

ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ МОЗГА КРЫСЫ



С. М. Зиматкин, А. В. Заерко, Е. М. Федина

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Введение. Изучение развития энергетического аппарата гистаминергических нейронов гипоталамуса в постнатальном онтогенезе представляет большой интерес, учитывая важность и недостаточную изученность этих клеток.

Цель исследования. Выяснение постнатального развития энергетического аппарата гистаминергических нейронов мозга крысы.

Материал и методы. Исследование выполнено на 5, 10, 20, 45 и 90-суточных беспородных белых крысах (72 крысенка). Проведена электронно-микроскопическая оценка изменения строения митохондрий, гистохимическое исследование активности ключевых окислительных ферментов этих нейронов и иммуногистохимическая оценка содержания в них АТФ-синтазы и нейроглобина.

Результаты. Развитие энергетического аппарата гистаминергических нейронов в постнатальном онтогенезе сопровождается увеличением количества митохондрий и занимаемой ими относительной площади в цитоплазме, изменением их формы и увеличением в них длины крист. Изменения на ультрамикроскопическом уровне идут параллельно с метаболической дифференцировкой этих нейронов, включающей переключение с анаэробного на аэробный способ получения энергии, а также возрастание экспрессии АТФ-синтазы и нейроглобина, определяющих функциональное состояние энергетического аппарата данных клеток.

Выводы. В постнатальном онтогенезе крысы происходит закономерное развитие энергетического аппарата гистаминергических нейронов мозга.

Ключевые слова: гистаминергические нейроны, мозг, постнатальное развитие, энергетический аппарат, митохондрии, окислительные ферменты, АТФ-синтаза, нейроглобин.

Для цитирования: Зиматкин, С. М. Постнатальное развитие энергетического аппарата гистаминергических нейронов мозга крысы / С. М. Зиматкин, А. В. Заерко, Е. М. Федина // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2021. Т. 19, № 6. С. 636-645. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-6-636-645>.

Введение

Гистаминергические нейроны мозга – это нейроны, синтезирующие и использующие в качестве медиатора биогенный диамин гистамин. Их тела расположены только в гипоталамической области промежуточного мозга, а аксоны идут во все отделы мозга, координируя деятельность других нейротрансмиттерных систем [1]. Гистаминергические нейроны участвуют в регуляции многих функций, систем и процессов в организме, играют важную роль в его онтогенезе [2].

Митохондрии являются энергетическими станциями эукариотической клетки. Они производят большую часть молекулярного носителя энергии – АТФ (аденозинтрифосфат), необходимого для функционирования клетки. Цепь тканевого дыхания митохондрий состоит из четырех комплексов ферментов, встроенных во внутреннюю мембрану митохондрий. Комплекс I – НАДН-дегидрогеназа (НАДН-ДГ), окисляет НАДН и передает электроны на убихинон. Комплекс II – сукцинатдегидрогеназа (СДГ), основные функции которого – восстановление ФАД (флавинадениндуклеотид), обеспечение передачи электронов от ФАДН₂ к железо-серным белкам внутренней мембраны митохондрий. Комплекс III включает коэнзим Q и цитохром с-оксидоредуктазу, переносит электроны с убихинона на цитохром с, расположенный в митохондриях на их внутренней мембране. Комплекс IV дыхательной цепи передает электроны от цитохрома с на кислород с образованием воды. Комплекс V представляет собой АТФ-синтазу, образующую АТФ из АДФ (аденозиндифосфат)

[3, 4]. Поэтому АТФ-синтаза является ключевым звеном в цепи образования АТФ и ферментным комплексом, участвующим в образовании крист митохондрий [4]. Нейроглобин, находящийся преимущественно в нервной ткани, относится к семейству железосодержащих белков – глобинов, способных связывать и депонировать кислород, подобно гемоглобину, и передавать его митохондриям [5]. Окислительные ферменты имеются и в цитозоле, такие как фермент пентозофосфатного пути, НАДФН-дегидрогеназа и фермент гликолиза, лактатдегидрогеназа.

Цель исследования – выяснение постнатального развития энергетического аппарата гистаминергических нейронов мозга крысы. Исследование включает электронно-микроскопическую оценку изменения строения митохондрий, гистохимическое исследование активности ключевых окислительных ферментов данных нейронов и иммуногистохимическую оценку содержания в них АТФ-синтазы и нейроглобина.

Материал и методы

Изучено потомство беспородных белых крыс (72 крысенка). Исследование проведено в соответствии с принципами биоэтики и требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей [6]. Декапитация крысят проходила на 5, 10, 20, 45 и 90-е сутки после рождения, быстро извлекали головной мозг, вырезали гипоталамус. Идентификацию структур головного мозга проводили по схемам стереотаксического атласа [7].

Для электронно-микроскопического исследования образцы гипоталамуса 5, 20 и 45-суточных животных помещали в 1% осмиевый фиксатор на буфере Миллонига (pH=7,4) на 2 часа при температуре +4°C. Далее их промывали в смеси буфера Миллонига и сахарозы, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, заключали в заливочную смесь смол. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме Leica EM UC 7 (Leica Microsystems GmbH, Германия), контрастировали уранилацетатом [8] и цитратом свинца [9]. Полученные препараты изучали под электронным микроскопом JEM-1011 (JEOL, Япония), фотографировали, используя комплекс из цифровой камеры Olympus Mega View III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия) и программы для обработки изображения iTEM 5.0 (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия). На полученных электронограммах при помощи программы iTEM в гистаминергических нейронах проводили ультраструктурную морфометрию митохондрий, обводя данные органеллы курсором на мониторе компьютера и оценивая их количество, индивидуальную и суммарную площадь в цитоплазме, их форму, длину крист на 1 мкм² митохондрий.

Для гистохимического исследования образцы гипоталамуса замораживали в парах жидкого азота. В криостате Leica CM 1850 (Leica Microsystems GmbH, Германия) изготавливали серийные фронтальные срезы заднего отдела гипоталамуса толщиной 12 мкм, часть из которых окрашивали по методу Ниссля (0,1% водным раствором тионина) для определения морфометрических показателей гистаминергических нейронов, остальные срезы окрашивали на выявление активности оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса, – сукцинатдегидрогеназы (СДГ, сукцинат: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1; по Нахласу и др., 1957), с гликолизом, – лактатдегидрогеназы (ЛДГ, L-лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27; по Гесс, Скарпелли, Пирсу, 1958), с транспортом электронов – НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ, НАДН: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.6.99.3; по Нахласу, Уокеру и Зелигману, 1958), с внемитохондриальным окислением и синтезом нуклеиновых кислот – дегидрогеназы восстановленного НАДФ (НАДФН-ДГ, НАДФН₂: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.6.1.1; по Гесс, Скарпелли, Пирсу, 1958) [10]. Для идентификации гистаминергических нейронов срезы гипоталамуса окрашивали на выявление активности моноаминоксидазы типа Б (МАО Б, моноамин: O₂-оксидоредуктаза (дезаминирующая) типа Б; КФ 1.4.3.4) – ключевого фермента метаболизма гистамина и маркера гистаминергических нейронов мозга [11], затем идентифицировали согласно топографическим схемам [2].

Для иммуногистохимического исследования образцы гипоталамуса фиксировали в цинк-этанол-формалине при +4°C (на ночь), затем заключали в парафин. При помощи микротомы Leica RM 2125 RTS (Leica Microsystems GmbH, Германия) изготавливали серийные парафино-

вые срезы заднего отдела гипоталамуса толщиной 5 мкм, далее их монтировали на предметные стекла. Для идентификации гистаминергических нейронов срезы гипоталамуса обрабатывали на выявление маркеров этих нейронов, ключевых ферментов метаболизма гистамина моноаминоксидазы типа Б и гистидиндекарбоксилазы (ГДК). Для иммуногистохимического выявления МАО Б и ГДК применяли первичные поликлональные кроличьи антитела против МАО Б (cat. No. EPP15673) и ГДК (cat. No. E-AB-33495) (Elabscience, Китай), в разведении 1:100, при +4°C (20 часов) во влажной камере. Связавшиеся первичные антитела выявляли с помощью набора детекции Elabscience (cat. No. E-IR-R213, Elabscience, Китай).

Для иммуногистохимического выявления молекулярного маркера митохондрий АТФ-синтазы (комплекса V, образующего АТФ из АДФ) применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-ATP5A antibody (ab. 14748, Abcam, Великобритания) в разведении 1:2400 при +4°C, экспозиция 20 ч во влажной камере [12]. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (ab. 80436, Abcam, Великобритания).

Для иммуногистохимического выявления нейроглобина (Ngb) – белка, депонирующего кислород в нейронах для митохондрий, применяли первичные моноклональные мышинные антитела Anti-Ngb antibody (ab. 14748, Abcam, Великобритания) в разведении 1:600 при +4°C, экспозиция 20 ч во влажной камере [13]. Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор EXPOSE Mouse and Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit Abcam (ab. 80436, Abcam, Великобритания).

Гистологические препараты изучали, фотографировали и анализировали с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), встроенной цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) (увеличение объектива микроскопа – ×40) и программы компьютерного анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). Цитофотометрическое исследование проводили, определяя оптическую плотность полученного осадка хромогена в цитоплазме нейронов на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакции.

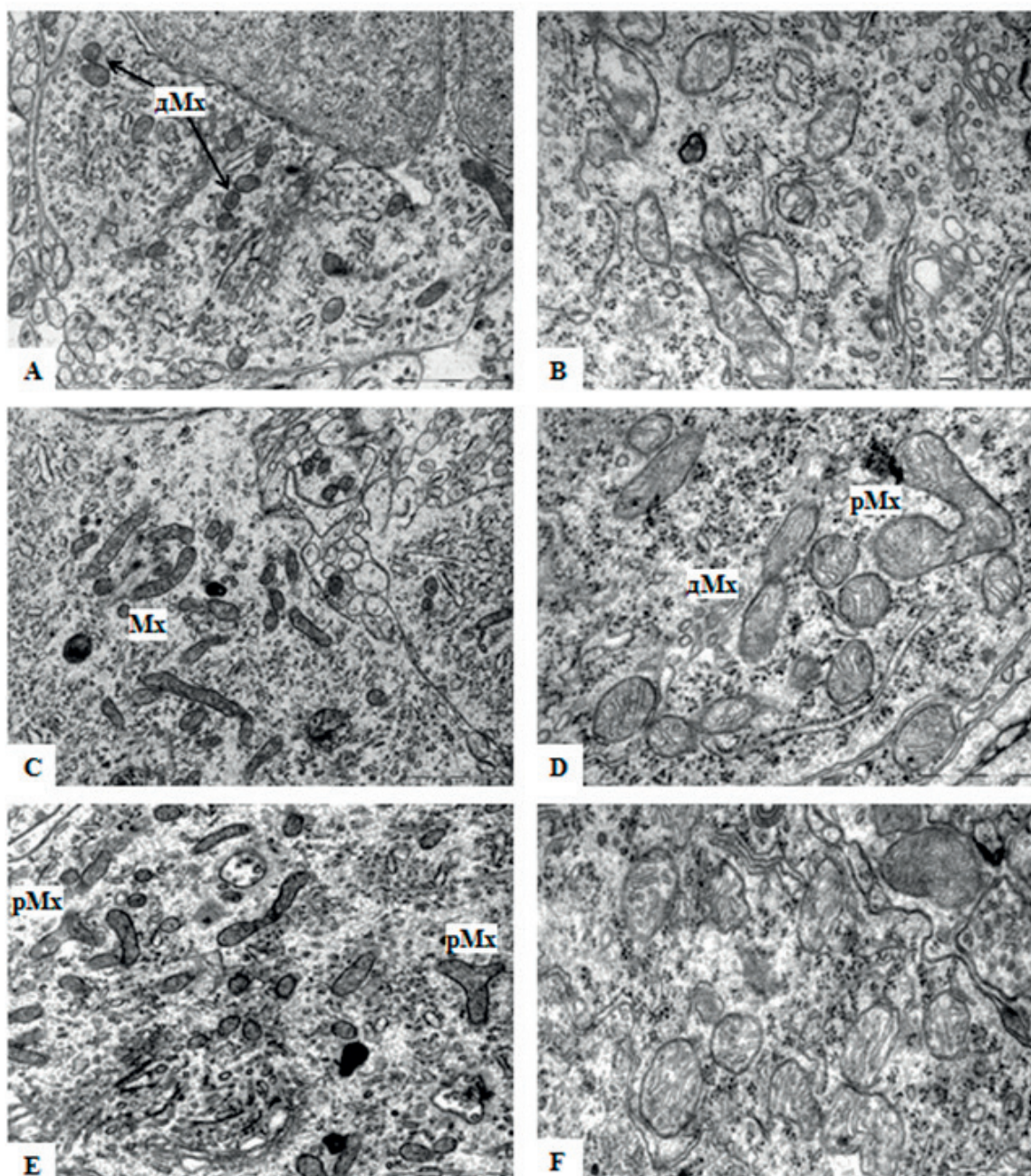
Анализ полученных данных проводили методами непараметрической статистики при помощи программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Для каждого показателя рассчитывали значение медианы (Me), нижнего квартиля (LQ), верхнего квартиля (UQ) и интерквартильного диапазона (IQR). Сравнение групп по одному признаку проводили, используя критерий 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) [14].

Результаты и обсуждение

Проведенное электронно-микроскопическое исследование показало, что количество и строение митохондрий в гистаминергических нейронах в постнатальном онтогенезе претерпевает значительные изменения. В цитоплазме гистаминергических нейронов крысят 5-суточного возраста присутствует умеренное количество митохондрий, которые имеют овальную, округлую, продолговатую, реже – разветвленную или неправильную форму и располагаются диффузно. Иногда наблюдается деление данных ор-

ганелл (рис. 1А). Кристы митохондрий не всегда хорошо выражены и располагаются неупорядоченно: как вдоль, так и поперек по отношению к их длинной оси (рис. 1В). Изредка они изгибаются и не имеют четкой ориентации.

К 20-м суткам митохондрии приобретают более вытянутую форму. Разветвленные органеллы встречаются чаще, чем на пятые сутки. По своей локализации данные структуры значительно не отличаются от ранее описанных (рис. 1С, D). Выявляются также делящиеся органеллы.



Делящиеся митохондрии (дМх), митохондрии (Мх), разветвленная митохондрия (рМх). Электронограммы. Масштабный отрезок равен 1 мкм (А, С, Е), 0,5 мкм (В, D, F). Увелич. 30000 (А, С, Е), 50000 (В, D, F)

Рисунок 1. – Митохондрии в гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс на 5 (А, В), 20 (С, D), 45-е (Е, F) сутки постнатального онтогенеза

Figure 1. – Mitochondria in the rat hypothalamus histaminergic neurons on the 5th (A, B), 20th (C, D), 45th (E, F) days of postnatal ontogenesis

На 45-е сутки в цитоплазме гистаминергических нейронов по-прежнему выявляются контакты митохондрий с другими органеллами и друг с другом. Довольно часто отмечаются их местные скопления рядом с ядром или эндоплазматической сетью (рис. 1F). Более вытянутая форма митохондрий сохраняется, встречаются разветвленные органеллы (рис. 1E). Делящиеся митохондрии наблюдаются чаще, чем на ранее описанные сроки постнатального развития.

С пятых по 45-е сутки постнатального развития количество митохондрий в гистаминергических нейронах возрастает в 1,7 раза: с 5 по 20-е, как и с 20 по 45-е сутки – в 1,3 раза ($p < 0,001$). При этом индивидуальная площадь не претерпевает существенных изменений, в то время как изменение относительной площади данных органелл полностью соответствует изменению их количества. Минимальный диаметр митохондрий с 5 по 45-е сутки уменьшается, особенно с 5 по 20-е сутки, в 1,1 раза ($p < 0,008$). Соответственно, они становятся более вытянутыми, что подтверждается увеличением фактора элонгации, особенно с 5 по 20-е сутки ($p < 0,009$). Длина крист митохондрий за исследованный промежуток постнатального онтогенеза возрастает в 1,5 раза: с 5 по 20-е сутки – в 1,2 раза ($p < 0,001$), с 20 по 45-е сутки – в 1,3 раза ($p < 0,001$) (табл. 1).

Активность СДГ – фермента, расположенного на внутренней мембране митохондрий и участвующего в цикле Кребса в аэробном окислении углеводов – на пятые сутки после рождения достигает максимальных значений, далее постепенно снижается до 45-х суток (с пятых по 10-е сутки – в 1,2 раза ($p = 0,01$), с 10 по 20-е сутки – в 1,1 раза ($p = 0,03$), с 20 по 45-е сутки – в 1,2 раза

($p < 0,001$), а с 45 по 90-е сутки возрастает в 1,4 раза ($p < 0,001$), не достигая значений 5-суточных животных (рис. 2А, 2В, 3).

Активность НАДН-ДГ – маркерного фермента митохондрий, участвующего в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, – с пятых по 20-е сутки постнатального онтогенеза незначительно колеблется, с 20 по 45-е сутки несколько снижается ($p = 0,02$), а с 45 по 90-е сутки данный показатель увеличивается в 1,1 раза ($p < 0,001$) (рис. 2С, 2D, 3).

Активность НАДФН-ДГ – фермента, катализирующего внемитохондриальные окислительно-восстановительные реакции и сопряженного с NO-синтазой, – с пятых по 90-е сутки изменяется волнообразно: с пятых по 10-е сутки данный показатель уменьшается, а с 10 по 20-е сутки возрастает в 1,3 раза ($p < 0,001$), с 20 по 45-е сутки несколько снижается ($p = 0,01$), с 45 по 90-е сутки увеличивается в 1,4 раза ($p < 0,001$) (рис. 3).

Активность ЛДГ – фермента, участвующего в конечных этапах протекающего в анаэробных условиях гликолиза, – в гистаминергических нейронах в постнатальном онтогенезе с пятых по 90-е сутки меняется волнообразно: с пятых по 10-е сутки не претерпевает существенных изменений, к 20 суткам достигает максимума, увеличиваясь по сравнению с 10-ми в 1,6 раза ($p < 0,001$), к 45-м суткам снижается в 1,5 раза ($p < 0,001$) а затем существенно не меняется (рис. 3).

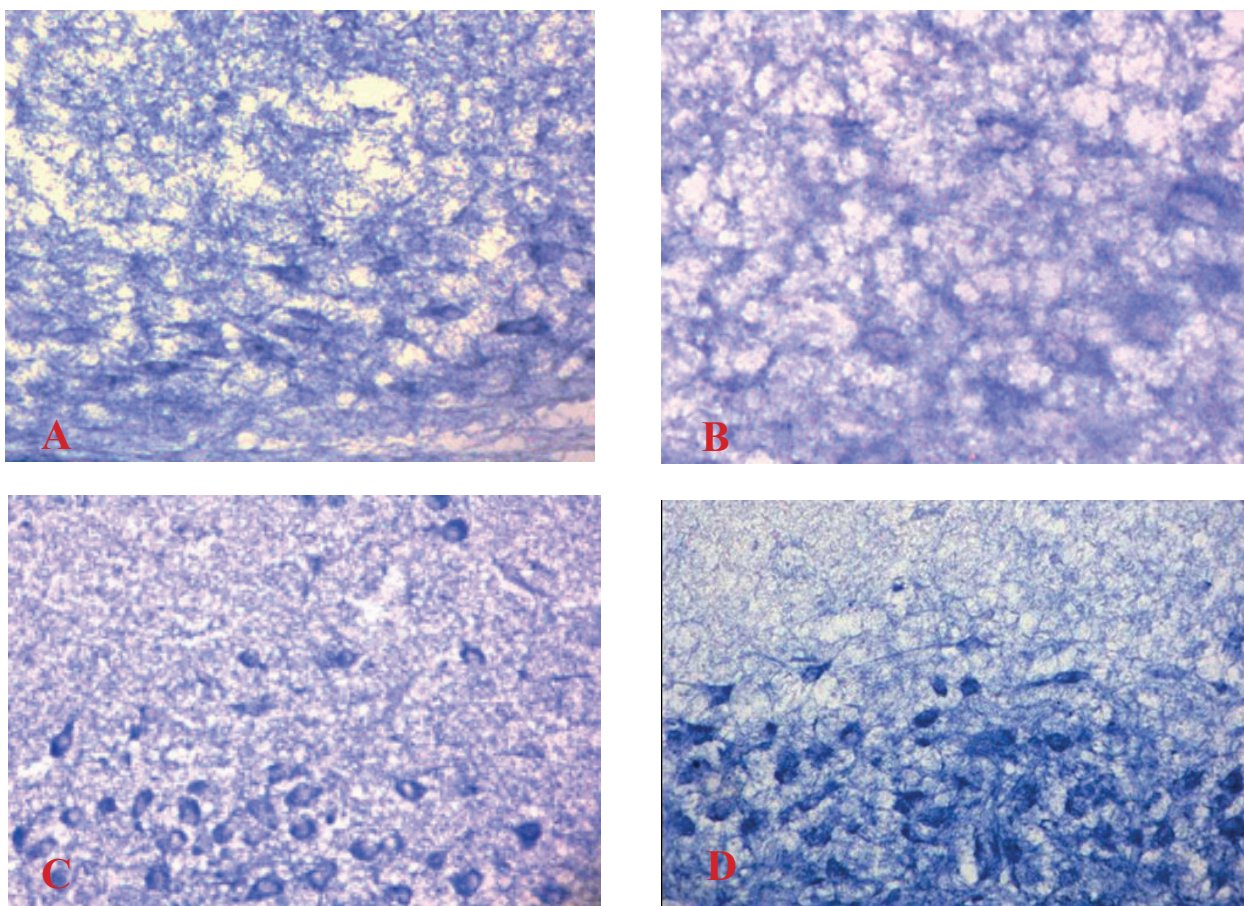
В ходе иммуногистохимического исследования установлено: иммунореактивность маркера митохондрий АТФ-синтазы в нейронах гистаминергического ядра Е2 гипоталамуса крыс с пятых по 90-е сутки постнатального онтогенеза увеличивается в 1,5 раза ($p < 0,001$). При этом с

Таблица 1. – Изменение показателей митохондрий гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс в период постнатального развития (Me (LQ; UQ))

Table 1. – Changes in the mitochondria parameters of rat hypothalamus histaminergic neurons during postnatal development (Me (LQ; UQ))

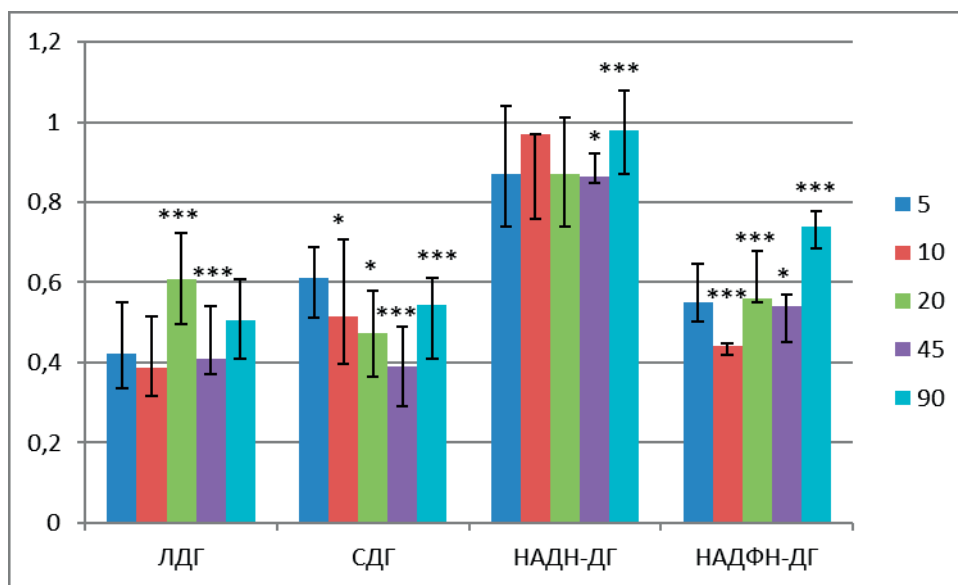
Показатели	Пятые сутки	20-е сутки	45-е сутки
Количество митохондрий, шт/мкм ² цитоплазмы	1,658 (1,157; 2,078)	2,216*** (1,672; 2,754)	2,857*** (2,226; 3,609)
Минимальный диаметр, мкм	0,165 (0,156; 0,186)	0,158** (0,145; 0,174)	0,160# (0,145; 0,179)
Максимальный диаметр, мкм	0,270 (0,239; 0,306)	0,264 (0,228; 0,298)	0,265 (0,226; 0,298)
Периметр, мкм	0,726 (0,663; 0,818)	0,711 (0,622; 0,771)	0,714 (0,628; 0,821)
Площадь митохондрий, мкм ²	0,034 (0,028; 0,040)	0,031 (0,026; 0,037)	0,031 (0,025; 0,040)
Относительная площадь митохондрий, мкм ² /мкм ² цитоплазмы	0,066 (0,045; 0,086)	0,084*** (0,069; 0,106)	0,110*** (0,096; 0,132)
Форм-фактор	0,792 (0,758; 0,819)	0,789 (0,761; 0,811)	0,783 (0,744; 0,805)
Фактор элонгации	1,563 (1,449; 1,723)	1,662** (1,560; 1,787)	1,679# (1,565; 1,829)
Длина крист митохондрии, мкм	0,126 (0,100; 0,161)	0,145*** (0,116; 0,185)	0,188*** (0,157; 0,241)

Примечание: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим; # – $p < 0,05$, сравнение клеточных показателей гистаминергических нейронов между пятыми и 45-ми сутками



A, B – окраска по Нахласу и др. Цифровые микрофотографии. Увелич. 400. C, D – окраска по Нахласу, Уокеру, Зелигману. Цифровые микрофотографии. Увелич. 200

Рисунок 2. – Активность СДГ (А, В) и НАДН-ДГ (С, D) в гистаминергических нейронах гипоталамуса 5-суточных (А), 45-суточных (В, С) и 90-суточных (D) крыс
Figure 2. – Activity of SDH (A, B) and NADH-DH (C, D) in the hypothalamus histaminergic neurons of 5-day-old (A), 45-day-old (B, C), and 90-day-old (D) rats



Me±IQR; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим

Рисунок 3. – Активность ЛДГ, СДГ, НАДН-ДГ, НАДФН-ДГ в цитоплазме гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс в динамике постнатального развития
Figure 3. – Activity of LDH, SDH, NADH-DG, NADPH-DG in the cytoplasm of the rat hypothalamus histaminergic neurons in the postnatal ontogenesis dynamics

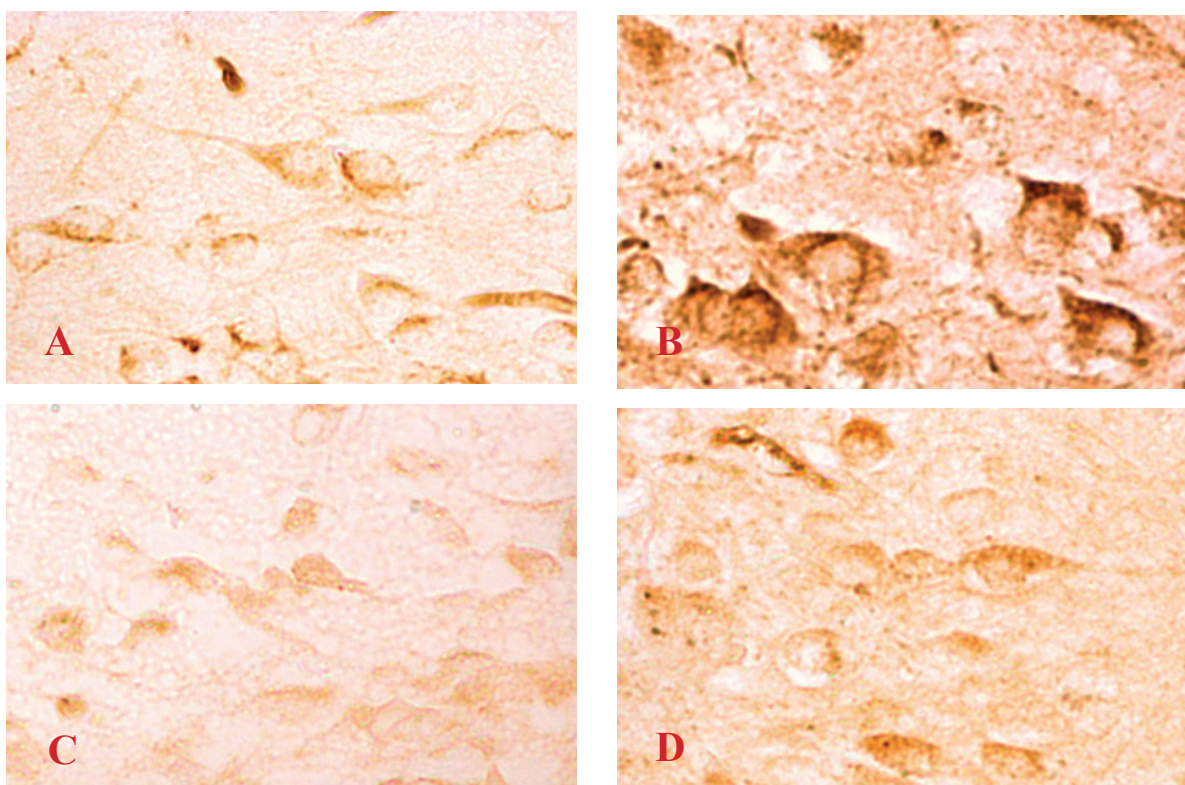
пятых по 10-е сутки, с 20 по 45-е и с 45 по 90-е сутки иммунореактивность данного маркера возрастает в 1,1 раза ($p < 0,001$), а с 10 по 20-е сутки не претерпевает существенных изменений (рис. 4А, 4В; табл. 2).

Иммунореактивность нейроглобина (Ngb) с пятых по 90-е сутки постнатального развития увеличивается в 1,6 раза ($p < 0,001$). При этом с пятых по 10-е сутки она возрастает в 1,2 раза ($p < 0,001$), с 10 по 20-е сутки в 1,1 раза ($p < 0,001$), с 20 по 45-е сутки в 1,2 раза ($p < 0,001$), а с 45 по 90-е сутки не претерпевает значительных изменений (рис. 4С, 4D; табл. 2).

В постнатальном онтогенезе в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крыс происходит формирование энергетического ап-

парата, необходимого для развития этих клеток. Так, по мере взросления животных в них возрастает число митохондрий и занимаемая ими относительная площадь в цитоплазме, при этом они вытягиваются, в них увеличивается длина крист. Кроме того, часто наблюдается контакт митохондрий с ядерной оболочкой и структурными компонентами ГрЭС, что указывает на значительные энергетические затраты в таких зонах при обменных процессах [15].

В развивающихся гистаминергических нейронах с пятых по 45-е сутки постнатального развития встречаются разветвленные формы митохондрий. Существует мнение, что в большинстве клеток митохондрии представлены не изолированными структурами, а организованы



Иммуноцитохимическая реакция. Цифровые микрофотографии. Увелич. 800 (А, В), 400 (С, D)

Рисунок 4. – Иммунореактивность АТФ-синтазы (А, В) и Ngb (С, D) в гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс. А, С – пятые сутки, В, D – 90-е сутки

Figure 4. – Immunoreactivity of ATP synthase (A, B) and Ngb (C, D) in the rat hypothalamus histaminergic neurons. A, C – 5th day, B, D – 90th day

Таблица 2. – Иммунореактивность маркеров (в ед. опт. плотности) в цитоплазме гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс (Me (LQ; UQ))

Table 2. – Markers immunoreactivity (in units of optical density) in the cytoplasm of the rat hypothalamus histaminergic neurons (Me (LQ; UQ))

Маркеры	Сроки исследования				
	Пятые сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
АТФ-синтаза	0,337 (0,264; 0,423)	0,374*** (0,300; 0,453)	0,385 (0,304; 0,479)	0,438*** (0,338; 0,563)	0,494*** (0,409; 0,594)
Нейроглобин	0,173 (0,154; 0,202)	0,210*** (0,165; 0,243)	0,234*** (0,199; 0,270)	0,270*** (0,230; 0,317)	0,270 (0,232; 0,311)

Примечание: *** – $p < 0,001$, при сравнении показателей каждый последующий срок сопоставляли с предыдущим

в трехмерную сеть из прямых или ветвящихся цепочек митохондрий или представляют собой одну или несколько разветвленных органелл [16-18]. Таким образом, то, что мы называем на срезе митохондрией, имея в виду отдельную органеллу, может быть лишь частью «митохондриальной сети», представляющей собой динамичную систему, меняющуюся в зависимости от метаболических условий и энергетических потребностей, тем самым указывая на многогранность, а также структурную и функциональную целостность энергетического аппарата клетки. Исходя из наших данных, можно предполагать разрастание и ветвление такой «митохондриальной сети» в развивающихся гистаминергических нейронах.

Один из важных механизмов клеточной адаптации – «митохондриальная динамика», включающая процесс деления митохондрий. Установлено, что не только синтез АТФ и реакции окислительного стресса, но и такие процессы, как рост и старение клеток, зависят от деления этих органелл [19-21]. О феномене митохондриального деления известно с давних времен. Оно выполняло функцию обеспечения после митоза дочерних клеток данными органеллами. В последнее время деление митохондрий признано важной характеристикой не только делящихся, но и интерфазных клеток, включая клетки таких высокодифференцированных тканей, как нервная. С пятых по 45-е сутки постнатального развития гистаминергических нейронов мозга крыс в их цитоплазме довольно часто встречаются делящиеся митохондрии. Деление этих органелл как один из способов митохондриального биогенеза и увеличение количества митохондрий обеспечивает возрастающие потребности клетки в энергии. Хотя это может отражать и ускоренное ветвление упомянутой выше «митохондриальной сети».

В процессе роста и дифференцировки гистаминергических нейронов количество митохондрий и занимаемая ими относительная площадь в цитоплазме увеличивается, при этом их средний размер не претерпевает существенных изменений, что может быть обусловлено активным делением данных органелл. Таким образом, деление митохондрий регулирует их число, а также контролирует обновление и качество митохондриальной популяции.

Наблюдающееся удлинение крист в развивающихся гистаминергических нейронах может отражать увеличение складчатости и, соответственно, площади внутренней мембраны, а также возрастание энергетического потенциала митохондрий. Удлинение крист может приводить к вытягиванию самих митохондрий, что подтверждается увеличением фактора элонгации с пятых по 45-е сутки постнатального онтогенеза крыс.

Эти структурные изменения митохондрий сопровождаются изменением соотношения активности окислительных ферментов. Следует отметить, что уже на пятые сутки постнатального развития крыс в цитоплазме гистаминергических нейронов наблюдается довольно высокая

активность СДГ (маркерного фермента митохондрий), катализирующего окисление углеводов в цикле Кребса, что свидетельствует о высоком уровне энергетических затрат, обусловленных процессами роста и дифференцировки перикарионов гистаминергических нейронов. В дальнейшем прослеживается постепенное убывание активности данного показателя до 45-х суток с повторным возрастанием на 90-е сутки. В то же время уровень активности НАДН-ДГ – фермента, участвующего в переносе электронов по дыхательной цепи и отражающего интенсивность окислительных реакций в митохондриях – в постнатальном онтогенезе поддерживается на относительно постоянно высоком уровне.

Снижение активности СДГ с 10 по 45-е сутки постнатального развития сопровождается повышением активности ЛДГ, причем на 20-е сутки в гистаминергических нейронах данный показатель устанавливается на максимальном уровне. Это говорит об увеличении интенсивности анаэробного гликолиза как дополнительного источника энергии, потребность в которой возрастает. Например, известно, что между 10 и 15-м днями в коре больших полушарий наблюдается значительное увеличение кровоснабжения и потребления O_2 , которое к концу третьей недели достигает наибольших значений [22]. К 45-м суткам активность лактатдегидрогеназы снижается до показателей, характерных для 5-суточных животных. Перестройка энергетического метаболизма гистаминергических нейронов с пятых по 90-е сутки также включает волнообразное изменение активности НАДФН-ДГ – фермента, катализирующего внемитохондриальные окислительно-восстановительные реакции.

По мере роста и дифференцировки гистаминергических нейронов мозга их потребность в кислороде увеличивается, в связи с чем, вероятно, анаэробный гликолиз, активно протекающий в этих нейронах на ранних этапах постнатального онтогенеза и определяющий их устойчивость к гипоксии, постепенно сменяется после 20-х суток аэробным гликолизом, более эффективно обеспечивающим клетки энергией. Такое переключение путей наработки энергии в развивающихся гистаминергических нейронах представляется вполне логичным и согласуется с литературными данными, по которым процесс развития мозга сопровождается закономерным изменением соотношения анаэробного и аэробного способов получения энергии [23].

Развивающиеся гистаминергические нейроны испытывают потребность в возрастающем количестве энергии, запасаемой в макроэргических связях АТФ, продукция которой – одна из первостепенных функций митохондрий. Митохондриальная мембранная АТФ-синтаза синтезирует АТФ из АДФ при помощи трансмембранного градиента протонов, который генерируется электрон-транспортными комплексами дыхательной цепи. Энергия трансмембранного градиента используется для синтеза АТФ и для активного транспорта необходимых субстратов через внутреннюю митохондриальную мембра-

ну. Сочетание этих реакций обеспечивает эффективный обмен АТФ-АДФ между митохондрией и цитозолем, что позволяет поддерживать в клетке высокий уровень энергообеспечения. Во время дифференцировки клеток АТФ-синтаза также способствует формированию складок внутренней мембраны – крист митохондрий [24]. Поэтому возрастание иммунореактивности АТФ-синтазы с пятых по 90-е сутки постнатального развития гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс действительно отражает динамику становления энергетического аппарата этих клеток.

Поскольку белок нейроглобин служит для депонирования и переноса кислорода к митохондриям нейронов [13], вполне закономерно возрастание его содержания в гистаминергических нейронах с пятых по 90-е сутки постнатального развития крыс. Существует предположение, что нейроглобин должен концентрироваться в цитоплазматических компартментах, где непосредственно происходят окислительные процессы [12]. Следовательно, наиболее вероятно его локализация в митохондриях или вблизи этих органелл. Проведенные рядом ученых биохимические исследования указывают на присутствие нейроглобина в составе именно митохондриаль-

ной фракции [25]. Однако данные о совместном расположении этого белка и митохондриальных маркеров пока не получены, поэтому можно предположить, что нейроглобин локализуется, по крайней мере, вблизи митохондрий нейронов.

Заключение

Развитие энергетического аппарата гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса в постнатальном онтогенезе сопровождается увеличением количества митохондрий и занимаемой ими относительной площади в цитоплазме, их вытягиванием и увеличением в них длины крист. Изменения на ультрамикроскопическом уровне идут параллельно с метаболической дифференцировкой гистаминергических нейронов, включающей переключение с анаэробного на аэробный способ получения энергии, а также возрастание экспрессии АТФ-синтазы и нейроглобина, определяющих функциональное состояние энергетического аппарата данных клеток.

Авторы выражают благодарность сотрудникам научно-исследовательской лаборатории Гродненского государственного медицинского университета за помощь при проведении электронно-микроскопических исследований.

Литература

1. Haas, H. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system / H. Haas, P. Panula // *Nat Rev Neurosci.* – 2003. – Vol. 4, № 2. – P. 121-130. – doi: 10.1038/nrn1034.
2. Зиматкин, С. М. Гистаминергические нейроны мозга / С. М. Зиматкин. – Минск : Новое знание, 2015. – 319 с.
3. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain / E. Lapuente-Brun [et al.] // *Science.* – 2013. – Vol. 340, № 6140. – P. 1567-1570. – doi: 10.1126/science.1230381.
4. Узлова, Е. В. АТФ-синтаза митохондрий / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* – 2020. – Т. 18, № 6. – С. 648-654. – doi: 10.25298/2221-8785-2020-18-6-648-654.
5. Узлова, Е. В. Нейроглобин: строение, функции, локализация в мозге в норме и при патологии / Е. В. Узлова, С. М. Зиматкин // *Новости медико-биологических наук.* – 2019. – Т. 19, № 1. – С. 91-96.
6. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (text with EEA relevance) / European Union // *Official Journal of the European Union L 276.* – 2010. – P. 33-79.
7. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C.J. Watson. – 6th ed. – London : Academic Press, 2007. – 448 p.
8. Watson, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals / M. L. Watson // *J Biophys Biochem Cytol.* – 1958. – Vol. 4, № 4. – P. 475-478. – doi: 10.1083/jcb.4.4.475.
9. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *J Cell Biol.* – 1963. – Vol. 17, № 1. – P. 208-212. – doi: 10.1083/jcb.17.1.208.
10. Пирс, Э. Гистохимия. Теоретическая и прикладная [Histochemistry. Theoretical and applied] / Э. Пирс. – Москва: Издательство иностранной литературы, 1962. – 962 с.
11. Зиматкин, С. М. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге / С. М. Зиматкин, В. Ф. Цыдик // *Морфология.* – 1994. – Т. 106, № 4-6. – С. 157-161.
12. Молекулярная нейроморфология. Нейродегенерация и оценка реакции нервных клеток на повреждение / Д. Э. Коржевский [и др.]; под ред. Д. Э. Коржевского. – Санкт-Петербург : СпецЛит, 2015. – 110 с.
13. Трехмерная организация цитоплазматических нейроглобин-иммунопозитивных структур нейронов продолговатого мозга крысы / О. В. Кирик [и др.] // *Биологические мембраны.* – 2016. – Т. 33, № 3. – С. 207-212. – doi: 10.7868/S0233475516030063.
14. Батин, Н. В. Компьютерный статистический анализ данных / Н. В. Батин. – Минск : Институт подготовки научных кадров; 2008. – 159 с.
15. The cell-type specificity of mitochondrial dynamics / A. V. Kuznetsov [et al.] // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2009. – Vol. 41, № 10. – P. 1928-1939. – doi: 10.1016/j.biocel.2009.03.007.
16. Bereiter-Hahn, J. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria / J. Bereiter-Hahn, M. Vöth // *Microsc Res Tech.* – 1994. – Vol. 27, № 3. – P. 198-219. – doi: 10.1002/jemt.1070270303.
17. Yaffe, M. P. Dynamic mitochondria / M. P. Yaffe // *Nat Cell Biol.* – 1999. – Vol. 1, № 6. – P. 149-150. – doi: 10.1038/14101.
18. Griparic, L. The many shapes of mitochondrial membranes / L. Griparic, A. M. van der Blik // *Traffic.* – 2001. – Vol. 2, № 4. – P. 235-244. – doi: 10.1034/j.1600-0854.2001.1r008.x.

19. Soubannier V. Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades / V. Soubannier, H. M. McBride // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – Vol. 1793, № 1. – P. 154-170. – doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.07.008.
20. Chen, H. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission / H. Chen, DC. Chan // *Hum Mol Genet*. – 2005. – Vol. 14, spec № 2. – R. 283-289. – doi: 10.1093/hmg/ddi270.
21. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA / P. A. Parone [et al.] // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3, № 9. – e3257. – doi: 10.1371/journal.pone.0003257.
22. Дмитриева, Н. И. О периодах развития структур головного мозга в онтогенезе крысы / Н. И. Дмитриева // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. – 1981. – Т. 17, № 3. – С. 287-293.
23. Лелевич, В. В. Обмен веществ в детском организме / В. В. Лелевич, В. М. Шейбак, А. А. Масловская. – Гродно : ГрГМУ, 2018. – 212 с.
24. Бонь, Е. И. Роль митохондрий в энергетике клетки и характеризующие ее молекулярные маркеры / Е. И. Бонь, Н. Е. Максимович // *Оренбургский медицинский вестник*. – 2019 – Т. 7, № 1(25). – С. 47-52.
25. Neuroglobin involvement in respiratory chain function and retinal ganglion cell integrity / C. Lechaue [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol. 1823, № 12. – P. 2261-2273. – doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.09.009.
11. Zimatkin SM. Tsydik VF. Gistohimicheskiy metod issledovaniya aktivnosti monoaminoksidazy A i B v mozge [Histochemical method for studying the activity of monoamine oxidase A and B in the brain]. *Morfologiya* [Morphology]. 1994;106(4-6):157-161. (Russian).
12. Korzhevskiy DJe, Grigorev IP, Kolos EA, et al.; Korzhevskiy DJe, editor. Molekuljarnaja nejromorfologija. Nejrodegeneracija i ocenka reakcii nervnyh kletok na povrezhdenije. Sankt-Peterburg: SpecLit; 2015. 110 p. (Russian).
13. Kirik OV, Grigorev IP, Alekseeva OS, Korzhevskii DE. Trehmernaja organizacija citoplazmaticeskikh nejroglobin-immunopozitivnyh struktur nejronov prodolgovatogo mozga krysy [Three-dimensional organization of the cytoplasmic neuroglobin-immunopositive structures in the rat medulla oblongata neurons]. *Biologiceskie Membrany*. 2016;33(3):207-212. doi: 10.7868/S0233475516030063. (Russian).
14. Batin NV. Kompjuternyj statisticheskiy analiz dannyh. Minsk: Institut podgotovki nauchnyh kadrov Nacionalnoj akademii nauk Belarusi; 2008. 160 p. (Russian).
15. Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R. The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(10):1928-39. doi: 10.1016/j.biocel.2009.03.007.
16. Bereiter-Hahn J, Vöth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*. 1994;27(3):198-219. doi: 10.1002/jemt.1070270303.
17. Yaffe MP. Dynamic mitochondria. *Nat. Cell Biol*. 1999;1(6):E149-150. doi: 10.1038/14101.
18. Gripacic L, van der Bliek AM. The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic*. 2001;2(4):235-44. doi: 10.1034/j.1600-0854.2001.1r008.x.
19. Soubannier V, McBride HM. Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(1):154-70. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.07.008.
20. Chen H, Chan DC. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet*. 2005;14 Spec No 2:R283-289. doi: 10.1093/hmg/ddi270.
21. Parone PA, Da Cruz S, Tondera D, Mattenberger Y, James DI, Maechler P, Barja F, Martinou JC. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One*. 2008;3(9):e3257. doi: 10.1371/journal.pone.0003257.
22. Dmitrieva NI. O periodah razvitiija struktur golovnogogo mozga v ontogeneze krysy. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii* [Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology]. 1981;17(3):287-293. (Russian).
23. Lelevich VV. Shejbak VM, Maslovskaja AA. Obmen veshhestv v detskom organizme. Grodno: GrSMU; 2018. 212 p. (Russian).
24. Bon LI, Maksimovich NE. Rol mitohondrij v energetike kletki i harakterizujushchije eje molekuljarnyje markery [Role of mitochondria in cells energetic and characterizing its molecular markers]. *Orenburgskij medicinskij vestnik* [Orenburg Medical Bulletin]. 2019;7(1(25)):47-52. (Russian).
25. Lechaue C, Augustin S, Cwerman-Thibault H, Bouaita A, Forster V, Célier C, Rustin P, Marden MC, Sahel JA, Corral-Debrinski M. Neuroglobin involvement in respiratory chain function and retinal ganglion cell integrity. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(12):2261-73. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.09.009.

References

POSTNATAL DEVELOPMENT OF THE ENERGY APPARATUS OF RAT BRAIN HISTAMINERGIC NEURONS

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

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Background. Studying the development of the energy apparatus of hypothalamus histaminergic neurons in postnatal ontogenesis is of great interest, given the importance and insufficient knowledge of these cells.

Aim of the study. To elucidate postnatal development of the energy apparatus of rat brain histaminergic neurons.

Material and methods. The study was performed on 5-, 10-, 20-, 45- and 90-day-old outbred white rats (72 rats). An electron microscopic assessment of changes in the mitochondria structure, a histochemical study of key oxidative enzymes activity of these neurons and immunohistochemical assessment of ATP synthase and neuroglobin content in them were carried out.

Results. The development of the energy apparatus of histaminergic neurons in postnatal ontogenesis is accompanied by an increase in the mitochondria number and the relative area occupied by them in the cytoplasm, a change in their shape and an increase in the cristae length in them. Changes at the ultramicroscopic level go parallel with the metabolic differentiation of these neurons, which includes a switch from anaerobic to aerobic energy production, as well as an increase in the expression of ATP synthase and neuroglobin, which determine the functional state of the energy apparatus of these cells.

Conclusions. In rat postnatal ontogenesis, a natural development of the energy apparatus of brain histaminergic neurons takes place.

Keywords: Histaminergic neurons, brain, postnatal development, energy apparatus, mitochondria, oxidative enzymes, ATP synthase, neuroglobin.

For citation: Zimatkin SM, Zaerko AV, Phedina KM. Postnatal development of the energy apparatus of rat brain histaminergic neurons. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2021;19(6):636-645. [https://doi: 10.25298/2221-8785-2021-19-6-636-645](https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-6-636-645).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (M20M-089).

Financing. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (M20M-089).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Об авторах / About the authors

Зиматкин Сергей Михайлович / Zimatkin Sergey, e-mail: smzimatkin@mail.ru, ORCID: 0000-0001-5728-2588

*Заерко Анастасия Викторовна / Zaerko Anastasiya, e-mail: wersall_91@mail.ru

Федина Екатерина Михайловна / Phedina Katsiaryna, e-mail: phedina.katerina@mail.ru, ORCID: 0000-0002-6093-368

* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 11.10.2021

Принята к публикации / Accepted for publication: 24.11.2021