

© Коллектив авторов, 2007
УДК 611.814.1:612.357:599.323.4

С.М. Зиматкин¹, О.В. Барабан¹ и С.В. Емельянчик²

СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ ПРИ ПОТЕРЕ ЖЕЛЧИ

¹ Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. С.М. Зиматкин) Гродненского государственного медицинского университета; ² кафедра зоологии и физиологии человека и животных (зав. — д-р биол.наук Н.П. Канунникова) Гродненского государственного университета им. Я. Купалы, Беларусь

Целью исследования явилась оценка структурных и метаболических изменений в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса крысы при полном наружном отведении желчи. Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар (n=45). Контролем служили животные, которым проводили ложную операцию при сохранении физиологического оттока желчи на протяжении всего эксперимента. Использованы количественные гистологические и гистохимические методы. На серийных фронтальных криостатных срезах заднего гипоталамуса выявляли активность следующих ферментов: моноамин-оксидазы Б; сукцинатдегидрогеназы; NADH-дегидрогеназы; NADPH-дегидрогеназы; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; лактатдегидрогеназы и кислой фосфатазы. Морфологическое исследование гистаминергических нейронов проводили на препаратах, окрашенных тионином. Установлено, что полное наружное отведение желчи приводит к временному уменьшению размеров и округлению их перикарионов. Метаболические изменения выявляются уже на 1-е сутки потери желчи и в дальнейшем прогрессируют. На 5-е сутки отмечается подавление всех путей энергетического метаболизма и возрастание активности кислой фосфатазы.

Ключевые слова: головной мозг, гистаминергические нейроны, морфометрия, гистохимия, желчь.

Гистаминергическая нейронная система мозга участвует в регуляции многих функций, систем и реакций организма: сна и бодрствования, двигательной активности, пищевого и питьевого поведения, памяти и обучения, терморегуляции, боли и стресса, в механизмах нейрогормональной регуляции и кардиоваскулярного контроля [12]. Тела гистаминергических нейронов мозга животных и человека расположены только в заднем гипоталамусе, где они образуют 5 скоплений (ядер) — E1–E5 [11]. При этом ядро E2 является самым крупным и функционально активным, в нём сосредоточено больше половины гистаминергических нейронов мозга [5]. В настоящее время нет достаточных подтверждений того, что эти 5 групп нейронов выполняют различные функции, поэтому их можно рассматривать как единую функциональную группу [4]. Аксоны гистаминергических нейронов распространяются во все отделы мозга, регулируя другие нейротрансмиттерные и морфофункциональные системы ЦНС. Гистамин синтезируется в гистаминергических нейронах из аминокислоты L-гистидина с участием фермента гистидиндекарбоксилазы. Специфические и эффективные системы обратного захвата гистамина в ЦНС не обнаружены, и поэтому он инактивируется после выделения только путем метаболизма, при участии ферментов гистамин-N-метилтрансферазы, моноаминоксидазы типа Б (МАО Б) и альдегиддегидрогеназы [12].

При нарушениях энтерогепатической циркуляции желчи происходят изменения психики и поведения человека и животных, функций мозга, процессов анализа и синтеза, возбуждения и торможения, электроимпульсной активности коры большого мозга, кортико-висцеральных и висцеро-кортикальных рефлекторных взаимосвязей [7, 10]. Однако гистологические исследования головного мозга при нарушениях оттока желчи единичны и касаются только холестаза.

Для лечения наиболее распространённой в мире патологии гепатобилиарной системы — желчекаменной болезни в клинике в качестве вынужденной меры используется хирургическое дренирование желчных путей [7], что фактически приводит к наружному отведению желчи и полной её потере организмом. Между тем желчь — важный секрет печени, содержащий желчные кислоты, фосфолипиды, холестерин, билирубин, белки [8]. Желчь эмульгирует жиры и обеспечивает лучшее всасывание в кишечнике жирных кислот, холестерина, жирорастворимых витаминов, стимулирует моторику кишечника, оказывает бактериостатическое действие на кишечную флору, участвует во многих обменных процессах. Значение желчи проявляется функциональными и структурными нарушениями, которые возникают в организме больных при её хронической потере: нарушения обмена кальция, кислотно-щелочного равновесия крови, развитие геморрагического диатеза, снижение альбумина в крови, нарушения деятельности

ти печени и почек, а также нервной системы [2]. При этом, однако, совершенно не изучено состояние определённых морфофункциональных систем и типов клеток мозга, в частности, гистаминергических нейронов гипоталамуса.

Цель данного исследования — выявить структурные и метаболические изменения в нейронах гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крыс при полном наружном отведении желчи.

Материал и методы. Исследование проведено с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» на 45 крысах-самцах линии Вистар массой 250 ± 50 г. Моделирование полного наружного отведения желчи осуществляли путём наложения фистулы общего желчного протока по методике Л.С. Василевской [1]. После 12-часового голодания под эфирным наркозом крысам делали лапаротомию, сразу ниже места слияния долевых печеночных протоков вскрывали общий желчный проток и в его проксимальную часть вводили на 3–4 мм полиэтиленовый катетер длиной 4–5 см, соединенный с носиком стеклянного желчеприемника. Для герметичности катетер фиксировали в протоке шелковой лигатурой, а вторую лигатуру накладывали чуть ниже первой, на дистальный участок протока с целью предотвращения регургитации содержимого общего желчного протока в брюшную полость. Желчеприемник фиксировали тремя шелковыми лигатурами к коже животного, что обеспечивало свободное перемещение крысы по клетке. Животным контрольных групп производили ложную операцию, и на протяжении всего эксперимента у них сохранялся физиологический отток желчи. Через 1, 3 и 5 сут после операции животных декапитировали под эфирным наркозом. Быстро вскрывали черепную коробку, извлекали головной мозг и выделяли из него гипоталамус, который замораживали и хранили в жидком азоте. Серийные фронтальные срезы заднего гипоталамуса толщиной 20 мкм готовили в криостате при температуре -15°C , ориентируясь по схемам стереотаксического атласа [14]. Гистаминергическое ядро E2 находили по схемам расположения гистаминергических ядер гипоталамуса [5, 11].

Криостатные срезы окрашивали тионином по методу Ниссля и ставили реакцию выявления активности основного гистаминкатаболизирующего фермента MAO Б [6], который служил маркером гистаминергических нейронов гипоталамуса [5]. Для определения особенностей общего метаболизма гистаминергических нейронов соседние криостатные срезы обрабатывали общепринятыми гистохимическими методами, выявляющими активность оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса — сукцинатдегидрогеназы (СДГ), гликолизом — лактатдегидрогеназы (ЛДГ), с транспортом электронов — NADH-ДГ и NADPH-ДГ, с пентозофосфатным путем — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-Ф ДГ) и кислой фосфатазы (КФ) — маркерного фермента лизосом [9].

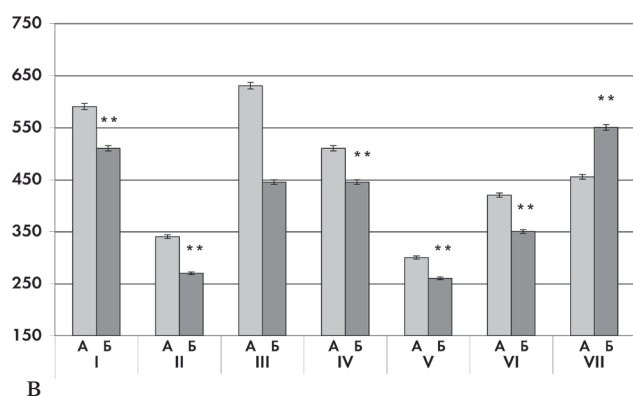
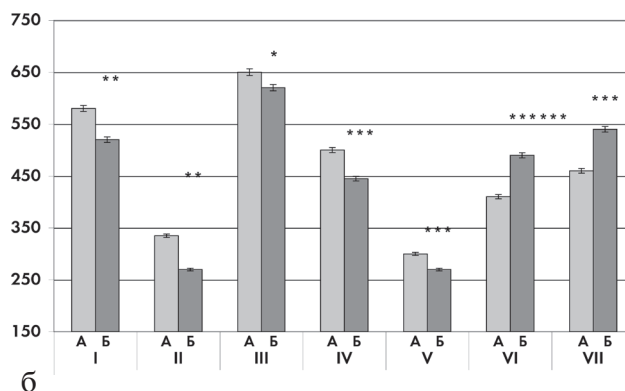
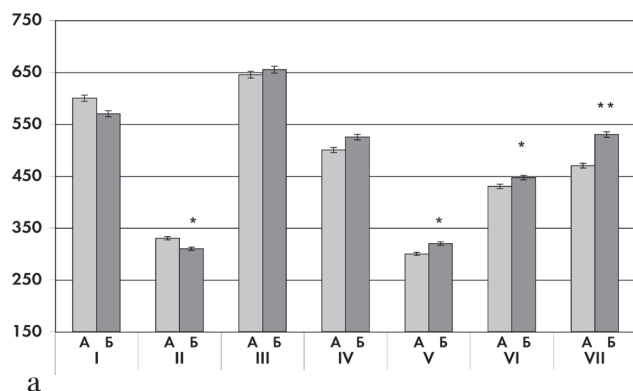
Количественное определение морфометрических и цитофотометрических параметров проводили при помощи компьютерного анализатора изображения «Bioscan NT» 2.0 (Беларусь) при увеличении объектива микроскопа 40 и видеокамеры 7. При этом микроскопическое изображение захватывалось, оцифровывалось и представлялось на экране монитора компьютера. На препаратах, окрашенных по методу Ниссля, курсором обводили контуры изображения перикарионов гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса. Компьютерная программа автоматически выдавала цифро-

вые значения, характеризующие размеры (минимальный и максимальный диаметр, периметр, площадь, объем) и формы (фактор элонгации — отношение максимального и минимального диаметров и форм-фактора — $4 \times \text{площадь} / \text{периметр}^2$) перикарионов нейронов. Для оценки активности изучаемых ферментов в цитоплазме гистаминергических нейронов с помощью курсора на экране монитора компьютера на изображениях соответствующих гистохимических препаратов обводили контуры цитоплазмы перикарионов с последующим автоматическим определением её средней оптической плотности на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакции. У каждого животного таким образом оценивали не менее 30, а в каждой экспериментальной группе — 150–200 нейронов. Полученные первичные цифровые данные обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows. Значимыми считали различия между контрольной и подопытной группами при $P < 0,05$ (U-критерий Манна—Уитни).

Результаты исследования. Анализ полученных данных выявил изменения размеров и формы гистаминергических нейронов ядра E2 в условиях потери желчи организмом. Спустя 1 сут после начала отведения желчи уменьшились максимальный диаметр (на 3,9%) и периметр (на 3,3%) тел нейронов, отмечена тенденция к увеличению форм-фактора и снижению фактора элонгации (таблица). На 3-и сутки потери желчи были отмечены статистически значимое увеличение форм-фактора (на 4,8%) и тенденция к снижению периметра, максимального диаметра и фактора элонгации, т.е. на 1-е и 3-и сутки опыта гистаминергические нейроны несколько округлялись, становились более сферическими. На 5-е сутки отведения желчи изменений в форме и размерах тел гистаминергических нейронов выявлено не было (см. таблицу).

При отведении желчи в течение 1 сут в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 статистически значимо изменялась активность некоторых ферментов: возрастала активность КФ (на 10,7%), ЛДГ (на 5%) и Г-6-Ф-ДГ (на 5,1%), и снижалась активность СДГ (на 4,7%) (рисунок).

Отведение желчи в течение 3 сут привело к дальнейшему увеличению активности ЛДГ (на 17,8%), КФ (на 14,4%) и уменьшению активности СДГ (на 13,8%), NADPH-ДГ (на 12,8%), NADH-ДГ (на 4,2%), Г-6-Ф-ДГ (на 9,6%) и ключевого фермента метаболизма гистамина MAO Б (на 12,1%). Отведение желчи на протяжении 5 сут вызывало ещё более значительные нарушения метаболизма в гистаминергических нейронах. Активность MAO Б у подопытных животных снижалась на 14,6%, СДГ — на 16%, Г-6-Ф-ДГ — на 14,5%, NADPH-ДГ — на 14,6%, ЛДГ — на 16,9%, NADH-ДГ — на 13,5%. Только активность маркерного фермента лизосом — КФ — ещё сильнее возрастала (на 20,9%) (см. рисунок).



Активность ферментов в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крыс в динамике полного наружного отведения желчи.

а — отведение желчи в течение 1 сут; б — отведение желчи в течение 3 сут; в — отведение желчи в течение 5 сут. По горизонтальной оси: А — контроль; Б — отведение желчи; исследованные ферменты: I — моноаминоксидаза; II — сукцинатдегидрогеназа; III — NADH-дегидрогеназа; IV — NADPH-дегидрогеназа; V — глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа; VI — лактатдегидрогеназа; VII — кислая фосфатаза; по оси ординат — активность ферментов (ед. опт. плотности $\times 1000$); одна звездочка — $P < 0,05$; две звездочки — $P < 0,01$; три звездочки — $P < 0,001$ при сравнении с контролем; вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

Размеры и форма гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса у контрольных крыс и у животных в разные сроки полного наружного отведения желчи ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Изученные параметры нейронов	Срок после операции, сут					
	1		3		5	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Диаметр, мкм:						
минимальный	13,69 $\pm$ 0,21	13,47 $\pm$ 0,21	13,56 $\pm$ 0,24	13,81 $\pm$ 0,12	13,23 $\pm$ 0,16	13,44 $\pm$ 0,10
максимальный	21,23 $\pm$ 0,16	20,41 $\pm$ 0,29*	20,80 $\pm$ 0,27	20,16 $\pm$ 0,21	20,75 $\pm$ 0,12	20,36 $\pm$ 0,20
Периметр, мкм	66,4 $\pm$ 0,3	64,2 $\pm$ 0,7*	65,1 $\pm$ 1,2	63,4 $\pm$ 0,6	63,8 $\pm$ 0,3	63,3 $\pm$ 0,4
Площадь сечения, мкм ²	217 $\pm$ 3	205 $\pm$ 4	210 $\pm$ 5	210,3 $\pm$ 2,8	204,7 $\pm$ 2,2	205,3 $\pm$ 2,3
Объем, мкм ³	2424 $\pm$ 55	2225 $\pm$ 56	2310 $\pm$ 91	2313 $\pm$ 50	2218 $\pm$ 35	2227 $\pm$ 38
Форм-фактор	0,620 $\pm$ 0,010	0,630 $\pm$ 0,020	0,630 $\pm$ 0,020	0,660 $\pm$ 0,010*	0,640 $\pm$ 0,010	0,650 $\pm$ 0,003
Фактор элонгации	1,58 $\pm$ 0,04	1,55 $\pm$ 0,04	1,57 $\pm$ 0,04	1,490 $\pm$ 0,020	1,60 $\pm$ 0,03	1,54 $\pm$ 0,03

* $P < 0,05$ при сравнении с контролем.

Обсуждение полученных данных. Результаты исследования свидетельствуют о том, что потеря желчи организмом при ее полном наружном отведении вызывает значительные структурно-метаболические изменения в гистаминергических нейронах гипоталамуса. Так, через 1 сут перикарионы нейронов несколько уменьшаются в размерах и округляются, через 3 сут — становятся ещё более округлыми, сферическими, а через 5 сут — восстанавливают свои форму и размеры. Выявленные транзиторные изменения размеров и формы нейронов могут быть связаны с потерей их цитоплазмой воды в результате нарушения водно-солевого обмена в организме

при ахолии [2]. К сожалению, использование только криостатных срезов в этом эксперименте не позволило измерить величину ядер и ядрышек нейронов и определить их соотношения. Восстановление изученных параметров гистаминергических нейронов через 5 сут отведения желчи не означает, что их структурные изменения исчезают. Вероятно, характер изменений меняется, и они перестают выявляться использованным методом морфометрии.

Нарушения активности ферментов в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 выражены значительно и нарастают по мере удлинения срока потери желчи. Так, отведение желчи в

течение 1 сут приводит к возрастанию активности ЛДГ, КФ и Г-6-Ф-ДГ, и только активность маркерного фермента митохондрий — СДГ — снижается. Отведение желчи в течение 3 сут вызывает еще большее увеличение активности маркерного фермента лизосом, КФ и нарастание активности фермента анаэробного гликолиза — ЛДГ, однако активность остальных ферментов, включая Г-6-Ф-ДГ, угнетается. Можно предположить, что в этот период в гистаминергических нейронах снижены синтетические процессы и тканевое дыхание, однако клетка пытается поддерживать свою жизнедеятельность за счёт гликолиза и ликвидации внутриклеточных повреждений, активируя процессы аутофагии, направленные на элиминацию повреждённых органелл. Потеря желчи в течение 5 сут угнетает активность всех изученных ферментов, за исключением КФ, активность которой ещё больше возрастает, т.е. в нейронах подавляются все пути энергетического метаболизма, и эти нарушения можно считать необратимыми, приводящими в условиях дальнейшей потери желчи к гибели нейронов мозга и всего организма. Действительно, продолжение отведения желчи приводит к гибели всех животных на 6–7-е сутки эксперимента [3].

Известно, что многие компоненты желчи способны проходить через гематоэнцефалический барьер и оказывать прямое действие на мозг. Имеются данные об увеличении рецепторозависимого захвата липопротеинов в мозгу животных при отведении желчи [13]. Выявленные нарушения указывают на важную роль желчи в поддержании структурно-метаболического состояния гистаминергических нейронов гипоталамуса. Пока не ясно, являются ли они прямым результатом нарушения энтерогепатической циркуляции и недостаточности компонентов желчи в крови или следствием тяжёлых нарушений, которые развиваются в организме. С другой стороны, выявленные изменения могут отражать активное участие гистаминергических нейронов гипоталамуса в адаптационных реакциях организма животных в условиях ахолии. В целом, эти данные позволяют получить более полное представление о роли желчи в обеспечении структурно-метаболического гомеостаза нейронов головного мозга и последствиях для ЦНС нарушения энтерогепатической циркуляции желчи.

ЛИТЕРАТУРА

- Василевская Л.С. Отделение липопротеинового комплекса с желчью у крыс. Вопросы питания, 1965, т. 24, № 3, с. 47–49.
- Горшкова С.М. и Курцин И.Т. Механизм желчевыделения. Л., Наука, 1967.
- Емельяничук С.В. и Зиматкин С.М. Биохимические изменения в желчи и сыворотке крови в динамике полного наружного отведения желчи у крыс. Журн. ГГМУ, 2005, № 4, с. 43–45.
- Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б. и Анищик О.В. Гистаминергическая нейронная система мозга. Морфология, 2003, т. 123, вып. 2, с. 97–105.
- 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.
- 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.
- Кузин Н.М., Дадвани С.С. и Ветшев П.С. Лапароскопическая и традиционная холецистэктомия: сравнение непосредственных результатов. Хирургия, 2000, № 2, с. 25–27.
- Подымова С.Д. Болезни печени: Руководство для врачей. М., Медицина, 1998.
- Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М., Изд-во иностр. лит-ры, 1962.
- Шерлок Ш. и Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. М., ГЭОТАР Медицина, 1999.
- Inagaki N., Toda K. and Taniuchi I. The five subgroups of the tuberomammillary nuclei 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.
- Haas H. and Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. Nat. Rev. Neurosci., 2003, v. 4, p. 121–130.
- Malavolti M., Fromm H., Ceryak S. and Shehan K.L. Cerebral low-density lipoprotein (LDL) uptake is stimulated by acute bile drainage. Biochim. Biophys. Acta., 1991, v. 1081, p. 106–108.
- Paxinos G. and Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd ed. New York, Acad. Press, 1986.

Поступила в редакцию 18.04.07

Получена после доработки 10.09.07

STRUCTURAL AND METABOLIC CHANGES IN RAT HYPOTHALAMIC HISTAMINERGIC NEURONS INDUCED BY THE BILE LOSS

S.M. Zimatkin, O.V. Baraban and S.V. Yemelyanchik

The aim of the study was the estimation of structural and metabolic changes in histaminergic neurons of rat hypothalamic E2 nucleus induced by total external bile drainage. The investigation was carried out on male Wistar rats (n=45). The control group comprised the sham-operated animals, in which the physiological bile drainage was preserved during the whole experimental period. Quantitative histological and histochemical methods were used. In serial frontal cryostat sections of posterior hypothalamus, the activity of the following enzymes was demonstrated histochemically: monoamine oxidase B, succinate dehydrogenase, NADH- dehydrogenase, NADPH-dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and acid phosphatase. Morphometric study of histaminergic neurons was performed in thionin-stained sections. It was found that total external bile drainage resulted in a temporary reduction of the sizes and rounding of neuronal perikarya. Metabolic changes were detected already after 1 day of bile loss, and they were found to progress henceforth. All the pathways of energy metabolism were suppressed, while the acid phosphatase activity was increased, on day 5.

Key words: brain, histaminergic neurons, morphometry, histochemistry, bile.

Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, Department of Zoology and Human and Animal Physiology, Ya. Kupala Grodno State University, Belarus.