

С. М. Зиматкин и Е. М. Федина

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ МОЗГА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИЯХ АЛКОГОЛЯ

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

Цель исследования — анализ ультраструктурных изменений, развивающихся в гистаминергических нейронах мозга 24 беспородных белых крыс-самцов после введения этанола в остром эксперименте (внутрибрюшинно однократно в дозе 1 и 4 г/кг), при подостром воздействии (в качестве единственного источника питья в дозе 4 г/кг в течение 7 сут), или хроническом введении (в дозе 2–3 г/кг в сутки в течение 6 мес). Установлено, что при введении в организм алкоголя в ядре и органеллах гистаминергических нейронов развиваются разнообразные ультраструктурные изменения. Они отражают процессы деструкции нейронов, а также адаптационные изменения, направленные на восстановление и поддержание их функций. Эти изменения имеют неспецифический характер, зависят от дозы, срока после введения и продолжительности введения алкоголя и, в целом, соответствуют выявленным на светооптическом уровне структурным и гистохимическим изменениям.

Ключевые слова: головной мозг, гистаминергические нейроны, ультраструктура, алкоголь

Гистаминергические нейроны были описаны в мозгу животных и человека около 30 лет назад. Их тела располагаются только в задней гипоталамической области, образуя 5 скоплений — ядер (E1–E5), аксоны от которых идут во все отделы мозга, регулируя активность других нейромедиаторных систем. Накоплено большое количество данных об их строении, функциях, развитии в филогенезе и онтогенезе, участии в регуляции многих функций, процессов и систем организма [1, 10]. В литературе имеются данные о влиянии алкоголя на метаболизм гистамина в мозгу и об особенностях гистаминергической системы мозга у животных с различной врожденной устойчивостью и влечением к алкоголю [2, 13]. Однако влияние этанола на гистаминергические нейроны мозга микроскопическими методами не изучено.

Целью настоящей работы явился анализ ультраструктурных изменений, развивающихся в гистаминергических нейронах мозга при однократном (остром), многократном (подостром) и хроническом воздействии алкоголя.

Материал и методы. В работе использован материал от 24 беспородных белых крыс-самцов массой 175±25 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Все опыты выполнены 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. При остром воздействии животные получали 20% раствор

этанола внутрибрюшинно, однократно, в дозе 1 г/кг (малая) и 4 г/кг (большая, наркотическая), после чего их выводили из эксперимента декапитацией спустя 1 и 6 ч. При подостром воздействии животные получали этанол в дозе 4 г/кг ежедневно в течение 7 сут, их умерщвляли через 24 ч после последнего введения. При хроническом воздействии крысы в течение 6 мес получали 20% раствор этанола в качестве единственного источника питья [потребление его составляло 2–3 г/(кг/сут)]. Контрольные животные получали параллельно инъекции изотонического раствора хлорида натрия в таком же объеме или потребляли вместо раствора этанола воду.

После декапитации быстро извлекали головной мозг, кусочки заднего отдела гипоталамуса, содержащие гистаминергические нейроны ядра E2, фиксировали в глутаральдегиде, 1% OsO₄, обезвоживали и заключали в эпоксидную смолу. Расположение гистаминергических ядер определяли с помощью стереотаксического атласа [14] и топографических схем [3, 11]. 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 проводили, используя программу для обработки изображений iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия), при этом обводили курсором на мониторе компьютера цитоплазму гистаминергических нейронов, а также митохондрии и лизосомы, подсчитывали количество и оценивали размеры и форму данных органелл. В каждом случае в контрольной и подопытной группе измерения проводили на электронно-микроскопических фотографиях 30 нейронов. Измеренные параметры органелл на каждом снимке пересчитывали на 100 мкм² площади цитоплазмы гистаминергических нейронов. Полученные результаты анализировали методами непа-

Сведения об авторах:

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

раметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США).

Результаты исследования. У контрольных крыс в ядрах гистаминергических нейронов выявляются преимущественно мелкодисперсный хроматин и центрально расположенные ядрышки; перинуклеарное пространство не расширено. Цитоплазма этих нейронов богата органеллами. Митохондрии овальной и круглой формы, преимущественно средних размеров, с плотно расположенными кристами. Хорошо развита гранулярная эндоплазматическая сеть, цистерны которой не расширены и располагаются упорядоченно. В цитоплазме выявляется значительное количество свободных рибосом, преимущественно в виде полисом. Хорошо развит комплекс Гольджи, представленный как плоскими цистернами, так и большим количеством вакуолей и пузырьков. Выявляются первичные мелкие лизосомы, заполненные гомогенным веществом равномерной электронной плотности, и единичные вторичные лизосомы малых и средних размеров с гетерогенным зернистым содержимым (рисунки, а).

При введении животным этанола в гистаминергических нейронах мозга обнаруживаются разнообразные ультраструктурные изменения как общие для всех режимов введения, так и зависящие от дозы, срока после введения и продолжительности воздействия алкоголя. Так, независимо от дозы и продолжительности введения, этанол приводит к гипертрофии и перемещению ядрышек к ядерной оболочке, скоплению электронноплотного гранулярного материала (возможно, субъединиц рибосом) между ядрышком и ядерной оболочкой, перемещению его в цитоплазму (см. рисунок, б), увеличению складчатости ядерной оболочки, расширению перинуклеарного пространства, увеличению числа ядерных пор и даже к локальному разрушению ядерной оболочки.

В случае 7-суточного введения алкоголя в дозе 4 г/кг в ядрах гистаминергических нейронов были обнаружены вакуоли, полости неправильной формы с гомогенным электронно-прозрачным содержимым, окруженные мембраной (см. рисунок, в).

Через 1 ч после введения малой дозы и через 24 ч после последнего 7-суточного введения наркотической дозы алкоголя в цитоплазме отдельных гистаминергических нейронов выявляются структуры круглой или овальной формы, размером около 1–2 мкм, иногда частично окруженные ядерной оболочкой и состоящие из гранулярного осмиофильного материала с участками просветле-

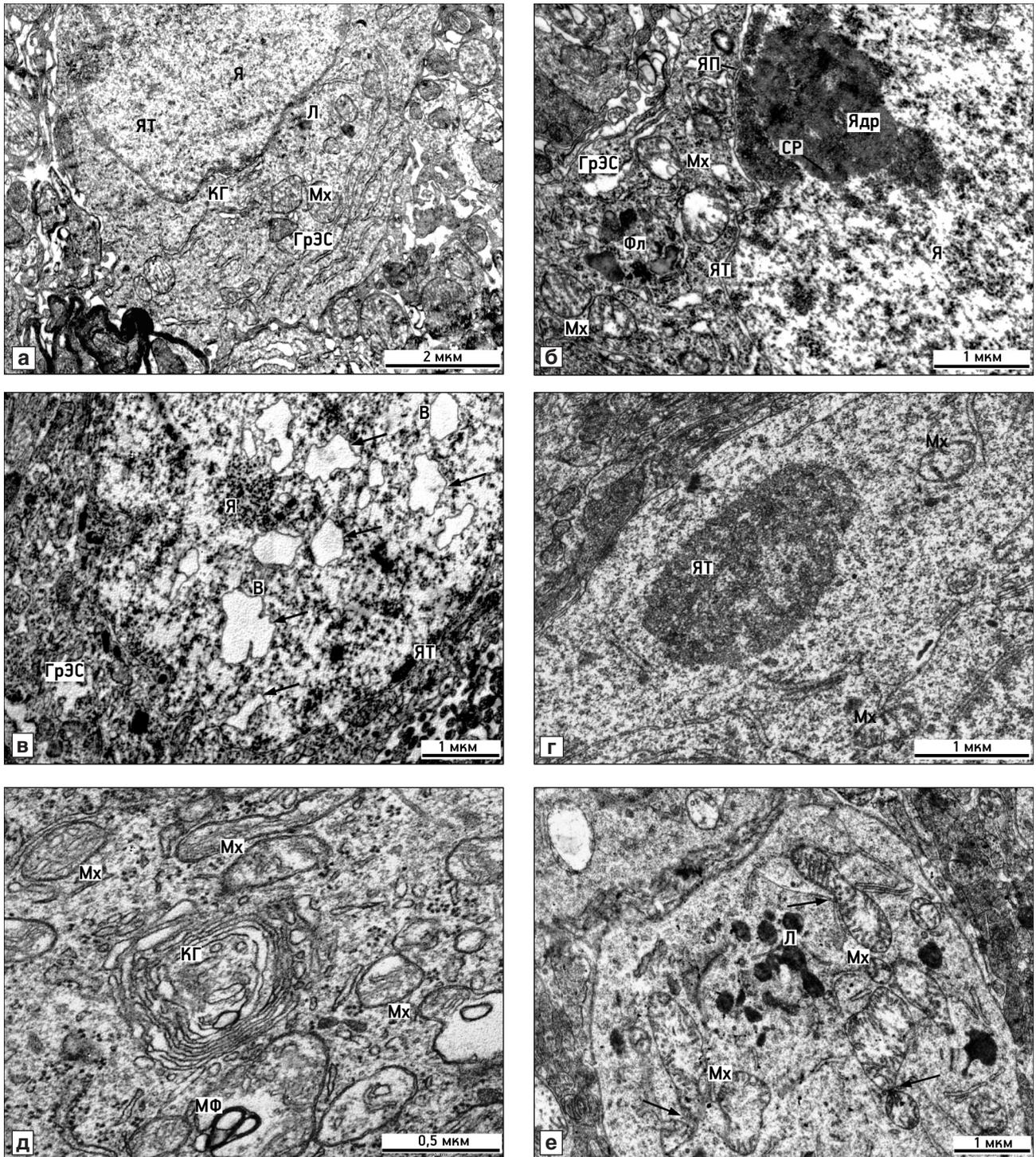
ния, очень напоминающие ядрышки — ядрышкоподобные тельца (см. рисунок, г).

Ещё одним ультраструктурным феноменом, особо часто наблюдаемым в цитоплазме гистаминергических нейронов при однократном или многократном воздействии алкоголя в большой дозе, является замыкание стопок цистерн комплекса Гольджи в кольца, а также появление в цитоплазме нейронов необычных слоистых структур и миеліноподобных фигур (см. рисунок, д).

Большая доза алкоголя и хроническое его потребление приводят к расширению каналов эндоплазматической сети (см. рисунок, б, в), к значительному увеличению числа свободных рибосом (см. рисунок, г). При этом всегда происходит гипертрофия, а иногда и гиперплазия митохондрий, сопровождаемая их набуханием, с фрагментацией и деструкцией крист (см. рисунок, б, д). Иногда наблюдаются поперечные перетяжки митохондрий, особенно спустя 1 ч после однократного введения крысам алкоголя (см. рисунок, е); происходит увеличение их числа (на 59%) и средней площади (на 56%). Спустя 6 ч после введения наркотической дозы алкоголя, средняя площадь митохондрий остается повышенной (на 22%). После 7-суточной алкогольной интоксикации число этих органелл возрастает на 20%, а относительная их площадь — на 27%. Хроническая алкоголизация приводит к увеличению средней площади митохондрий на 27%. Иногда гипертрофированные митохондрии скапливаются и тесно прилежат к ядру, эндоплазматической сети или комплексу Гольджи (см. рисунок, б, д).

Во всех экспериментах воздействие алкоголя приводит к гипертрофии и гиперплазии лизосом. Хотя через 1 ч после введения этанола в малой дозе количество и размеры лизосом увеличиваются незначительно, через 1 ч после введения его в большой дозе количество лизосом на единицу площади цитоплазмы гистаминергических нейронов возрастает на 85%, а их относительная площадь — в 2 раза. Через 6 ч после введения алкоголя в дозе 4 г/кг число лизосом увеличивается на 61%, а относительная площадь — на 33%. При 7-суточной алкогольной интоксикации количество этих органелл на единицу площади цитоплазмы и относительная площадь возрастают в 2 раза, а средняя площадь увеличивается на 50%. При хроническом потреблении алкоголя число лизосом увеличивается в 4 раза, средняя площадь — на 60%, а относительная площадь — в 2 раза.

Обсуждение полученных данных. Теоретически, гистаминергические нейроны должны быть очень чувствительны к этанолу, поскольку все аминергические нейроны мозга способны



Ультраструктура гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса у крыс контрольной группы и при воздействиях алкоголя.

а — гистаминергический нейрон контрольной крысы; б — гистаминергический нейрон после хронического потребления алкоголя; в — вакуоли (стрелки) в ядре гистаминергического нейрона у крысы после 7-суточной алкогольной интоксикации; г — ядрышкоподобное тельце, окружённое многочисленными свободными полирибосомами в цитоплазме гистаминергического нейрона через 1 ч после введения алкоголя в дозе 1 г/кг; д — кольцевидный комплекс Гольджи и миелоноподобная фигура в цитоплазме гистаминергического нейрона через 1 ч после 1-кратного введения алкоголя в дозе 4 г/кг; е — участок цитоплазмы гистаминергического нейрона через 1 ч после 1-кратного введения алкоголя. Набухшие митохондрии с поперечными перетяжками (стрелки). В — вакуоли в ядре; ГрЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть; КГ — комплекс Гольджи; Л — лизосомы; МФ — миелоноподобная фигура; Мх — митохондрии с различной степенью деструкции; СР — субъединицы рибосом; Фл — фаголизосомы; Я — ядро; Ядр — ядрышко; ЯТ — ядрышкоподобное тельце; ЯП — ядерная пора

активно окислять алкоголь (с помощью фермента каталазы) и накапливать его токсический метаболит — ацетальдегид (из-за низкой активности в них фермента, окисляющего ацетальдегид, — альдегиддегидрогеназы) [15]. Этим объясняются описанные выше повреждения ультраструктур гистаминергических нейронов, что соответствует на светооптическом уровне появлению большого числа гиперхромных нейронов, клеток-теней и гибели до 5% нейронов после субхронического и хронического воздействия алкоголя [4, 8]. С другой стороны — на ультраструктурном уровне в гистаминергических нейронах хорошо выражены компенсаторные и адаптационные изменения, направленные на поддержание жизнеспособности этих важных нервных клеток, а значит, и всего организма в условиях алкогольной интоксикации.

Так, гипертрофия и перемещение ядрышек к ядерной оболочке, усиленное образование и выход в цитоплазму субъединиц рибосом, расширение перинуклеарного пространства, возрастание складчатости оболочки ядра и числа ядерных пор могут отражать активацию ядерного аппарата исследуемых нейронов для усиления биосинтеза белков и других соединений в клетке. Этому же служат гипертрофия и гиперплазия эндоплазматической сети, относительное увеличение числа свободных рибосом. Последнее может свидетельствовать о переключении синтетического аппарата на обеспечение собственных нужд клетки для восполнения утраченных структур в процессе адаптации к токсическому воздействию [7].

Ядрышкоподобные тельца в цитоплазме гистаминергических нейронов, выявляемые после введения этанола, были описаны ранее в нейронах и олигодендроцитах гипоталамической области при различных экспериментальных воздействиях [12], а также в нейронах передней амигдаларной области у гонадэктомированных крыс [9]. Биологический смысл появления ядрышкоподобных телец может быть следующим. При введении этанола возникает необходимость в быстрой адаптационной перестройке гистаминергических нейронов. Для этого необходим синтез большого количества белков (как ферментных, так и структурных), чему должно предшествовать быстрое образование большого числа рибосом в цитоплазме, субъединицы которых образуются в ядрышках, массово перемещаются в цитоплазму и иногда образуют там центры агрегации с образованием ядрышкоподобных структур в нуждающихся отделах клетки [9]. Такие тельца, содержащие субъединицы рибосом, в цитоплазме описаны также как «стрессорные гранулы» [6]. Они возникают в клетках, в том числе и ней-

ронах, в ответ на стресс, и представляют собой скопления неполных инициаторных комплексов, содержащих связанную с белками иРНК и малые субъединицы рибосом. Функциональное значение данных гранул остается непонятным. Возможно, их роль состоит в подавлении трансляции определенных иРНК, препятствующем их быстрой деградации в цитоплазме. Стрессорные гранулы можно представить как неполные инициаторные комплексы [6].

Образование в ядре вакуолей — полостей неправильной формы с гомогенным содержимым, окруженных мембраной, наблюдавшееся после многократного введения большой дозы этанола, ранее отмечено в других типах нейронов при развитии в них деструктивных процессов [7]. С нашей точки зрения, это может быть следствием расширения перинуклеарного пространства с отшнуровываниями внутренней ядерной мембраны.

Появление в гистаминергических нейронах слоистых, миелиноподобных фигур, наблюдаемых при алкогольной интоксикации, является признаком напряженного функционирования клеток и даже их истощения [7] и коррелирует на светооптическом уровне с увеличением числа гиперхромных нейронов и клеток-теней при воздействии этанола [5, 8].

Несмотря на деструктивные изменения в митохондриях при больших дозах этанола (что соответствует снижению активности дегидрогеназ сукцината и NADH в цитоплазме гистаминергических нейронов на светооптическом уровне), многие из них гипертрофированы, с повышенной плотностью расположения крист. Такие предположительно гиперактивные митохондрии скапливаются вблизи ядерной оболочки, гипертрофированных комплекса Гольджи и эндоплазматической сети, вероятно, обеспечивая повышенную потребность ядра и органелл в энергии [7]. Это может быть связано с увеличением энергозатрат в клетке, необходимых для усиления синтетических процессов, обеспечивающих их адаптацию к воздействию алкоголя. О напряженном функционировании нейронов свидетельствует и увеличение числа и площади митохондрий при всех режимах воздействия алкоголя.

Гипертрофия и гиперплазия лизосом, сопровождаемые активацией их маркерного фермента — кислой фосфатазы в цитоплазме гистаминергических нейронов [4, 5, 8], очевидно, отражают усиление процессов аутофагии, направленных на удаление поврежденных мембран и органелл нейронов в условиях токсического действия на последние алкоголя и адаптации к нему.

Активация ядерного аппарата и гипертрофия различных органелл гистаминергических нейронов, тесные контакты митохондрий с ядром и другими органеллами, особенно через 6 ч после введения алкоголя, трактуются как отражение усиленного функционирования нейронов [7].

Таким образом, при введении в организм алкоголя в гистаминергических нейронах мозга развиваются разнообразные ультраструктурные изменения, отражающие процессы деструкции, повреждения, а также адаптационные изменения, направленные на восстановление и поддержание их функций и являющиеся признаками защитных реакций организма, необходимых для поддержания гомеостаза в создавшихся условиях токсического воздействия алкоголя. Эти изменения зависят от дозы, срока после введения и продолжительности воздействия алкоголя и в целом соответствуют выявленным на светооптическом уровне структурным и гистохимическим изменениям. По отдельности все они имеют неспецифический характер, поскольку описаны при разных экспериментальных воздействиях и в других типах нейронов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зиматкин С.М. Гистаминергическая система мозга: монография. Гродно, изд. ГрГМУ, 2007.
2. Зиматкин С.М. и Бонь Е.И. Гистаминергическая система мозга и алкоголь. Журн. ГрГМУ, 2009, № 1, с. 27–30.
3. 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.
4. Зиматкин С.М. и Федина Е.М. Гистаминергические нейроны мозга крысы после хронической алкогольной интоксикации. Новости мед.-биол. наук, 2012, т. 5, вып. 2, с. 137–144.
5. Зиматкин С.М., Федина Е.М. и Кузнецова В.Б. Гистаминергические нейроны мозга крысы после острого воздействия алкоголя. Морфология, 2012, т. 142, вып. 5, с. 17–22.
6. Иванов П.А. и Надеждина Е.С. Стрессовые гранулы: РНП-содержащие цитоплазматические тельца, возникающие в ответ на стресс. Состав и механизмы формирования. Молекул. биол., 2006, т. 40, № 6, с. 937–944.
7. Манина А.А. Ультраструктурные изменения и репаративные процессы в центральной нервной системе при различных воздействиях. Л., Медицина, 1971.

8. Федина Е.М. и Зиматкин С.М. Влияние семидневной алкогольной интоксикации на гистаминергические нейроны мозга крысы. Журн. ГрГМУ, 2012, № 3, с. 43–45.
9. Хисматуллина З.Р., Ахмадеев А.В., Шарафутдинова Л.А. и Калимуллина Л.Б. Цитологические характеристики нейронов передней амигдаллярной области и их реактивных изменений на фоне различных уровней половых стероидов. Цитология, 2008, т. 50, № 5, с. 381–387.
10. Haas H., Sergeeva O. and Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol. Rev.*, 2008, v. 88, № 3, p. 1183–1241.
11. 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.
12. Kawabata I. Electron microscopy of the rat hypothalamic neurosecretory system. II. Nucleolus-like inclusion bodies in the cytoplasm of neurosecretory cells. *Arch. Histol. Jpn.*, 1965, v. 26, № 2, p. 101–113.
13. Panula P. and Nuutinen S. Histamine and H3 receptor in alcohol-related behaviors. *J. Pharmacol. Exp.*, 2011, v. 336, № 1, p. 9–16.
14. Paxinos G. and Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London, Acad. Press, 2007.
15. 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 28.02.2014

Получена после доработки 05.05.2014

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN BRAIN HISTAMINERGIC NEURONS UNDER THE INFLUENCE OF ALCOHOL

S.M. Zimatkin and Ye.M. Fedina

The aim of the present study was to investigate the ultrastructural changes developing in histaminergic neurons of the brain of 24 outbred albino male rats after administration of ethanol in the acute experiment (single intraperitoneal dose of 1 and 4 g/kg), subacute exposure (as the sole source of drinking at a dose of 4 g/kg for 7 days), or chronic administration (at a dose of 2–3 g/kg/day for 6 months). After alcohol administration histaminergic neurons were found to develop various ultrastructural changes of their nucleus and organelles. They reflect the processes of neuron destruction, as well as adaptive changes aimed at restoring and maintaining their functions. These changes were nonspecific and depended on the dose, time after injection and duration of alcohol administration. In general they corresponded to the structural and histochemical changes observed at light-microscopic level.

Key words: *brain, histaminergic neurons, ultrastructure, alcohol*

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