

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ВЕДУЩЕЕ ВЫСШЕЕ УЧЕБНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 612.014.482:616.69

**КУЗНЕЦОВА ВЕРА БОРИСОВНА**

**МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Минск - 2004

Работа выполнена в Гродненском государственном медицинском

университете

Научный руководитель:

**доктор биологических наук, профессор Зиматкин С.М. за-  
ведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриоло-  
гии Гродненского государственного медицинского уни-  
верситета.**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник  
Института физиологии НАН Беларуси **Арчакова Л.И.**

доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной  
анатомии Белорусского государственного медицинского  
университета **Руденок В.В.**

**Оппонирующая**

**организация:** Гомельский государственный медицинский университет

Защита состоится 31 марта 2004 года в 15 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.03 при Белорусском государственном медицинском университете (220116, г. Минск, пр. Дзержинского, 83, т. 272-55-98).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Белорусского государственного медицинского университета.

Автореферат разослан “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2004 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций,  
кандидат медицинских наук, доцент

Манулик В.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы диссертации.** Центральный гистамин участвует в регуляции различных функций, систем и реакций организма: нейроэндокринной и сердечно-сосудистой систем, кровотока мозга, температуры тела, сна и бодрствования, пищевого и питьевого поведения, памяти и обучения, и др. Предполагается участие гистамина мозга в патогенезе многих патологических состояний и заболеваний: мышечная слабость, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, эпилепсия, морфиновая наркомания, и др. [Panula P. et al., 2000, Haas H. et al., 2003, Onodera K. et al., 1994, Schwartz J. C. et al., 1991, Yamatodani A. et al., 1991].

Биохимические и электрофизиологические исследования, методы перерезки мозга и введения метки доказали существование центральной гистаминергической нейронной системы, с расположением тел гистаминергических нейронов и единственного места синтеза нейронального гистамина - в заднем гипоталамусе [Blier R. et al., 1979]. С получением антител против фермента биосинтеза гистамина гистидиндекарбоксилазы (ГДК) и самого гистамина стала возможной прямая иммуногистохимическая демонстрация гистаминергических нейронов и описание их локализации в головном мозге [Panula P. et al., 1984, Watanabe T. et al., 1984]. Вместе с тем пространственная организация и морфофункциональные особенности гистаминергических нейронов головного мозга животных и человека в нормальных условиях изучены недостаточно. Поэтому в настоящей работе выполнялась пространственная реконструкция гистаминергических ядер, оценивались их объём, а также количество, размеры и форма, ультраструктурные и гистохимические особенности расположенных в них нейронов. Это определяет важность и актуальность настоящего исследования для современной биологии и медицины, нейрогистологии, нейрохимии и клеточной биологии.

**Связь работы с крупными научными программами, темами.** Работа выполнялась в рамках Государственной научной программы фундаментальных исследований «Регуляция и патогенез» (2002-2005 гг., № гос. регистрации 20021620).

**Цель и задачи исследования.** Выяснить пространственную организацию гистаминергических ядер гипоталамуса крысы, дать структурно-метаболическую характеристику их нейронов.

В соответствии с поставленной целью определены следующие задачи:

1. Оценить возможность применения гистохимического метода выявления активности моноаминоксидазы Б (МАО Б) для исследования гистаминергических нейронов в мозге крысы.

2. Установить пространственную организацию и топографию гистаминергических нейронов и их скоплений (ядер) в гипоталамусе крысы.
3. Оценить объём гистаминергических ядер гипоталамуса крысы; дать сравнительную морфометрическую оценку образующих их нейронов.
4. Выявить гистохимические особенности нейронов разных гистаминергических ядер мозга крысы, сравнить их с нейронами аркуатного ядра гипоталамуса.
5. Дать электронно-микроскопическую характеристику нейронам гистаминергических ядер гипоталамуса крысы.

**Объект и предмет исследования.** Объектом исследования служили крысы-самцы Вистар. Предметом исследования служили нейроны гистаминергических ядер гипоталамуса. Исследование проведено на 50 животных.

**Гипотеза.** MAO B может быть хорошим маркёром гистаминергических нейронов и их скоплений (ядер) в гипоталамусе крысы. Гистаминергические нейроны мозга крысы имеют специфическую пространственную организацию, строение и метаболизм. Их популяция гетерогенна: нейроны разных гистаминергических ядер различаются по плотности расположения, размерам, форме и метаболизму.

**Методология и методы проведенного исследования.** В работе использованы нейрогистологический, иммуногистохимический (исследование гистамина в мозге), гистохимический (выявление активности ферментов), цитофотометрический, морфометрический (оценка размеров и формы нейронов при помощи компьютерного анализатора изображения "Биоскан"), электронно-микроскопический, компьютерное моделирование и статистический методы исследования.

**Научная новизна и значимость полученных результатов:** Впервые создано интегральное трёхмерное компьютерное изображение гистаминергических ядер гипоталамуса крысы, которое можно изучать в любых проекциях. Установлено, что эти ядра пространственно взаимосвязаны между собой, постепенно переходят одно в другое и в совокупности образуют геометрическую фигуру сложной конфигурации. Впервые вычислен объём всех гистаминергических ядер, плотность расположения и абсолютное количество в них нейронов. Впервые установлена неоднородность популяции гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы (нейроны разных ядер различались по размерам, форме, активности ферментов). Дана электронно-микроскопическая характеристика нейронам гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крысы, которая подтверждает их высокую метаболическую и функциональную активность.

**Практическая значимость полученных результатов.** Установлена возможность применения гистохимического метода на выявление активности MAO Б для выявления и исследования гистаминергических нейронов и их скоплений (ядер) в мозге крысы. Разработан способ подготовки тканей для электронно-микроскопического исследования гистаминергических ядер и других мелких структур мозга. Предложенный комплекс структурно-метаболических оценок и полученная характеристика гистаминергических нейронов головного мозга могут являться базовыми для дальнейшего изучения гистаминергической нейрональной системы мозга, как в норме, так и при различных экспериментальных воздействиях у животных и патологических состояниях у человека.

Возможная область применения: медицина, гистология, цитология, клеточная биология, нейрохимия, нейроморфология, неврология. Результаты исследования внедрены в научную работу кафедры гистологии и ЦНИЛ ГГМУ и биомедицинского исследовательского центра Университета Хельсинки, оформлены две заявки на изобретения.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту.**

1. Гистохимический метод выявления активности моноаминоксидазы (MAO) Б может быть использован для исследования гистаминергических нейронов и их скоплений (ядер) в гипоталамусе крысы. Предложенный способ выявления гистаминергических нейронов проще, дешевле, доступней и воспроизводимей, чем классический иммуногистохимический метод на гистамин.

2. Созданное интегральное трёхмерное компьютерное изображение гистаминергических ядер гипоталамуса крысы позволило показать пространственные взаимосвязи и единство популяции гистаминергических нейронов.

3. Общий двухсторонний объём гистаминергических ядер гипоталамуса крысы составляет  $499,4 \times 10^6 \pm 27,2 \times 10^6$  мкм<sup>3</sup>. Размеры отдельных его компонентов (ядер) значительно различаются. По плотности расположения нейронов в гистаминергических ядрах выделены компактные (E1-E3), промежуточный (E4) и диффузный (E5) компоненты. Популяция гистаминергических нейронов неоднородна по их размерам и форме: большинство нейронов группы E5 отличаются крупными размерами и веретеновидной формой по сравнению с нейронами ядер E1-E3, обладающими средними размерами и округлой формой, нейроны ядра E4 по форм - фактору и фактору элонгации занимают промежуточное положение.

4. Нейроны гистаминергических ядер значительно отличаются по активности окислительных ферментов от нейронов дофаминергического аркуатного ядра гипоталамуса крысы. Нейроны различных гистаминергических ядер гипоталамуса крысы отличаются по активности дегидрогеназ и MAO Б: активность этих ферментов в нейронах ядра E2 максимальна, а в E5 - минимальна.

Нейроны внутри каждого гистаминергического ядра также метаболически гетерогенны.

5. Ультраструктура нейронов ядра E2, изученная на основе разработанного метода подготовки образцов мозга для электронно-микроскопического исследования гистаминергических ядер гипоталамуса крысы, подтверждает их высокую метаболическую и функциональную активность.

**Личный вклад соискателя.** Экспериментальная и методическая часть работы выполнены лично диссертантом. Данные, полученные при гистологических, гистохимических, иммуногистохимических, морфометрических, цитоспектрофотометрических и электронно-микроскопических исследованиях обрабатывались соискателем самостоятельно. Трёхмерная компьютерная реконструкция гистаминергических ядер гипоталамуса проводилась совместно с аспирантом кафедры физики Гродненского государственного университета О. Н. Стриком. Выбор темы исследования, постановка задач исследования и планирование экспериментов, обсуждение результатов исследования проводилось совместно с научным руководителем.

**Апробация результатов диссертации.** Фрагменты работы обсуждались на заседаниях кафедры гистологии ГрГМУ, анатомической конференции, посвященной 45-летию кафедры анатомии ГрГМУ, научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (Витебск, 2003), научно-практической конференции студентов и молодых учёных, посвященной памяти академика Ю.М. Островского (Гродно, 2003), заседании кафедр медико-биологического профиля и ЦНИЛ ГрГМУ, а также профильных кафедр аграрного биофака ГрГМУ (Гродно, 2004), заседании кафедр медико-биологического профиля БГМУ (Минск, 2004).

**Опубликованность результатов.** По данной теме опубликовано 8 печатных работ: (6 статей и 2 тезиса), поданы 2 заявки на изобретение, 3 статьи находятся в печати.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из «Перечня условных обозначений», «Введения», «Общей характеристики работы», глав I – IV («Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Анализ и обобщение результатов исследования»), «Заключения» и «Списка использованных источников». Работа изложена на 98 страницах, включая 16 таблиц и 62 рисунка. Список использованных источников литературы включает 134 источников, из них 122 зарубежных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Исследования проведены на 50 белых крысах – самцах линии Вистар в возрасте 3-4 мес., массой 190-210 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария, на полноценном рационе. Соблюдались все правила гуманного обращения с животными. Декапитацию животных, находящихся под глубоким эфирным наркозом, проводили с 9<sup>00</sup> до 11<sup>00</sup> утра. Быстро вскрывали черепную коробку, извлекали головной мозг и выделяли из него гипоталамус. Образцы мозга, предварительно выдержав в парах азота, замораживали путем погружения в жидкий азот, где хранили до начала исследования. Серийные криостатные фронтальные срезы гипоталамуса толщиной 20 мкм готовили при  $-15^{\circ}\text{C}$ . Во всех исследованиях в каждой экспериментальной группе использовали не менее 5 животных с количественной и качественной оценкой не менее 700 нейронов для морфометрических исследований, 450 нейронов для гистохимических исследований и 100 – для электронно-микроскопических исследований гистаминергических ядер гипоталамуса каждого животного. Это обеспечило достаточный объем выборки для последующего количественного анализа.

Для выяснения того, какая часть нейронов гистаминергических ядер гипоталамуса (E1-E5) являются MAO Б-активными (с высокой активностью MAO Б), серийные криостатные срезы окрашивали на MAO Б по методу Зиматкина, Цыдика (1994) и 0,1% раствором толуидинового синего по Нисслию. Полученные препараты изучали параллельно с помощью микроскопа Biolar при разных увеличениях. Сравнивали расположение, форму, размеры и количество нейронов в области E1-E5 гистаминергических ядер на срезах обработанных на MAO Б и окрашенных по Нисслию. Затем вычисляли % MAO Б-позитивных нейронов по отношению к общему числу нейронов, окрашенных по Нисслию, в соответствующей зоне и на соответствующей площади ядра.

Для выяснения того, какая часть гистаминиммунопозитивных нейронов в области локализации гистаминергических ядер гипоталамуса (E1- E5) соответствует MAO Б-активным нейронам, выделенный гипоталамус фиксировался 3 часа в 4% растворе 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)-карбодимида (EDAC) с последующим помещением в 20% р-р сахарозы. Далее материал подвергался быстрому замораживанию в жидком азоте, соседние серийные криостатные срезы гипоталамуса толщиной 20мкм окрашивали на MAO Б и иммуногистохимическим методом с антителами против гистамина. Использовали метод иммунофлюоресценции: инкубация с FITC-конъюгатом (разведение 1:40 в PBS-T), с предварительным мечением гистаминовыми антителами (HA 19C (разведение 1:1000, 1:2000)). Затем препараты заключали в PBS-глицерол (1:1) и хранили в холодильнике (+4). Полученные гистохимические и иммуногистохимические

препараты изучали параллельно с помощью универсального исследовательского микроскопа AxioPlan (Карл Цейс, Германия) при разных увеличениях. Сравнивали расположение, форму, размеры и количество нейронов в области E1-E5 гистаминергических ядер на срезах обработанных на МАО Б и иммунофлюоресцентным методом с использованием антител против гистамина. Затем вычисляли % МАО Б-позитивных нейронов по отношению к общему числу гистаминергических нейронов, окрашенных на выявление гистамина, в соответствующей зоне и на соответствующей площади ядра.

Идентификацию структур головного мозга крысы осуществляли по схемам стереотаксического атласа [Paxinos G. et al., 1986]. Для идентификации ядер гистаминергической нейронной системы мозга крысы использовали соответствующие топографические схемы скоплений (ядер) гистаминергических нейронов [Inagaki N. et al., 1990].

Для трёхмерной компьютерной реконструкции гистаминергических ядер гипоталамуса, расположение каждого МАО Б-активного нейрона, видимое в гистохимических препаратах, с помощью манипулятора «мышь» вносили на экране монитора компьютера в соответствующие электронные схемы фронтальных срезов головного мозга крысы из стереотаксического атласа [Paxinos G. et al., 1986]. Таким образом, создавалась база данных пространственного расположения МАО Б-активных нейронов в мозге крысы, которая использовалась компьютерной программой для их интегральной трёхмерной визуализации и реконструкции гистаминергических ядер гипоталамуса.

Для определения объёма, гистаминергические ядра рассматривали в виде суммы усечённых конусов, малое и большое основания которых были представлены площадями гистаминергических ядер, выявляемых на соседних срезах. При этом высоты этих усечённых конусов являлись расстоянием между срезами. Объём каждого гистаминергического ядра, рассчитывался исходя из суммы составляющих его объёмов усечённых конусов.

На серийных криостатных срезах проводился подсчёт количества МАО Б-активных нейронов на  $1 \text{ мм}^2$  площади среза во всех гистаминергических ядрах гипоталамуса (плотность их расположения).

Подсчёт абсолютного количества нейронов в гистаминергических ядрах проводился с помощью методики определения количества микрообъектов [Автандилов Г.Г. и др., 1981].

При помощи компьютерного анализатора изображения "Биоскан" (Республика Беларусь), определяли размеры (максимальный и минимальный диаметры, периметр, площадь, объём) и форму (форм-фактор и фактор элонгации) МАО Б-активных нейронов гистаминергических ядер гипоталамуса крысы.

Для изучения особенностей метаболизма нейронов различных гистаминергических ядер, серийные криостатные срезы гипоталамуса толщиной 20 мкм, монтировали на предметные стекла и обрабатывали на выявление актив-



ности оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса – сукцинатдегидрогеназы (сукцинат: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1) [Nachlas M. M., 1957]; с гликолизом – лактатдегидрогеназы (L-лактат: НАДН-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27) [Hess R. et al., 1958]; с транспортом электронов – дегидрогеназы восстановленного НАД (НАДН ДГ) (НАДН: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.6.99.3) [Nachlas M. M. et al., 1958] с пентозофосфатным путем – глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г-6-Ф ДГ) (D-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.49) [Hess R. et al., 1958], дегидрогеназы восстановленного НАДФ (НАДФН ДГ) [Hess R. et al., 1958]. Параллельно, на срезах изучали активность MAO B - ключевого фермента метаболизма гистамина [Зиматкин С.М., Цыдик В.Ф., 1994].

Для количественной оценки активности изучаемых ферментов проводили цитофотометрию всех гистохимических препаратов на максимуме поглощения окрашенного продукта реакции - формазана (длина волны - 580 нм) с использованием микроабсорбциометр-флюориметра для тонкослойной хроматографии адаптированного для изучения биологических объектов МФТХ – 2М (ЛОМО, Россия).

Для электронно-микроскопического исследования выбрано гистаминергическое ядро E2, как самое репрезентативное (с наибольшим количеством гистаминергических нейронов). После декапитации крысы, быстро вскрывали черепную коробку, извлекали головной мозг, выделяли гипоталамус, замораживали в жидком азоте. Два фронтальных криостатных среза гипоталамуса, толщиной 20 мкм и 60 мкм, готовили при  $-15^{\circ}\text{C}$  на уровне  $P \approx -3.80$  (3,8 мм кзади от Брегмы). Первый срез монтировали на предметное стекло, быстро расправляли и размораживали, а затем подсушивали при комнатной температуре. Затем его окрашивали на выявление MAO B [Зиматкин С.М., Цыдик В.Ф., 1994]. Второй срез в камере криостата помещали в предварительно охлажденный до  $+4^{\circ}\text{C}$  1% Os-фиксатор. После чего его извлекали из камеры криостата во флаконе с фиксатором и фиксировали в течение 2 часов при  $+4^{\circ}\text{C}$  в двух порциях 1% Os-фиксатора, приготовленного на буфере Миллонига (pH 7,4) [Millonig G. et al., 1961]. В дальнейшем, после промывки в растворе (буфер Миллонига (pH 7,4) (20мл) + сахароза (900мг)), проводили обезвоживание этих срезов в 50% и 70% спиртах. После этого, под контролем маркированного среза (окрашенного на выявление MAO B), в них выделяли зоны содержащие изучаемое гистаминергическое ядро E2 гипоталамуса. Далее материал выдерживали 12 часов в холодильнике при  $+4^{\circ}\text{C}$  в 2% уранилацетате на 70° спирте. Обезвоживание материала проводили в спиртах возрастающей концентрации, смеси ацетона и спирта, ацетоне, после чего его заключали в заливочную смолу, с предварительной проводкой через смеси смолы (аралдит М + аралдит Н + дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона. Срезы изготавливали на ультрамикротоме MT-7000 (США). На окрашенных метиленовым синим полутонких срезах уточняли ло-

кализацию гистаминергического ядра E2. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом [Watson M. L. et al., 1958] и цитратом свинца [Reynolds E. S. et al., 1963]. Сеточки со срезами опускали в каплю уранилацетата на 30 мин. под темной крышкой при комнатной температуре. Затем промывали 50<sup>0</sup> спиртом 3 сек. и двух порциях бидистиллированной воды по 5 сек. Контрастировали цитратом свинца – 10 мин. Затем срезы промывали в 3-х порциях воды по 5 сек. Полученные препараты изучали в электронном микроскопе ПЭМ-100 (Украина). Микрофотографии изготавливали при помощи цифровой видеокамеры Cannon S45 (Япония) с разрешением 4 мегопикселя.

Результаты морфометрических и цитофотометрических исследований обрабатывали статистически с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **Гистотопография и количественный анализ MAO Б-активных (гистаминергических) нейронов гипоталамуса крысы.**

Установлено, что MAO Б является ключевым ферментом метаболизма гистамина в мозге, где отсутствует гистаминоксидаза (гистаминаза), окисляющая до 40% гистамина на периферии. Метаболизм является единственным способом удаления гистамина после завершения нейротрансмиссии гистаминергическими нейронами мозга, поскольку система обратного захвата гистамина в них отсутствует [Panula P. et al., 1984, Schwartz J.-C. et al., 1991], в отличие от других аминергических нейронов, имеющих специфические транспортёры своих медиаторов. Это послужило предпосылкой изучения возможности использования MAO Б в качестве маркера гистаминергических нейронов. Результаты наших исследований показали практически полное совпадение MAO Б-активных (с высокой активностью MAO Б, выявляемой гистохимически) и гистаминиммунореактивных нейронов (выявляемых иммуногистохимически) в гипоталамусе крысы, как по количеству, так и по качественным признакам (форме, размеру, расположению). Следовательно, MAO Б является хорошим маркером гистаминергических нейронов мозга крысы, в частности для их подсчёта, оценки размеров и формы. Результаты наших исследований также показали, что почти все нейроны (90 - 100%) известных гистаминергических ядер (E1 -E5) мозга крысы являются MAO Б-активными. Поэтому, гистохимический метод выявления активности MAO Б может быть использован в качестве маркера для компьютерной реконструкции гистаминергических ядер гипоталамуса (Рис. 1) и вычисления их объёма.

А.

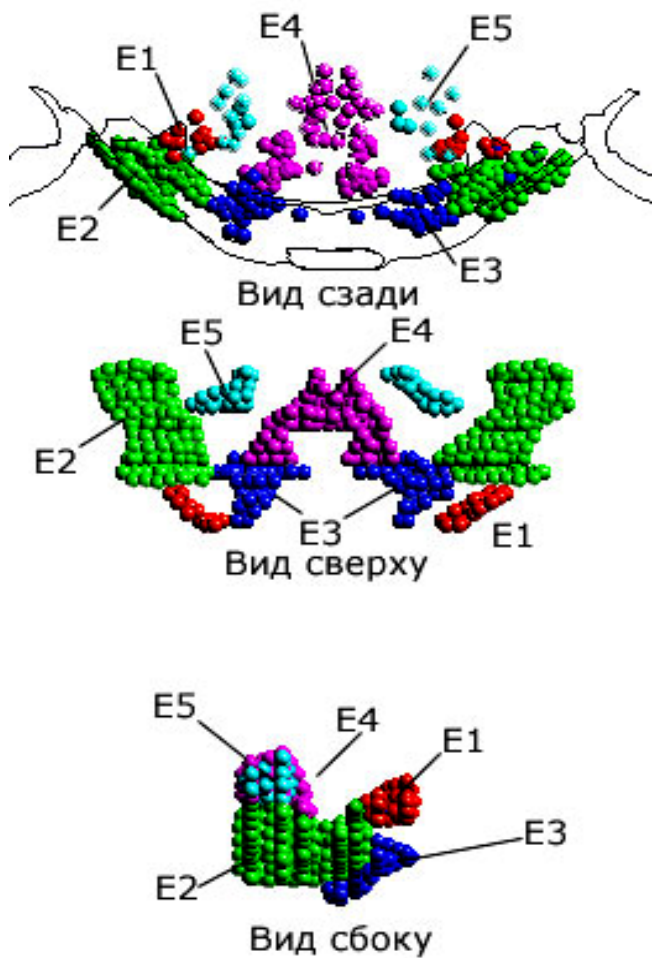
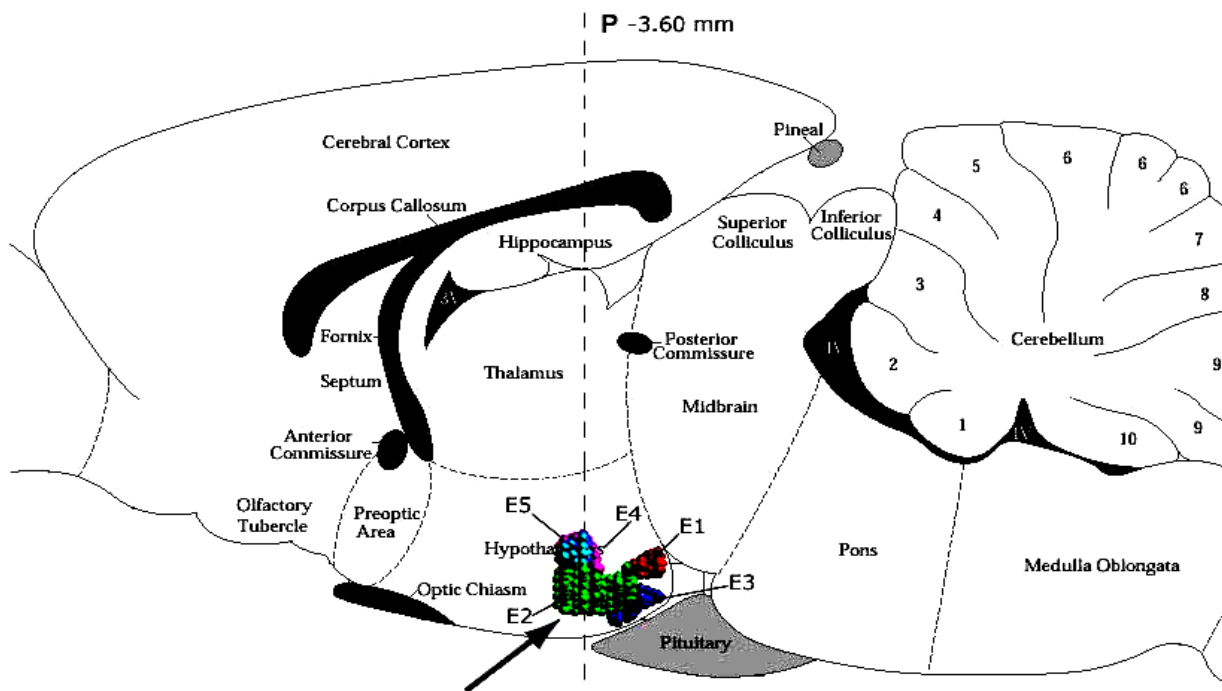


Рис. 1.

А. Компьютерные изображения гистаминергических ядер гипоталамуса в трёх плоскостях.

Б. Компьютерное изображение гистаминергических ядер на схеме сагиттального среза мозга крысы [Рахинос G. et al., 1986].

Б.



Следует отметить, что гистохимический метод выявления MAO Б-активных нейронов является более воспроизводимым, менее трудоёмким и продолжительным, а также более экономичным, чем иммуногистохимические методы выявления гистаминергических нейронов с использованием в качестве маркёров гистамина и гистидиндекарбоксилазы. Кроме того, гистохимический метод на MAO Б не требует предварительной специфической фиксации тканей и использования малодоступных реактивов.

Результаты трёхмерной компьютерной реконструкции гистаминергических ядер гипоталамуса крысы показали, что они взаимосвязаны между собой, постепенно переходят одно в другое и в совокупности образуют геометрическую фигуру сложной конфигурации (Рис. 1). На основании этого можно утверждать, что все гистаминергические нейроны мозга образуют пространственно единую клеточную популяцию, которая может иметь единый источник клеточного развития в заднем гипоталамусе, из которого могла происходить их миграция в ростральном направлении. Это соответствует мнению других учёных [Ericson H. et al., 1987, Inagaki N. et al., 1990, Staines W. A. et al., 1987] о том, что гистаминергические нейроны формировались в эмбриогенезе как единая группа и имеют сходные гистотопографические проекции и функции.

Общий объём скоплений перикарионов MAO Б-активных нейронов гипоталамуса крысы составляет  $499,4 \times 10^6 \pm 27,2 \times 10^6$  мкм<sup>3</sup>. Объём разных гистаминергических ядер значительно различается (Рис. 2)

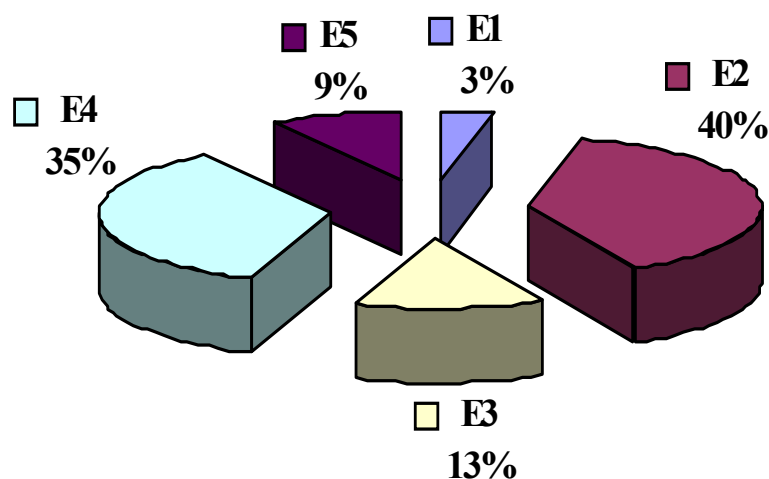


Рис. 2  
Объём отдельных гистаминергических ядер (в % к их общему объёму)

Нейроны в ядре E5 расположены диффузно, по сравнению с более компактным расположением нейронов в остальных гистаминергических ядрах, особенно E1 - E3. Ядро E4 по плотности расположения нейронов занимает промежуточное положение.

Абсолютное количество нейронов в гистаминергических ядрах гипоталамуса крысы с обеих сторон составляет в среднем  $37164 \pm 2760$  (Рис. 3).

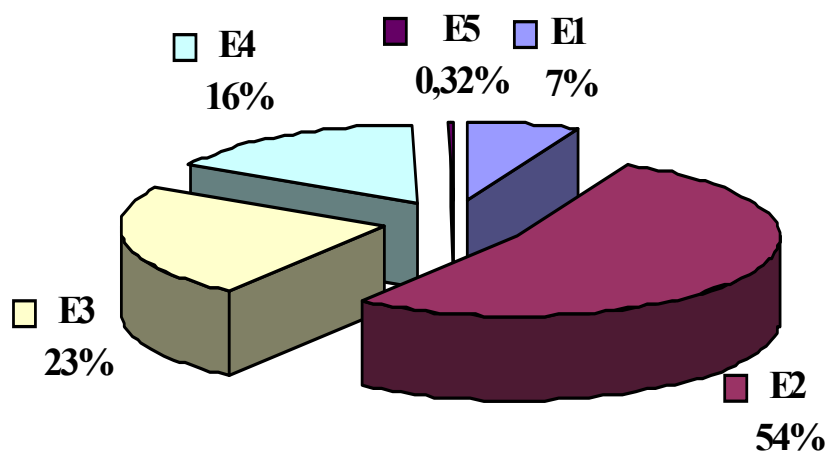


Рис. 3.

Количество MAO B-активных нейронов в различных гистаминергических ядрах гипоталамуса крысы. (в % к их общему количеству)

### Морфометрическая характеристика MAO B-активных нейронов гипоталамуса крысы

Установлены средние размеры нейронов гистаминергических ядер гипоталамуса крысы (Таблица 1).

Таблица 1.

Размеры нейронов гистаминергических ядер гипоталамуса крысы.

	E1	E2	E3	E4	E5
<b>Максимальный диаметр (в мкм)</b>	27,4 ±2,5	29,5 ±3,1	27,1 ±1,9	30,4 ±2,2* <sup>1</sup>	58,3 ±3,8** <sup>3</sup>
<b>Минимальный диаметр (в мкм)</b>	17,88 ±1,8	17,6 ±1,8	16,4 ±2,3	16,6 ±1,1	16,2 ±2,9
<b>Периметр (в мкм)</b>	75,54 ±7,1	77,2 ±8,1	71,1 ±4,8	88,1 ±8,3** <sup>1</sup> ; * <sup>2</sup>	141,2 ±10,1** <sup>3</sup>
<b>Площадь (в мкм<sup>2</sup>)</b>	340,55 ±60,8	349,9 ±67,9	303,4 ±72,7	322,8 ±25,05* <sup>1</sup>	431,7 ±42,5** <sup>3</sup>
<b>Объём (в мкм<sup>3</sup>)</b>	4937,45 ±1293,2	5112,86 ±1493,3	4194 ±1552,4	4592,96 ±540,6	7023,3 ±1970* <sup>3</sup>

\*- Различия достоверны ( $p < 0,01$ ); \*\* - Различия достоверны ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> - Различия между ядром E3 и E4; <sup>2</sup> - Различия между ядром E1 и E4; <sup>3</sup> - Различия между ядром E5 и остальными гистаминергическими ядрами.

В гистаминергических ядрах отчётливо выделяются три субпопуляции нейронов: мелкие, средние и крупные. Их вклад в состав разных ядер различен. Кроме того в 4-ом и в 5-ом гистаминергических ядрах встречаются ещё субпо-

пуляция гигантских ( $>11000 \text{ мкм}^3$ ) нейронов. Она составляет соответственно 10 и 25% от общего количества нейронов в E4 и E5 ядрах, но менее 5% от общего количества гистаминергических нейронов в гипоталамусе крысы.

Установлено, что нейроны различных гистаминергических ядер отличаются по форме. Так, перикарионы E1 - E3 ядер гистаминергических нейронов имеют округлую, овальную, реже веретеновидную. Перикарионы ядра E4 и, особенно, E5 имеют значительно более вытянутую - веретеновидную форму.

### Гистохимические особенности нейронов гипоталамуса крысы.

Показано, что по активности НАДФН и Г-6-Ф ДГ, немитохондриальные энергетические процессы наиболее выражены в нейронах ядра E2 и E3 (Таблица 2). НАДФН ДГ локализована в эндоплазматической сети и гиалоплазме. Митохондриальные энергетические процессы (по активности СДГ) также более выражены в нейронах ядер E2 и E3, по сравнению с ядрами E4 и E5. Об этом свидетельствует более высокая активность СДГ в клетках ядер E2 и E3, по сравнению с клетками E4 и E5 ядер (Таблица 2).

Процессы анаэробного гликолиза (по активности лактатдегидрогеназы) наиболее выражены в клетках E2 и E4, а наименее - в клетках ядра E1. Об этом свидетельствует высокая активность ЛДГ в клетках ядер E2, E4 и низкая в клетках ядра E1 (Таблица 2).

Таблица 2.

Активность ферментов в нейронах гистаминергических ядер и аркуатного ядра гипоталамуса крысы (в единицах оптической плотности  $\times 10^3$ ).

	E1	E2	E3	E4	E5	Arc
<b>МАО Б</b>	863,33 ±64,84	918,45 ±13,63	863,55 ±15,77	797,8 ±20,9	764,50 ±39,94	-
<b>НАДН ДГ</b>	631,33 ±54,74	710,75 ±40,74	682,52 ±44,60	680,20 ±50	642,50 ±55,16	552 ±6,6
<b>ЛДГ</b>	691,33 ±10,87	748,38 ±9,20	720,76 ±21,53	731,50 ±10	729,83 ±13,65	601,3 ±5,4
<b>Г-6-Ф ДГ</b>	428,17 ±10,04	435,57 ±8,31	420,40 ±10,09	414,90 ±5,3	404,66 ±3,89	484,9 ±8,7
<b>СДГ</b>	433,33 ±6,24	443,10 ±10,2	444,47 ±4,47	405,5 ±11,7	444,00 ±10,19	412,4 ±16,2
<b>НАДФ ДГ</b>	964,67 ±38,09	1059,36 ±29,2	1028,47 ±21,54	959 ±19,8	978,67 ±6,55	780,7 ±12,3

Исходя из всего вышесказанного, можно заключить, что энергетические процессы в нейронах гистаминергических ядер E2 и E3 более выражены по

сравнению с таковыми в ядре E4 и, особенно, E5. Учитывая то, что в E1-E5 ядрах главным образом синтезируется гистамин, то можно предполагать, что эти процессы обеспечивают синтез этого амина в ядрах E2 и E3. Интересно, что и процессы окислительного дезаминирования гистамина более выражены в этих же ядрах. Об этом свидетельствует более высокая активность MAO B в клетках ядер E2 и E3 и пониженная - в клетках E4 и E5 ядер.

Анализ гистограмм позволил установить высокую метаболическую гетерогенность популяций гистаминергических нейронов в гипоталамусе крысы в целом и по отдельным ядрам, а также обнаружены значительные гистохимические особенности гистаминергических нейронов, по сравнению с нейронами дофаминергического аркуатного ядра гипоталамуса (активность НАДН и НАДФН ДГ, ЛДГ, СДГ и MAO B выше, а активность Г-6-Ф ДГ ниже).

### **Электронно-микроскопическая характеристика нейронов гистаминергических ядер гипоталамуса крысы.**

Предложенный метод подготовки образцов мозга для электронно-микроскопического исследования, с использованием криостатных срезов и гистохимического контроля на MAO B, позволяет избирательно изучать ультраструктуру мелких гистаминергических ядер гипоталамуса крысы.

Полученная нами электронно-микроскопическая картина нейронов репрезентативного гистаминергического ядра E2 в целом не отличается от таковой, полученной предыдущими исследователями с использованием других маркеров гистаминергических нейронов [Haas H. et al., 2003, Hayashi H. et al., 1984, Kaslin J. et al., 2001, Tohyama M. et al., 1991]. Показано, что ядра гистаминергических нейронов складчатые, содержат мелкозернистый хроматин, и ядрышко, прилежащее к ядерной оболочке, имеющей много пор. Цитоплазма богата органеллами: митохондрии многочисленны, хорошо развиты комплекс Гольджи и эндоплазматическая сеть, как гранулярная, так и гладкая. Выявляется значительное количество свободных рибосом, большое количество вторичных лизосом, в том числе и липидолизосом. Часто встречаются мультивезикулярные тельца. В нейропиле гистаминергических нейронов выявляются многочисленные активные аксо-соматические, аксо-дендритические и единичные аксо-аксональные синапсы, причём первые и третьи относятся к симметричным межнейрональным контактам, а вторые - к асимметричным.

Ультраструктура нейронов гистаминергического ядра E2 хорошо согласуется с высокой метаболической активностью этих нейронов, выявленных в нашем исследовании гистохимически. В частности, высокой активности маркерных ферментов митохондрий, сукцинатдегидрогеназы и MAO, соответствует большое количество митохондрий в их цитоплазме, а высокой активности дегидрогеназы восстановленного НАДФ - развитая гладкая цитоплазматическая

сеть. В целом, ультраструктура гистаминергических нейронов свидетельствует об их высокой метаболической и функциональной активности.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В 95% нейронов всех гистаминергических ядер (E1-E5) гипоталамуса крысы обнаружена высокая активность моноаминоксидазы B. Все гистаминиммуноположительные нейроны гипоталамуса крысы являются MAO B-активными. Вне гистаминергических ядер MAO B-активные и гистаминиммунопозитивные нейроны в гипоталамусе не встречаются. Следовательно, гистохимический способ выявления активности MAO B может быть использован для исследования гистаминергических нейронов и их скоплений (ядер) в гипоталамусе крысы [2, 3, 4, 5, 7].

2. Гистаминергические ядра мозга крысы пространственно взаимосвязаны между собой, постепенно переходят одно в другое и в совокупности образуют геометрическую фигуру сложной конфигурации, что указывает на пространственное единство популяции гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы [2, 3, 4, 8].

3. Общий объём гистаминергических ядер мозга крысы равен  $499,4 \times 10^6 \pm 27,2 \times 10^6$  мкм<sup>3</sup>. Ядро E2 составляет 40% общего объёма, E4 - 35%, E3 - 13%, E5 - 9%, E1 - 3%. Плотность расположения нейронов в гистаминергических ядрах убывает в последовательности E1 - E3 (компактные ядра), E4 (промежуточное), E5 (диффузное). Общее количество нейронов в гистаминергических ядрах составляет  $37162 \pm 2760$ . E2 содержит 54% от этого числа, E3 - 23%, E4 - 16%, E1 - 7%, E5 - 0,32%.

Популяция гистаминергических нейронов неоднородна по размерам и форме. Субпопуляция гигантских (>11 тыс. мкм<sup>3</sup>) нейронов находится только в ядрах E4 и E5, где они составляют соответственно 10 и 25% всех нейронов. Максимальный диаметр, периметр, площадь и объём нейронов ядра E5 значительно больше, чем нейронов остальных гистаминергических ядер.

Большинство нейронов E5 имеют веретеновидную форму. Нейроны ядер E1 - E3 имеют преимущественно округлую форму. Нейроны E4 по форм - фактору и фактору элонгации занимают промежуточное положение [2, 3, 4, 7].

4. Нейроны гистаминергических ядер значительно отличаются по показателям окислительного метаболизма от нейронов дофаминергического аркуатного ядра гипоталамуса: в последних активность сукцинат-, лактат- и НАДФН дегидрогеназ достоверно ниже, а Г-6-Ф дегидрогеназы выше, чем в нейронах гистаминергических ядер. Нейроны различных гистаминергических ядер гипоталамуса крысы различаются по активности дегидрогеназ (окислительный метаболизм, энергетическое обеспечение процессов биосинтеза гис-



тамина) и МАО Б (окислительное дезаминирование гистамина). Активность этих ферментов в ядре E2 максимальна, а E5 - минимальна. Нейроны каждого гистаминергического ядра также метаболически гетерогенны [2, 5].

5. Метод подготовки образцов мозга для электронно-микроскопического исследования, с использованием криостатных срезов и гистохимического контроля на МАО Б, позволяет избирательно изучать ультраструктуру мелких гистаминергических ядер гипоталамуса крысы. Ультраструктура нейронов репрезентативного гистаминергического ядра E2 свидетельствует об их высокой метаболической и функциональной активности [6].

#### СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

##### Статьи:

1. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Анищик О.В. Гистаминергическая нейронная система мозга // Морфология. – 2003.- Т.123.- Вып.2.- С. 97 – 105.
2. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Стрик О.Н., Виноградова Л.Е., Лис Р.Е. Структурно-метаболическая характеристика гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы // Труды Гродненского государственного медицинского университета (к 45-летию университета). – Гродно: ГрГМУ, 2003.- С.24-26.
3. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Стрик О.Н., Лис Р.Е. Гистаминергические нейроны мозга крысы: Морфометрическое исследование // Аспекты клинической анатомии и вопросы конституционально-возрастной и экспериментальной морфологии / Сборник трудов научной конференции под ред. Доцента Е.С. Околокулака. – Гродно: ГГМУ, 2003. - С.74-76.
4. Кузнецова В.Б. Морфометрическая оценка МАО Б-активных нейронов в гипоталамусе крысы // Актуальные вопросы современной медицины и фармации. Материалы научно-практической конференции студентов и молодых учёных. – Витебск: ВГМУ, 2003. -С.7-9.
5. Кузнецова В.Б., Виноградова Л.Е., Зиматкин С.М. Гистохимическая характеристика гистаминергических нейронов мозга крысы // Аспекты клинической анатомии и вопросы конституционально-возрастной и экспериментальной морфологии / Сборник трудов научной конференции под ред. Доцента Е.С. Околокулака. – Гродно: ГГМУ, 2003. - С.105-106.
6. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Кравчук Р.И. Электронно-микроскопическое исследование нейронов гистаминергического ядра E2 гипоталамуса крысы // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2004. - № 5. - С. 46-49.

## Тезисы:

7. Кузнецова В.Б. Количество МАО Б-активных нейронов в гистаминергических ядрах мозга крысы // Материалы научно-практической конференции студентов и молодых учёных, посвященной памяти академика Ю.М. Островского. – Гродно: ГрГМУ, 2003. - С.118-119.
8. Кузнецова В.Б., Стрик О.Н. Трёхмерная компьютерная реконструкция гистаминергических ядер гипоталамуса // Материалы научно-практической конференции студентов и молодых учёных, посвященной памяти академика Ю.М. Островского. – Гродно: ГрГМУ, 2003. - С.119-120.

## РЕЗЮМЕ

**Кузнецова Вера Борисовна**

**“Морфо-функциональная характеристика гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы”**

**Ключевые слова:** *головной мозг, гистаминергические нейроны, ультраструктура, гистохимия, морфометрия.*

**Объект исследования:** крысы-самцы линии Вистар, нейроны гистаминергических ядер гипоталамуса.

**Цель исследования:** **Выяснить** пространственную организацию гистаминергических ядер гипоталамуса крысы и дать структурно-метаболическую характеристику их нейронов.

**Методы исследования:** нейрогистологический, иммуногистохимический (исследование гистамина в мозге), гистохимический, цитофотометрический, морфометрический (оценка размеров и формы нейронов при помощи компьютерного анализатора изображения "Биоскан"), электронно-микроскопический, компьютерное моделирование и статистический.

**Полученные результаты и их новизна:** **Впервые** установлена возможность применения гистохимического метода на определение активности MAO Б для выявления гистаминергических нейронов. Создано интегральное трёхмерное компьютерное изображение гистаминергических ядер гипоталамуса крысы. **Установлено**, что гистаминергические нейроны пространственно образуют единую популяцию. **Впервые** вычислен их объём, плотность расположения и абсолютное количество в них нейронов. Количественно оценены размеры и форма нейронов во всех гистаминергических ядрах, а также активность в них ряда окислительных ферментов. **Впервые** установлена неоднородность популяции гистаминергических нейронов гипоталамуса крысы (по размерам, форме, интенсивности метаболизма). **Разработан** способ подготовки тканей для электронно-микроскопических исследований мелких структур мозга. Дана электронно-микроскопическая характеристика нейронов гистаминергического ядра E2.

**Рекомендации по использованию:** Предложенный комплекс структурно-метаболических оценок и полученная характеристика гистаминергических нейронов головного мозга могут являться базовыми для дальнейшего изучения гистаминергической нейрональной системы мозга, как в норме, так и при различных экспериментальных воздействиях и патологических состояниях у животных и человека.

**Область применения:** биология, медицина, гистология, цитология, клеточная биология, нейрохимия, нейроморфология, неврология.

## РЭЗІЮМЭ

**Кузнецова Вера Барысаўна**  
**“Морфа-функцыянальная характарыстыка гістамінэргічных**  
**неўронаў гіпаталамуса пацука”**

**Ключавыя словы:** *галаўны мозг, гістамінэргічныя неўроны, ультраструктура, гістахімія, морфаметрыя.*

**Аб'ект даследвання:** пацукі-самцы Вістар, неўроны гістамінэргічных ядраў гіпаталамуса.

**Мэта даследвання:** Атрымаць прасторавую арганізацыю гістамінэргічных ядраў гіпаталамуса пацука і даць структурна-метабалічную характарыстыку іх неўронаў.

**Метады даследвання:** неўрагісталагічны, імунагістахімічны (даследванне гістаміна ў мозге), гістахімічны, цытафотаметрычны, морфаметрычны (ацэнка памераў і формы неўронаў пры дапамозе камп'ютернага аналізатара відарыса “Біяскан”), электронна-мікраскапічны, камп'ютернае мадэліраванне і статыстычны.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** Упершыню атрымана магчымасць выкарыстання гістахімічнага метада на МАА Б дзеля выяўлення гістамінэргічных неўронаў. Зроблена інтэгральнае трохпамернае камп'ютернае адлюстраванне гістамінэргічных ядраў гіпаталамуса пацука. **Сцверджана**, што гістамінэргічныя неўроны прастрава ствараюць адзіную папуляцыю. Упершыню атрыман іх аб'ём, шчыльнасць размяшчэння і абсалютная колькасць у іх неўронаў. Колькасна ацэнены памеры і форма неўронаў, у ўсіх гістамінэргічных ядрах, таксама актыўнасць у іх акісляльных ферментаў. Упершыню вызначына неаднароднасць папуляцыі гістамінэргічных неўронаў гіпаталамуса пацука (па памерам, форме, інтэнсіўнасці метабалізма). **Распрацаван** метады падрыхтоўкі тканкі дзеля электронна-мікраскапічных даследванняў малых структур мозга. Дадзена электронна-мікраскапічная характарыстыка неўронаў гістамінэргічнага ядра E2.

**Рэкамендацыі па выкарыстанню:** Прапанаваны комплекс структурна-метабалічных адметак і атрыманая характарыстыка гістамінэргічных неўронаў галаўнога мозга могуць з'яўляцца базавымі дзеля паслядовага даследвання гістамінэргічнай неўранальнай сістэмы мозга, як у норме, так і пры разліковых эксперыментальных уздзеяннях і паталагічным стане у жывёл і чалавека.

**Вобласць выкарыстання:** біялогія, медыцына, гісталагія, цыталагія, клеткавая біялогія, неўрахімія, неўрамарфалагія, неўралогія.

## SUMMARY

**Kuznetsova Vera Borisovna**

**The morpho-functional characteristics of the hypothalamic histaminergic neurons in rats**

**Keywords:** *brain, histaminergic neurons, ultrastructure, histochemistry, morphometry.*

**Subjects:** male Wistar rats, the neurons of the hypothalamic histaminergic nuclei.

**Aim:** to investigate the spatial organization of the histaminergic nuclei in rat hypothalamus and the structural and metabolic properties of their neurons.

**Methods:** neurohistology, immunohistochemistry (histamin analysis in brain), histochemistry, cytophotomicroscopy, morphometry (estimation of neuron sizes and shapes with computer image analyzer “Bioscan”), electronic microscopy, computer modeling and statistics.

**The results and their novelty:** The possibility to apply the histochemistry method to the determination of the MAO B activity level in histaminergic neurons was explored for the first time. The integral three-dimensional computerized image of rat hypothalamic histaminergic nuclei was obtained for the first time. The histaminergic neurons were shown to be spatially interrelated and to form one population. The nuclear volume, neuron density and total neuron amount were calculated in first time. The sizes and shapes of neurons were quantitatively estimated in all histaminergic nuclei, such as the intracellular activities of some oxidative enzymes. The heterogeneity of the histaminergic neuron population (by size, shape and metabolic activity) was shown in rats in first time. The way for tissue preparation to electron-microscopic investigations of the small cerebral structures was developed. The electronic microscopy characteristics of the neurons of the Histaminergic nuclei E2 were analyzed.

**Recommendations to use:** the suggested complex of structural and metabolic scores and the characteristics of the cerebral histaminergic neurons obtained may become a base for the future studies of the histaminergic neuron system in humans and animals, both in normal conditions and during various experimental treatments and pathologic states.

**Field of application:** biology, medicine, cytology, cell biology, neurochemistry, neuromorphology, neurology.