядра E2 гипоталамуса у опытных крыс по степени хромотофилии цитоплазмы

Окраска по методу Ниссля.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

1 – нормохромные нейроны; 2 – гипохромные нейроны; 3 – гиперхромные нейроны; 4 – клетки-тени

Таблица 1. – Количество (в %) разных типов гистаминергических нейронов по степени хромотофилии цитоплазмы крыс после антенатальной алкоголизации, окраска по методу Ниссля (Me (LQ; UQ))

Тип нейронов	Контроль (n=6)	Опыт (n=6)
Нормохромные нейроны	70,97 (69,77; 77,08)	68,27 (62,26; 68,42)*
Гипохромные нейроны	18,60 (13,79; 20,41)	18,95 (18,18; 19,81)
Гиперхромные нейроны	4,65 (3,45; 5,10)	5,77 (1,05; 6,38)
Клетки-тени	5,21 (5,17; 6,12)	11,58 (10,58; 12,12)*

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем

17,30% ($p=0,037$) и 35,95% ($p=0,037$), соответственно. Кроме того, в опытной группе животных наблюдается тенденция к уменьшению максимального диаметра (на 10,39% при $p=0,060$) и увеличению форм-фактора (на 8,11% при $p=0,060$) (табл. 2), что, возможно, свидетельствует о торможении роста тел и некотором увеличении сферичности гистаминергических нейронов у крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию.

У 45-суточного потомства крыс, потреблявших алкоголь в период беременности, в цитоплазме перикарионов гистаминергических нейронов происходят разнонаправленные изменения ферментативной активности. Так, у крыс опытной группы наблюдается снижение активности маркерного фермента митохондрий СДГ на 27,04% ($p=0,021$) и возрастание активности ЛДГ на 19,4% ($p=0,014$), отражающее компенсаторное усиление активности анаэробного гликолиза. Кроме того, у 45-суточных крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию, в гистаминергических нейронах мозга происхо-

Таблица 2. – Показатели размеров и формы перикарионов гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крыс после антенатальной алкоголизации, окраска по методу Ниссля (Me (LQ; UQ))

Параметры	Контроль (n=6)	Опыт (n=6)
Минимальный диаметр, мкм	11,94 (11,87; 13,33)	11,23 (10,81; 11,24)
Максимальный диаметр, мкм	20,31 (19,97; 21,73)	18,20 (17,70; 19,56)
Периметр, мкм	62,20 (61,09; 63,02)	51,44 (50,55; 52,72)*
Площадь, мкм ²	199,28 (181,40; 214,14)	148,07 (142,48; 149,29)*
Объем, мкм ³	2116,75 (1838,36; 2357,87)	1355,73 (1279; 1372,52)*
Форм-фактор	0,68 (0,68; 0,70)	0,74 (0,73; 0,75)
Фактор элонгации	1,63 (1,59; 1,73)	1,60 (1,58; 1,71)

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем

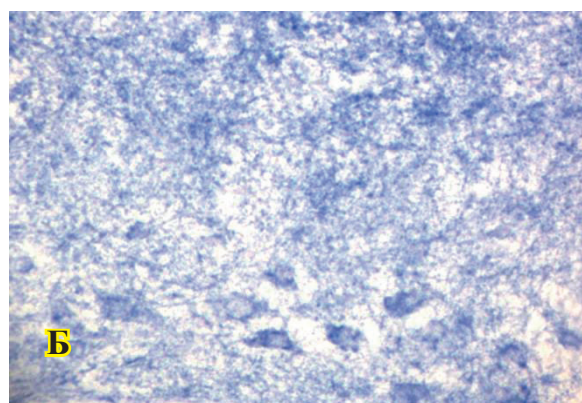
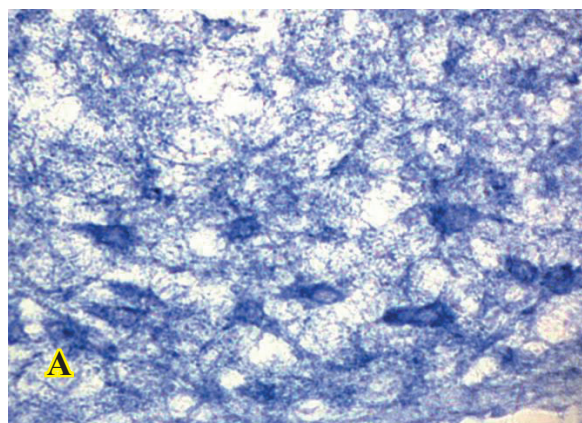


Рисунок 2. – Активность СДГ в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса контрольных крыс (А) и её снижение в цитоплазме нейронов у крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию (Б)

Окраска по Нахласу и др.

Цифровая микрофотография. Ув. 400

дит повышение активности Г-6-ф-ДГ на 12,14% ($p=0,021$). Это свидетельствует о долгосрочных нарушениях энергетического метаболизма гистаминергических нейронов у потомства крыс, потреблявших алкоголь в период беременности.

Вероятно, гипоксия, возникающая вследствие влияния алкоголя на головной мозг крысят на протяжении всего внутриутробного развития, способствует активации гликолитического пути окисления субстратов в гистаминергических нейронах гипоталамуса. Активность КФ увеличивается на 75,0% ($p=0,020$), что указывает на активацию лизосомального аппарата клетки и резкое усиление процесса аутофагии, направленных на удаление поврежденных органелл нейронов. В то же время в опытной группе наблюдается тенденция к снижению активности МАО Б ($p=0,050$), что может говорить о замедлении процессов метаболизма гистамина (табл. 3, рис. 2-6).

Таблица 3. – Активность ферментов (в ед. опт. плотности) в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крыс после антенатальной алкоголизации (Me (LQ; UQ))

Ферменты	Контроль (n=6)	Опыт (n=6)
СДГ	0,58 (0,53; 0,61)	0,29 (0,25; 0,34) *
ЛДГ	0,39 (0,33; 0,47)	0,67 (0,61; 0,67) *
Г-6-Ф-ДГ	0,33 (0,30; 0,36)	0,61 (0,55; 0,66) *
МАО Б	1,04 (1,00; 1,06)	0,87 (0,77; 0,91)
КФ	0,19 (0,14; 0,23)	0,76 (0,56; 0,86) *

Примечание: * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем

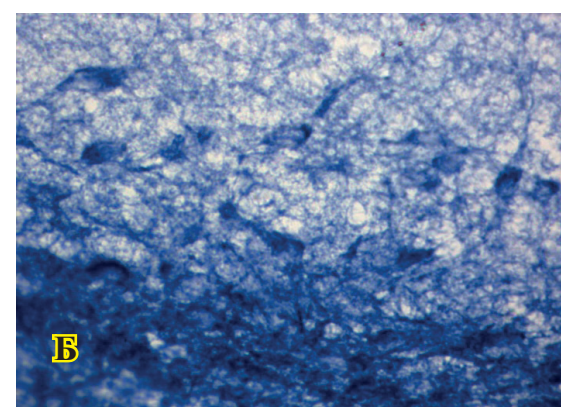
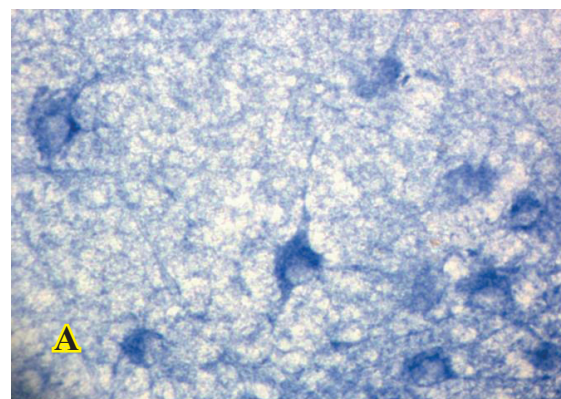
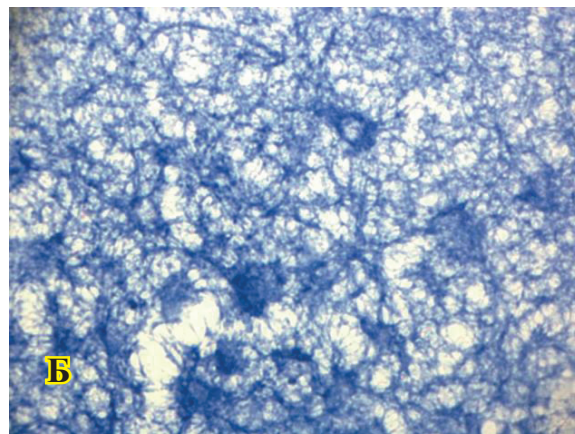
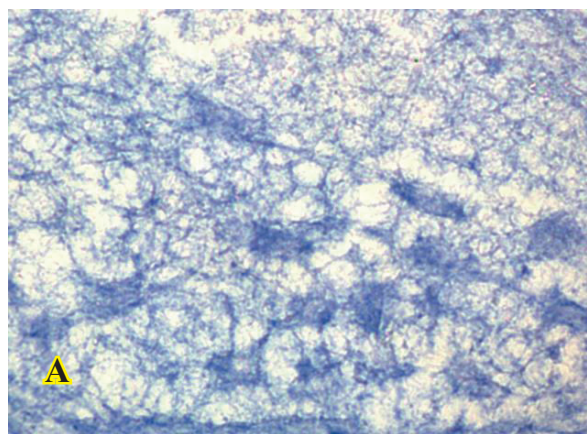


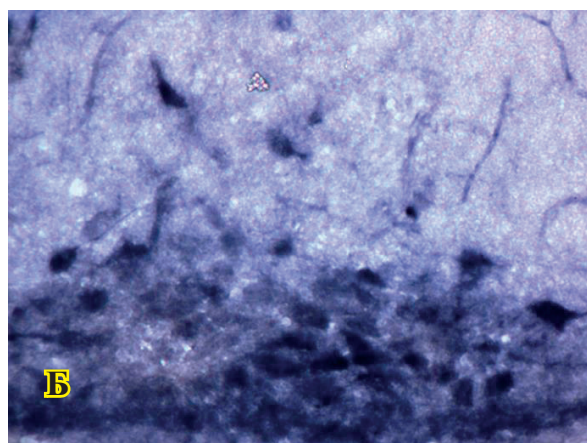
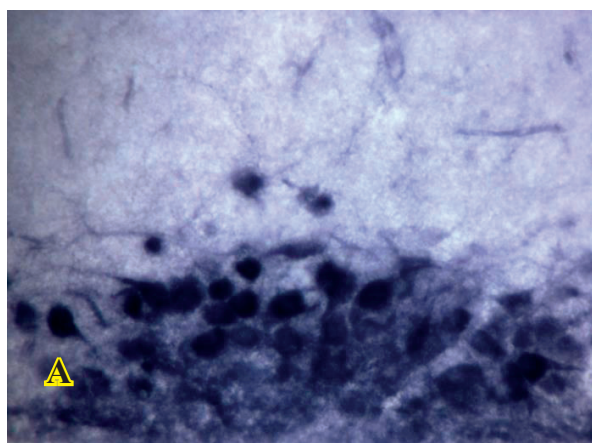
Рисунок 3. – Активность ЛДГ в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса контрольных крыс (А) и её увеличение в цитоплазме нейронов у крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию (Б)

Окраска по Гесс, Скарпелли, Пирсу.

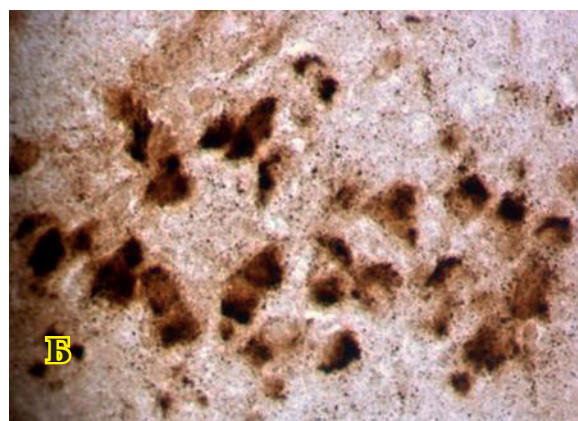
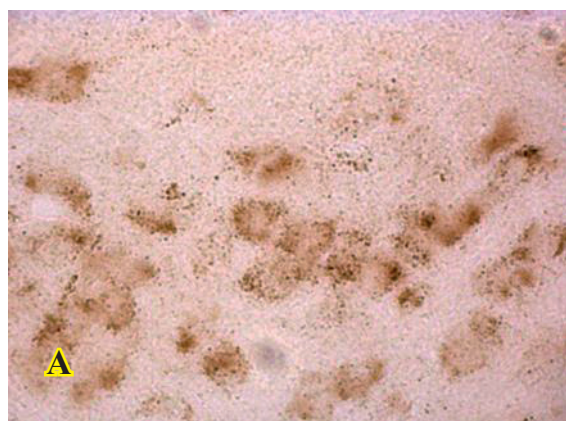
Цифровая микрофотография. Ув. 400



*Рисунок 4. – Активность Г-б-Ф-ДГ в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса контрольных крыс (А) и её увеличение в цитоплазме нейронов у крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию (Б)
Окраска по Гомори. Цифровая микрофотография. Ув. 400*



*Рисунок 5. – Активность MAO Б в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса контрольных крыс (А) и тенденция к её снижению в цитоплазме нейронов у крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию (Б)
Окраска по Зиматкину, Цыдику. Цифровая микрофотография. Ув. 200*



*Рисунок 6. – Активность КФ в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса контрольных крыс (А) и её увеличение в цитоплазме нейронов у крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию (Б)
Окраска по Гомори. Цифровая микрофотография. Ув. 400*

Выводы

Потребление алкоголя самками крыс на протяжении всей беременности нарушает структуру и метаболизм гистаминергических нейронов ги-

поталамуса их потомства. Эти изменения носят долгосрочный характер и указывают на высокую чувствительность развивающихся гистаминергических нейронов мозга к алкоголю.

Литература

1. Зиматкин, С. М. Нарушения в мозге при антенатальной алкоголизации : монография / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь. – Гродно : ГрГМУ, 2017. – 192 с.
2. Ambroziak, W. Human aldehyde dehydrogenase: metabolism of putrescine and histamine / W. Ambroziak, R. Pietruszko // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 1987. – Vol. 11, iss. 6. – P. 528-532.
3. Zimatkin, S. M. Alcohol-histamine interactions / S. M. Zimatkin, O. V. Anichtchik // *Alcohol Alcohol.* – 1999. – Vol. 34, iss. 2. – P. 97-99.
4. Brown, R. E. The physiology of brain histamine / R. E. Brown, D. R. Stevens, H. L. Haas // *Prog. Neurobiol.* – 2001. – Vol. 63, iss. 6. – P. 637-672.
5. Зиматкин, С. М. Гистаминергические нейроны мозга. – Минск : Новое знание, 2015. – 319 с.
6. Haas, H. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system / H. Haas, P. Panula // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2003. – Vol. 4, iss. 2. – P. 121-130. – doi: 10.1038/nrn1034.

References

1. Zimatkin SM, Bon EI. Narusheniya v mozge pri antenatalnoj alkogolizacii. Grodno: GrGMU; 2017. 192 p. (Russian).
2. Ambroziak W, Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase: metabolism of putrescine and histamine. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1987;11(6):528-532.
3. Zimatkin SM, Anichtchik OV. Alcohol-histamine interactions. *Alcohol Alcohol.* 1999;34(2):97-99.
4. Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. *Prog. Neurobiol.* 2001;63(6):637-672.
5. Zimatkin SM. Gistaminergicheskie нейроны мозга [Histaminergic neurons of the brain]. Minsk: Novoe znanie; 2015. 319 p. (Russian).
6. Haas H, Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003;4(2):121-130. doi: 10.1038/nrn1034.

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE BRAIN HISTAMINERGIC NEURONS OF THE 45-DAY OFFSPRING OF RATS CONSUMING ETHANOL DURING PREGNANCY

Zaerko A. V., Fedina K. M., Zimatkin S. M.

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

Introduction. The consumption of alcohol by the mother during pregnancy disturbs the structure and functions of the offspring brain. Histaminergic neurons of the hypothalamus have not been studied so far.

Objective. Estimation of the morphofunctional state of histaminergic neurons in hypothalamic nucleus E2 in the 45-day offspring of rats consuming ethanol during pregnancy.

Material and methods. The experiments were performed on white outbred female rats who consumed a 15% ethanol solution during pregnancy, and their 45-day offspring with the use of histological, histochemical, morpho- and cytophotometrical as well as statistical research methods.

Results. The 45-day offspring of rats who consumed ethanol during pregnancy, showed a decreased size of the histaminergic neurons bodies, inhibition of succinate dehydrogenase and monoamine oxidase type B as well as activation of acid phosphatase, lactate and glucose-6-phosphate dehydrogenases in their cytoplasm.

Conclusions. The consumption of alcohol by female rats during pregnancy disturbs the structure and metabolism of the developing hypothalamic histaminergic neurons of their offspring.

Keywords: histaminergic neurons, ethanol, postnatal development.

Поступила: 31.08.2018

Отрецензирована: 24.10.2018