

© Коллектив авторов, 2012  
УДК 611.813.018.8:613.81:599.323.4

*С. М. Зиматкин, Е. М. Федина и В. Б. Кузнецова*

## ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ОСТРОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛКОГОЛЯ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. С. М. Зиматкин), Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

Цель работы — изучение гистаминергических нейронов мозга крысы после однократного введения алкоголя. Исследование проведено на беспородных белых крысах-самцах ( $n=41$ ), с использованием гистологических, гистохимических, морфометрических и электронно-микроскопических методов. Установлено, что через 1 ч после введения алкоголя в дозе 4 г/кг нейроны становятся более округлыми, в их цитоплазме снижается активность дегидрогеназ NADH и глюкозо-6-фосфата, возрастает активность лактатдегидрогеназы, моноаминоксидазы Б и кислой фосфатазы, развиваются значительные ультраструктурные нарушения. Через 6 ч после введения алкоголя в гистаминергических нейронах признаки повреждения уменьшаются и нарастают структурно-метаболические признаки адаптационных изменений.

**Ключевые слова:** головной мозг, гистаминергические нейроны, структура, метаболизм, алкоголь

Гистаминергическая система мозга играет важную роль в регуляции нейроэндокринной и сердечно-сосудистой систем, процессов сна и бодрствования, температурного гомеостаза, пищевого и питьевого поведения, памяти и обучения. Появляется всё больше данных об участии этой нейронной системы в механизмах действия алкоголя на мозг и патогенезе алкоголизма [1, 2, 8]. Однако влияние этанола на гистаминергическую систему мозга изучали только биохимическими методами, в гомогенатах целого мозга или крупных его отделов [3]. При этом действие алкоголя на гистаминергические нейроны (ГЕН) микроскопическими методами совершенно не исследовано. Известно, что перикарионы ГЕН мозга человека и животных расположены только в гипоталамусе, где они образуют 5 скоплений — ядер, самым крупным из которых является ядро E2, где сосредоточено более 95% этих нейронов [2, 4]. Классическими маркерами ГЕН являются гистамин [10] и фермент его синтеза гистидиндекарбоксилаза [12]. Поскольку ГЕН мозга участвуют в регуляции сна и бодрствования, обеспечивая пробуждение, целью данной работы было их изучение при введении наркотической дозы алкоголя.

Материал и методы. Исследование проведено на беспородных белых крысах-самцах ( $n=41$ ) массой  $175\pm 25$  г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Все

опыты проведены с учётом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). На данное исследование получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета. Подопытным животным (23 крысы) вводили 20% раствор этанола однократно, внутривенно, в дозе 4 г/кг, контрольным (13 крыс) — эквивалентный объем изотонического раствора хлорида натрия. Спустя 1 и 6 ч животных декапитировали. Быстро извлекали головной мозг, кусочки гипоталамуса для дальнейшего светооптического исследования замораживали и хранили в жидком азоте.

Серийные криостатные срезы (криостат CM 1840, Leica, Германия) окрашивали 0,1% толуидиновым синим по методу Ниссля, гистохимически выявляли в них активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), NADH-дегидрогеназы (NADH-ДГ), NADPH-дегидрогеназы (NADPH-ДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), кислой фосфатазы (КФ) [7], а также ключевого фермента метаболизма гистамина — моноаминоксидазы типа Б (МАО Б) [4, 5].

Размеры и форму перикарионов, а также ядер ГЕН оценивали в препаратах, окрашенных толуидиновым синим по методу Ниссля. Активность ферментов определяли цитофотометрически по оптической плотности полученного осадка хромогена в цитоплазме нейронов. При идентификации ГЕН ядра E2 мозга крысы использовали соответствующие топографические схемы и атласы [4, 9, 11], иммуногистохимический метод выявления в этих нейронах гистамина [10] и гистохимический метод определения активности МАО Б [5].

Для иммуногистохимического определения гистамина у 5 крыс после анестезии натрия пентобарбиталом проводи-

### Сведения об авторах:

*Зиматкин Сергей Михайлович* (e-mail: zimatkin@grsmu.by), *Федина Екатерина Михайловна*, *Кузнецова Вера Борисовна*, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь, 230015 Гродно, ул. Горького, 80

ли перфузию через левый желудочек сердца последовательно 200 мл 0,1 М фосфатно-солевого буфера, pH 7,4 (PBS) и 150 мл 4% холодного раствора 1-этил 3(3-диметиламинопропил) карбодимида (EDAC, Sigma, США) в PBS. Затем мозг извлекали, и кусочки гипоталамуса погружали на 3 ч в аналогичный фиксирующий раствор EDAC, после чего переносили на 1 сут в 20% раствор сахарозы в PBS при 4 °С, быстро замораживали и хранили в жидком азоте. Серийные криостатные срезы гипоталамуса толщиной 20 мкм обрабатывали первичными кроличьими антителами против гистамина НА 19С (разведение 1:1000, 1:2000, Университет г. Хельсинки, Финляндия) при 4 °С в течение 1 сут, а затем вторичными козыми антикроличьими антителами, меченными FITC (разведение 1:40, Sigma, США). Препараты заключали в PBS—глицерин (1:1) и хранили в холодильнике при 4 °С.

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию и цитофотометрию проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (Leica DFC 320, Германия), а также программы анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). В каждой экспериментальной группе оценивали не менее 120–150 нейронов, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки заднего отдела гипоталамуса фиксировали в глutarовом альдегиде, 1% OsO<sub>4</sub>, обезвоживали и заключали в эпоксидную смолу. На ультрамикротоме MT-7000 (RMC, США) готовили срезы, контрастировали их уранилацетатом и цитратом свинца, изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония), фотографировали с помощью цифровой

камеры (Olympus MegaView III, Германия). Морфометрию ультраструктур проводили с помощью программы для обработки изображений iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия), обводя курсором на мониторе компьютера митохондрии и лизосомы и оценивая их размеры и форму.

Полученные результаты анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). В описательной статистике для каждого показателя определяли значение медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Различия между показателями в контрольной и подопытной группах считали значимыми при P<0,05 (U-критерий Уилкоксона—Манна—Уитни).

**Результаты исследования.** ГЕН ядра E2 избирательно выявляются в заднем отделе гипоталамуса иммуногистохимически по содержанию гистамина и гистохимически по активности MAO B (рис. 1). Через 1 ч после однократного внутрибрюшинного введения этанола в дозе 4 г/кг, когда все животные находятся в состоянии алкогольного наркоза (сна), выявляется увеличение минимального диаметра перикарионов ГЕН, уменьшение их периметра и фактора элонгации и увеличение фактора формы (табл. 1), т.е. нейроны становятся более округлыми, сферичными. При этом площадь их сечения и объём существенно не меняются. Среди ГЕН возрастает

Таблица 1

**Характеристика гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса у крыс после введения алкоголя в дозе 4 г/кг (Me±IQR)**

Части нейрона	Параметры	Контроль	Срок от начала опыта, ч	
			1	6
Перикарион	Диаметр, мкм:			
	минимальный	12,7±1,1	13,2±1,1↑*	12,5±0,8↑ <sup>#</sup>
	максимальный	20,7±0,5	20,5±1,1	20,6±0,4
	Периметр, мкм	63,0±2,6	61,2±3,3↓*	57,7±4,4↓*** <sup>#</sup>
	Площадь, мкм <sup>2</sup>	206,4±25,9	213,2±12,0	206,9±15,0 <sup>#</sup>
	Объем, мкм <sup>3</sup>	2231,7±419,4	2342,7±200,2	2241,2±242,2↑ <sup>#</sup>
	Фактор формы	0,68±0,06	0,74±0,05↑*	0,76±0,03↑**
	Фактор элонгации	1,70±0,07	1,58±0,15↓*	1,61±0,14
Ядро	Диаметр, мкм:			
	минимальный	7,2±0,4	7,6±0,2↑**	7,3±0,8
	максимальный	11,2±0,4	10,6±0,5	10,3±0,7↓** <sup>#</sup>
	Периметр, мкм	31,1±1,8	29,7±1,8↓*	29,6±1,5
	Площадь, мкм <sup>2</sup>	61,4±4,5	63,7±3,5↑**	56,3±5,9↓ <sup>#</sup>
	Объем, мкм <sup>3</sup>	362,0±40,4	383,2±31,7↑**	318,39±50,7↓ <sup>#</sup>
	Фактор формы	0,80±0,03	0,86±0,04↑**	0,84±0,04
	Фактор элонгации	1,51±0,05	1,41±0,03	1,39±0,16↓*
ЯЦО	0,42±0,12	0,43±0,07	0,39±0,00	

Примечание. ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение; здесь и в табл. 2, 3: Me — медиана; IQR — интерквартильный диапазон; ↑ — статистически значимое увеличение изучаемого параметра; ↓ — статистически значимое снижение изучаемого параметра; \* при P<0,05, \*\* при P<0,01, \*\*\* при P<0,001 по сравнению с контролем; <sup>#</sup> при P<0,05 при сравнении подопытных групп.

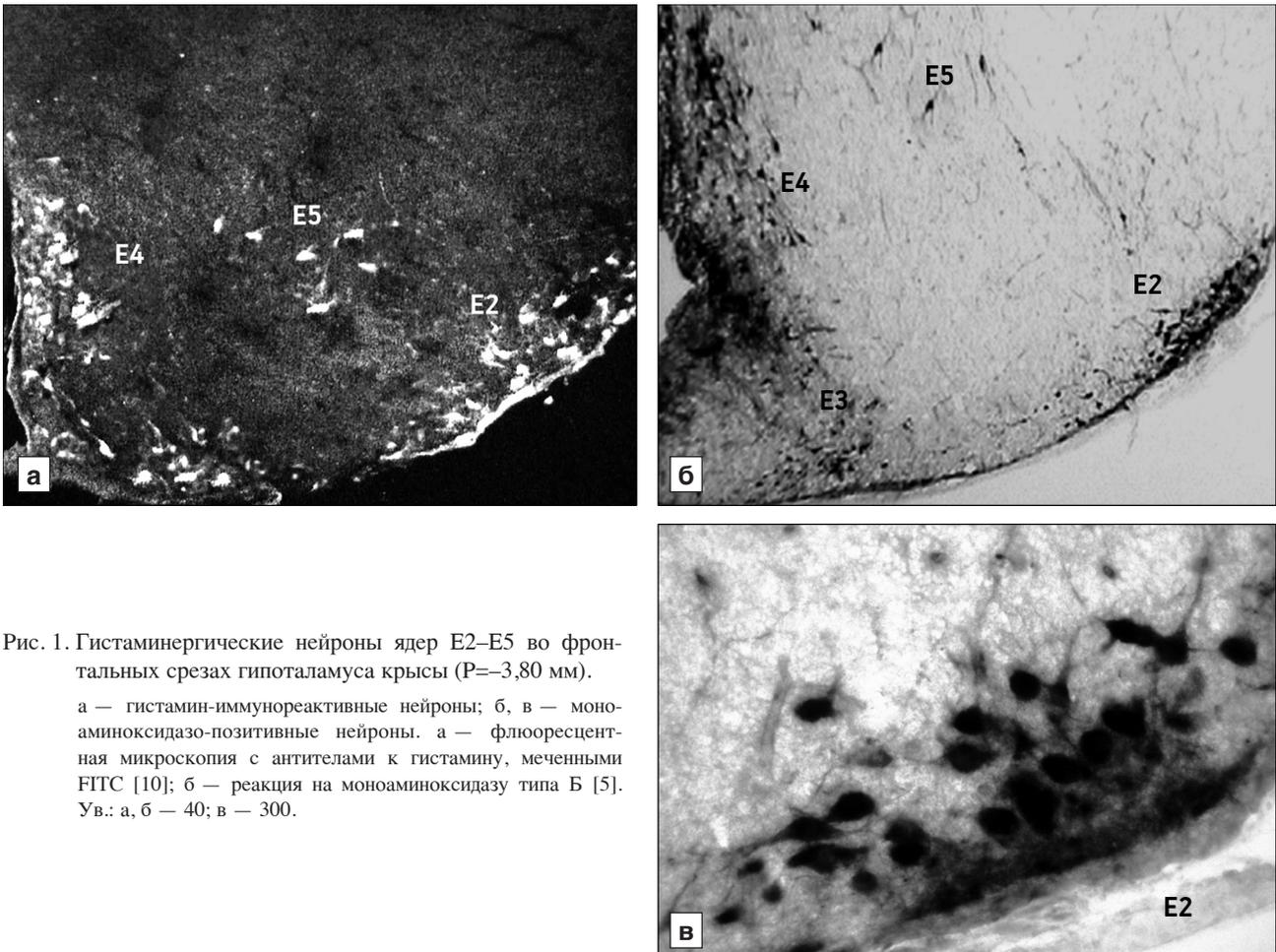


Рис. 1. Гистаминергические нейроны ядер E2–E5 во фронтальных срезах гипоталамуса крысы (P=–3,80 мм).  
 а — гистамин-иммунореактивные нейроны; б, в — моноаминоксидазо-позитивные нейроны. а — флюоресцентная микроскопия с антителами к гистамину, меченными FITC [10]; б — реакция на моноаминоксидазу типа Б [5].  
 Ув.: а, б — 40; в — 300.

число клеток-теней (с 2 до 5%). Наблюдается увеличение размеров и округление ядер исследованных нейронов: увеличивается их минимальный диаметр, площадь сечения и объем, уменьшается периметр и увеличивается фактор формы (см. табл. 1). При этом ядерно-цитоплазматическое отношение ГЕН значимо не изменяется.

Спустя 1 ч после введения этанола активность NADPH-ДГ и Г-6-ФДГ снижается на 17,6 и 22,9% соответственно по сравнению с контролем.

Активность ЛДГ возрастает на 12,3%, MAO Б — на 17,1%, а КФ — на 25,1%. Активность NADH-ДГ и СДГ существенно не меняется (табл. 2).

При этом в ГЕН выявляются значительные ультраструктурные изменения. Так, в ядрах нейронов ядрышки перемещаются к ядерной оболочке, ее складчатость возрастает, перинуклеарное пространство расширяется, наблюдается конденсация субъединиц рибосом вблизи внутренней ядерной мембраны в виде различных по форме и

Таблица 2

**Активность ферментов в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса у крыс после введения алкоголя в дозе 4 г/кг ( $M \pm IQR$ )**

Фермент	Контроль	Срок от начала опыта, ч	
		1	6
Г-6-ФДГ	0,31±0,01	0,24±0,03↓**	0,35±0,06↑***#
КФ	0,43±0,03	0,59±0,01↑**	0,49±0,02↑#
ЛДГ	0,42±0,02	0,48±0,03↑**	0,45±0,03↑**
MAO Б	0,64±0,05	0,76±0,05↑***	0,69±0,01↑***#
NADH-ДГ	0,61±0,01	0,63±0,01	0,67±0,03↑#
NADPH-ДГ	0,42±0,01	0,35±0,03↓***	0,45±0,02↑***#
СДГ	0,32±0,01	0,31±0,051	0,38±0,04↑***#

Различия показателей в подопытных группах значимы: # при  $P < 0,05$ ; ## при  $P < 0,01$ .

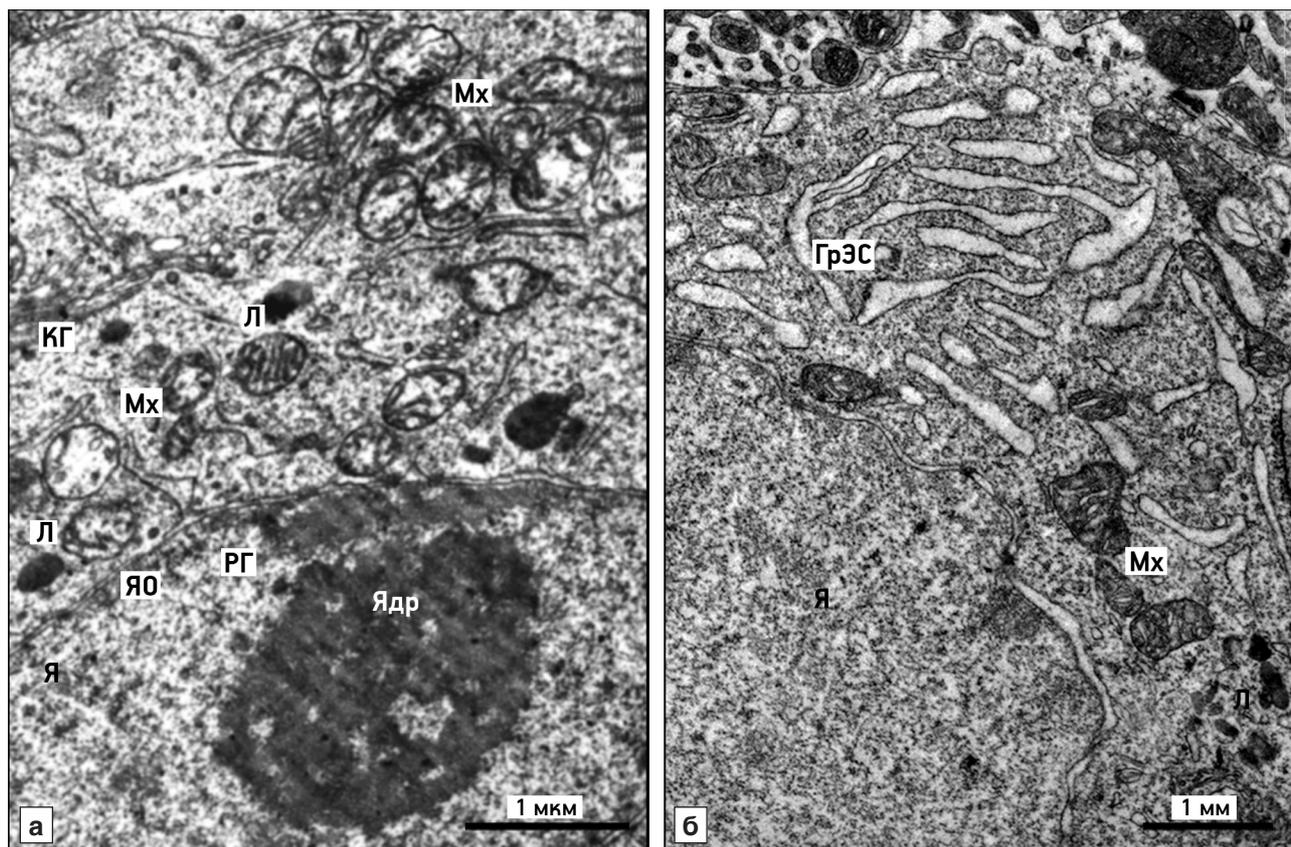


Рис. 2. Гистаминергические нейроны ядра E2 гипоталамуса крысы через 1 ч (а) и через 6 ч (б) после однократного внутрибрюшинного введения алкоголя в дозе 4 г/кг.

Я — ядро; Ядр — ядрышко; ЯО — ядерная оболочка; РГ — скопление рибонуклеопротеиновых гранул у ЯО; ГрЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть; Мх — митохондрии; Л — лизосомы; КГ — комплекс Гольджи.

величине конгломератов (рис. 2, а). В цитоплазме ГЕН возрастает полиморфизм митохондрий. Наряду с морфологически нормальными органеллами, выявляются набухшие митохондрии с различной степенью редукции крист, резким расширением промежутков между кристами и просветленным митохондриальным матриксом (см. рис. 2). Средние размеры митохондрий, их общая относительная площадь и количество на единице площади цитоплазмы значительно увеличиваются (табл. 3). Отмечена умеренная гипертрофия комплекса Гольджи, расширение канальцев эндоплазматической сети, сопровождающееся их фрагментацией с образованием пузырьков различного диаметра. В цитоплазме несколько увеличено количество рибосом и полисом. Значимо увеличиваются число и общая относительная площадь лизосом (на единице площади цитоплазмы ГЕН). При этом выявляются как огромные фаголизосомы, так и многочисленные мелкие первичные лизосомы (гидролазные пузырьки). Поэтому средний размер лизосом не возрастает (см. табл. 3).

Спустя 6 ч после введения наркотической дозы этанола, когда все животные уже бодрствуют,

минимальный диаметр перикарионов ГЕН гипоталамуса не отличается от контроля, периметр перикарионов становится ещё меньше, а фактор формы — больше (см. табл. 1). Число клеточек остается повышенным. Наблюдается уменьшение максимального диаметра и фактора элонгации ядер нейронов (см. табл. 1). Это указывает на сохранение повышенной сферичности перикарионов и ядер ГЕН.

Активность всех исследованных ферментов в цитоплазме ГЕН значительно увеличена: MAO Б — на 9,4%, NADH-ДГ — на 6,9%, NADPH-ДГ — на 7,0%, СДГ — на 13,8%, Г-6-ФДГ — на 13,7%, ЛДГ — на 8,9% и КФ — на 12,0% (см. табл. 2).

При этом в ГЕН сохраняются существенные ультраструктурные изменения. Наблюдается повышенная складчатость ядерной оболочки, увеличение числа ядерных пор и расширение перинуклеарного пространства. Происходит дальнейшая гипертрофия комплекса Гольджи и эндоплазматической сети, со значительным расширением её цистерн. Наряду с морфологически нормальными, часто встречаются крупные, удлинённые мито-

Таблица 3

**Характеристика органелл гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса у крыс  
после введения алкоголя в дозе 4 г/кг (Me±IQR)**

Органеллы	Параметры	Контроль	Срок от начала опыта, ч	
			1	6
Митохондрии	Площадь сечения, мкм <sup>2</sup>	0,09±0,03	0,14±0,08↑***	0,11±0,03↑***#
	Периметр, мкм	1,55±0,43	1,51±0,35	1,57±0,29
	Фактор формы	0,66±0,33	0,71±0,94	0,60±0,16↓**#
	Фактор элонгации	2,01±0,65	2,06±0,99	2,29±0,60↑**
	Общая относительная площадь, мкм <sup>2</sup> /100 мкм <sup>2</sup>	12,0±5,40	14,24±6,9↑*	13,55±7,58
	Количество на 100 мкм <sup>2</sup>	93,4±60,0	148,9±53,4↑**	113,0±56,3↑#
Лизосомы	Площадь, мкм <sup>2</sup>	0,06±0,02	0,06±0,04	0,07±0,03
	Периметр, мкм	0,97±0,35	1,02±0,28	0,97±0,14
	Фактор формы	0,77±0,11	0,75±0,10	0,86±0,09
	Фактор элонгации	1,63±0,44	1,51±0,45	1,91±0,25↑***#
	Общая относительная площадь, мкм <sup>2</sup> /100 мкм <sup>2</sup>	1,15±0,65	2,46±2,64↑*	1,53±0,72↑**
	Количество на 100 мкм <sup>2</sup>	16,1±30,4	29,8±22,3↑*	25,9±14,8↑*

хондрии с уплотнённым матриксом, контактирующие с ядром, комплексом Гольджи и эндоплазматической сетью (см. рис. 2, б). Средняя площадь митохондрий несколько уменьшается, но остаётся значимо больше, чем в контроле. Количество митохондрий на единице площади также уменьшается и уже не отличается от контрольного уровня. При этом их фактор элонгации увеличивается, а фактор формы уменьшается, что свидетельствует о вытягивании митохондрий и уменьшении их сферичности (см. табл. 3). В цитоплазме выявляются многочисленные рибосомы в виде полисом. Увеличено количество и относительная площадь, занимаемая лизосомами в цитоплазме нейронов, при этом их фактор элонгации возрастает (см. табл. 3).

**Обсуждение полученных данных.** Обнаруженное увеличение сферичности и округление перикарионов и ядер ГЕН гипоталамуса через 1 ч после введения наркотической дозы алкоголя может быть связано с токсическим набуханием и нарушением цитоскелета нейронов. Снижение активности в них NADPH-ДГ и Г-6-ФДГ указывает на торможение немитохондриальных энергетических процессов. При этом увеличение активности ЛДГ свидетельствует об усилении поздних этапов гликолиза, протекающих в анаэробных условиях и необходимых для компенсаторного поддержания жизнедеятельности нейронов. Увеличение активности в них ключевого фермента метаболизма гистамина — MAO Б свидетельствует об усилении окислительного дезаминирования гистамина и напряжённом функционировании этих нейронов. Об этом же свидетельствует и увеличение числа и площади

митохондрий, особенно через 1 ч после введения этанола. Пока не понятно функциональное значение уменьшения сферичности и удлинения митохондрий через 6 ч. Значительное усиление активности КФ и увеличение числа и относительной площади лизосом, особенно через 1 ч после введения этанола, отражает усиление процессов аутофагии, направленных на удаление поврежденных мембран и органелл в ГЕН в условиях токсического действия алкоголя. При этом процессы репарации (внутриклеточной регенерации) в нейронах идут параллельно с процессами деструкции.

В целом, полученные данные указывают на высокую чувствительность ГЕН мозга к алкоголю. Это объясняется высокой способностью аминергических нейронов окислять алкоголь и накапливать его токсический метаболит, ацетальдегид [13]. Поскольку ГЕН участвуют в регуляции сна и бодрствования, их токсическое повреждение после введения наркотической дозы этанола может быть одной из причин алкогольиндуцированного сна.

Активация ядерного аппарата и гипертрофия различных органелл ГЕН, тесные контакты митохондрий с ядром и другими органеллами, особенно через 6 ч после введения алкоголя, трактуются как отражение усиленного функционирования нейронов [6]. Гипертрофия и перемещение ядрышек к ядерной оболочке, конденсация субъединиц рибосом вблизи внутренней ядерной мембраны, расширение перинуклеарного пространства и возрастание складчатости ядерной оболочки, а также гипертрофия митохондрий, эндоплазматической сети и комплекса Гольджи, вероятно, связаны с напряженным функционированием нейронов в

процессе их адаптации к токсическому действию этанола. Всё это обеспечивает высокую пластичность и компенсаторные процессы, приводящие к быстрому восстановлению функций этих нейронов, способствующих прекращению алкогольно-индуцированного сна и пробуждению животных. Структурно-метаболические признаки активации ГЕН особенно заметны через 6 ч после введения этанола, когда активность всех изученных ферментов в их цитоплазме повышена.

Таким образом, введение наркотической дозы этанола крысам вызывает повреждение ГЕН мозга, а также адаптационные, зависимые от времени, структурно-метаболические изменения, направленные на восстановление их функций. Это может отражать участие исследованных нейронов в регуляции алкогольно-индуцированного сна у крыс.

*Авторы благодарят профессора Перти Панюля (Университет г. Хельсинки, Финляндия) за любезно предоставленные антитела для выявления гистамина.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анищик О. В. и Зиматкин С. М. Центральная гистаминергическая система в норме и при некоторых патологических состояниях. Изв. НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук, 2002, № 2, с. 94–102.
2. Зиматкин С. М. Гистаминергическая система мозга. Гродно, Изд-во ГрГМУ, 2007.
3. Зиматкин С. М. и Бонь Е. И. Гистаминергическая система мозга и алкоголь. Журн. ГрГМУ, 2009, № 1, с. 27–30.
4. Зиматкин С. М., Кузнецова В. Б. и Стрик О. Н. Пространственная организация и морфометрическая характеристика гистаминергических нейронов мозга крысы. Морфология, 2005, т. 127, вып. 2, с. 27–30.
5. Зиматкин С. М. и Цыдик В. Ф. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге. Морфология, 1994, т. 106, вып. 4, с. 157–161.
6. Манина А. А. Ультраструктурные изменения и репаративные процессы в центральной нервной системе при различных воздействиях. Л., Медицина, 1971.
7. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М., Изд-во иностр. лит-ры, 1962.
8. Brabant C., Alleva L., Quertemont E. et al. Involvement of the brain histaminergic system in addiction and addiction-related

behaviors: A comprehensive review with emphasis on the potential therapeutic use of histaminergic compounds in drug dependence. *Prog. Neurobiol.*, 2010, v. 92, p. 421–441.

9. Inagaki N., Toda K. and Taniuchi I. 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.
10. Panula, P., Hapola, O., Airaksinen, M. S. et al. Carbodibmide as a tissue fixative in histamine immunohistochemistry and its application in developmental neurobiology. *J. Histochem. Cytochem.*, 1988, v. 36, p. 259–269.
11. Paxinos G. and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. London, Acad. Press., 2007.
12. Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S. et al. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.*, 1984, v. 295, p. 13–25.
13. Zimatkin S. M. and Lindros K. O. Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol Alcohol*, 1996, v. 31, p. 167–174.

Поступила в редакцию 15.03.2012  
Получена после доработки 07.05.2012

#### **BRAIN HISTAMINERGIC NEURONS IN RATS SUBJECTED TO THE ACUTE EFFECT OF ALCOHOL**

*S. M. Zimatkin, Ye. M. Fedina and V. B. Kuznetsova*

The purpose of the present investigation was to examine the effect of single injection of alcohol on histaminergic neurons of rat brain. The study included 41 male albino rats, histological, histochemical, electron microscopic and morphometric methods were used. It was found that 1 hour after the intraperitoneal administration of ethanol in a dose of 4 g/kg the neurons become more spherical, the activity of NADH and glucose-6-phosphate dehydrogenases in their cytoplasm decreased, but the activity of lactate dehydrogenase, type B monoaminoxidase and acid phosphatase increased, at the same time significant ultrastructural disturbances were observed. Six hours following alcohol administration, the signs of histaminergic neuronal damage were reduced while the features of structural and metabolic adaptation became more expressed.

**Key words:** *brain, histaminergic neurons, structure, metabolism, alcohol*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, Belarus