

УДК 611.81+611-018.82): 547.781.5 (047)

АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНООКСИДАЗЫ Б И ДЕГИДРОГЕНАЗ В НЕЙРОНАХ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ ЯДЕР МОЗГА КРЫСЫ

В.Б. Кузнецова, Р.Е. Лис, С.М. Зиматкин

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии и ЦНИЛ ГГМУ

Установлено, что активность MAO Б является хорошим маркером гистаминергических нейронов и, соответственно, гистаминергических ядер E1-E5 гипоталамуса крысы. Нейроны гистаминергических ядер в целом значительно отличаются по окислительному метаболизму от нейронов дофаминергического, аркуатного ядра. Так, в первых активность сукцинат-, лактат-, НАДФН дегидрогеназ достоверно выше, а Г-6-Ф дегидрогеназы ниже. Популяция нейронов гистаминергических ядер неоднородна по интенсивности окислительного дезаминирования и окислительного метаболизма: MAO Б и дегидрогеназы были наиболее активны в нейронах гистаминергических ядер E3 и, особенно, E2, и наименее активны в нейронах ядер E4 и E5. Это указывает на значительные особенности окислительного метаболизма и метаболическую гетерогенность популяции нейронов гистаминергических ядер мозга крысы.

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

It was found that MAOB activity is a good marker of histaminergic neurons and histaminergic nuclei E1-E5 of the rat hypothalamus, accordingly. In general, the neurons of the histaminergic nuclei significantly differ from the neurons of dopaminergic arcuate nucleus in their oxidative metabolism. In the former neurons the succinate-, lactate- and NADPH dehydrogenase activities were higher, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was lower. The population of the histaminergic nuclei neurons was heterogeneous in their metabolic activity, MAO B and dehydrogenases were most active in the neurons of histaminergic nuclei E3 and, especially, E2 and the least active in the neurons of E4 and E5. It indicates the considerable peculiarities of oxidative metabolism and metabolic heterogeneity of neuron population in the histaminergic nuclei of the rat brain.

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

Гистаминергические нейроны мозга крысы расположены только в туберомамиллярной области гипоталамуса, где они образуют пять скоплений - ядер E1-E5. Медиатором этих нейронов является гистамин, который действует через три типа рецепторов (H₁, H₂ и H₃), широко и гетерогенно распределенных в мозге. Гистаминергическая система мозга участвует в регуляции деятельности других нейротрансмиттерных систем мозга и многих 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. Ее считают одним из центров регуляции активности всего мозга. Предполагается участие гистаминовой нейронной системы мозга в патогенезе ряда патологических состояний и заболеваний: мышечная слабость, болезни Альцгеймера и Паркинсона, эпилепсия, морфиновая наркомания и другие [1, 2, 3, 5, 6]. Гистамин синтезируется в нейронах из L-гистидина с помощью фермента гистидиндекарбоксилазы (ГДК). Специфические и эффективные системы обратного захвата гистамина в ЦНС не обнаружены. Гистамин метаболизируется ферментом гистамин-N-метилтрансферазой

в телеметилгистамин, который затем превращается с помощью моноаминооксидазы типа Б (MAO Б) в N-теле-метилимидазолацетальдегид, а затем с помощью фермента альдегиддегидрогеназы в N-теле-метилимидазолуксую кислоту. В наших предыдущих исследованиях в заднем гипоталамусе крысы были обнаружены скопления нейронов с высокой активностью MAO Б и предположено, что они являются гистаминергическими нейронами, расположенными в этой же области мозга [4]. В настоящей работе мы попытались проверить эту гипотезу. Кроме гистамина и гистаминметаболизирующих ферментов, туберомамиллярные нейроны содержат ряд других нейротрансмиттеров, модуляторов и ферментов их метаболизма: ГАМК и фермент её синтеза, глутаматдекарбоксилазу, нейропептиды (галанин, тиротропин-релизинг гормон, субстанция Р, производные проэнкефалина), аденозиндиаминазу – фермент, превращающий аденозин в инозин [5]. Синтез всех этих биологически активных соединений является энергозависимым процессом и предполагает интенсивный окислительный метаболизм в нейронах. В настоящей работе проведено сравнительное количественное гистохимическое исследование активности MAO Б

и некоторых дегидрогеназ в нейронах всех гистаминергических ядер и аркуатного ядра гипоталамуса.

Материалы и методы

Исследования проведены на 30 белых крысах – самцах Вистар массой 180-220 г. Их содержали в условиях вивария в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными. Крыс забивали декапитацией под глубоким тиопенталовым наркозом в утренние часы (с 10⁰⁰ до 12⁰⁰). Образцы гипоталамуса сразу либо после фиксации в 4% 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)-карбодимиде (для выявления гистамина) замораживали в жидком азоте, затем готовили серийные криостатные фронтальные срезы толщиной 20 мкм, проходящие через задний гипоталамус. Соседние срезы исследовали иммуногистохимически на гистамин [10], гистохимически для выявления активности MAO Б [4] или окрашивали 0,1% раствором толуидинового синего по Нисслю. Кроме того, срезы этих же областей гипоталамуса исследовали гистохимически для выявления активности оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса – сукцинатдегидрогеназы [9], с транспортом электронов – НАДН- и НАДФН-дегидрогеназ [10], с гликолизом – лактатдегидрогеназы и пентозофосфатным путем – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [7]. Полученные препараты изучали параллельно с помощью микроскопа Biolar (Германия) при разных увеличениях. Идентификация структур головного мозга крысы осуществлялась по схемам стереотаксического атласа [12], а локализация гистаминергических ядер – по соответствующим топографическим схемам [8]. Цифровое фотографирование нейронов гистаминергических ядер проводили с помощью видеокамеры, платы ввода изображения и системы «Биоскан». 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, адаптированной для изучения биологических объектов МФТХ – 2М (ЛОМО, Россия). Результаты цитофотометрии обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows.

Результаты и обсуждение

Установлено, что нейроны всех гистаминергических ядер гипоталамуса (E1-E5) имеют высокую активность MAO Б (являются MAO Б-активными). Сравнительное изучение соседних срезов

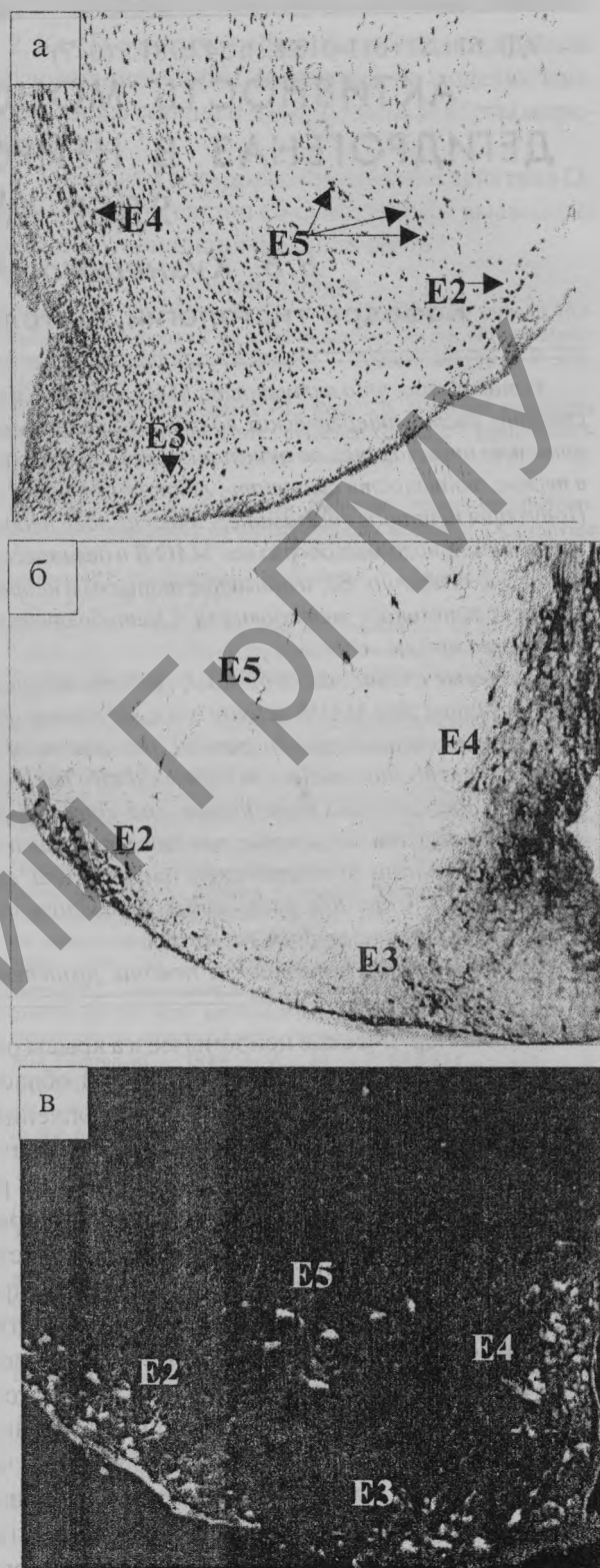


Рис. 1. Локализация гистаминергических ядер на фронтальных срезах заднего гипоталамуса крысы. а. Срез головного мозга в области гистаминергических ядер E2 – E5 задне-базального гипоталамуса (P=–3.80 mm). Окраска по Нисслю Об.х10. Цифровая микрофотография. б. MAO Б-активные нейроны в гистаминергических ядрах E2-E5 гипоталамуса крысы (указаны стрелками) (P=–3.80 mm). Гистохимический метод [4]. Об.х10. Цифровая микрофотография. в. Гистаминиммунореактивные нейроны (P=–3.80 mm). Флюорисцентная микроскопия с использованием антител против гистамина [11]. Об.х10. Цифровая микрофотография.

гипоталамуса показало идентичность перикарионов МАО Б-активных нейронов, нейронов, окрашенных по Ниссля и иммуногистохимически, на выявление гистамина как по количеству, так и по форме, размерам и расположению во всех гистаминергических ядрах (Рис. 1). Установлено, что 90-100% перикарионов нейронов гистаминергических ядер гипоталамуса крысы являются МАО Б-активными и 90-95% последних являются гистаминиммунореактивными. Выявлена высокая корреляция между количеством МАО Б-активных и гистаминиммунореактивных нейронов в ядрах Е1-Е5 на различных уровнях ($r=0,998$; $p<0,01$). Вне гистаминергических ядер МАО Б-активные нейроны в гипоталамусе крысы не встречаются. Следовательно, МАО Б является хорошим маркером гистаминергических нейронов мозга.

Активность МАО Б (рис. 2 а-д) и в нейронах различных гистаминергических ядер гипоталамуса значительно варьирует. Она достоверно убывает в ряду $E2>E1, E3>E4>E5$ (табл.1). Анализ распределения гистаминергических нейронов по активности МАО Б показал, что нейроны с очень высокой активностью фермента встречаются только в ядрах Е1-Е3. Напротив, в этих ядрах встречаются лишь единичные нейроны с низкой активностью МАО Б, тогда как в ядрах Е4-Е5 их более 20%. Можно полагать, что окислительное дезаминирование (метаболизм гистамина) наиболее выражено в нейронах ядра Е2 и наименее выражено в ядре Е5.

Наименьшая активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) наблюдалась в нейронах ядра Е4. Она была достоверно меньше (на 8-9%), чем в нейронах гистаминергических ядер Е2, Е3 и Е5. Активность СДГ в нейронах аркуатного ядра достоверно (на 7%) меньше, чем в ядре Е2, Е3 и Е5 (табл. 1). Это свидетельствует о различной выраженности в нейронах разных гистаминергических ядер митохондриальных энергетических процессов. В целом они выше, чем в нейронах аркуатного ядра.

Наибольшая активность НАДН-дегидрогеназы

(НАДН ДГ) наблюдалась в ядре Е2. Однако различия по этому показателю между гистаминергическими ядрами не были статистически достоверны (табл. 1). Активность НАДН ДГ в нейронах аркуатного ядра статистически достоверно на 22% меньше, чем активность НАДН ДГ в ядре Е2, на 18%, чем в ядре Е3 и на 12%, чем в ядре Е4 (табл. 1).

Наибольшая активность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г-6-Ф ДГ) наблюдалась в ядре Е2, наименьшая – в Е5. Уровень активности Г-6-Ф ДГ в Е3 был достоверно больше, по сравнению с Е5. Различия по данному показателю между другими гистаминергическими ядрами не были статистически достоверны (табл. 1). Активность Г-6-Ф ДГ в нейронах аркуатного ядра статистически достоверно (на 12-20%) больше, чем активность этого фермента в нейронах гистаминергических ядер (табл. 1). Анализ гистограмм показал неоднородность популяции гистаминергических нейронов по активности Г-6-Ф ДГ. Так, в ядрах Е1 и Е2 отчетливо выявляются две субпопуляции нейронов: с высокой и низкой активностью фермента.

Наибольшая активность дегидрогеназы восстановленного НАДФ (НАДФН ДГ) наблюдалась в ядре Е2, наименьшая – в Е4. Уровень активности НАДФН ДГ в Е2 был статистически достоверно больше по сравнению с Е4 на 10%, с Е5 на 8%, в Е3 - больше по сравнению с Е4 на 7%. (табл. 1). В ядрах Е2, Е3, Е4, Е5 активность НАДФ ДГ положительно коррелирует с активностью Г-6-Ф ДГ при $r_{E2}=0.94$, $r_{E3}=0.89$, $r_{E4}=0.88$, $r_{E5}=0.88$, и $p<0,05$ (корреляционный анализ по Spearman). Активность НАДФН ДГ в нейронах аркуатного ядра статистически достоверно (на 17-26%) меньше, чем активность данного фермента в нейронах гистаминергических ядер (табл. 1). Следовательно, внемитохондриальные энергетические процессы в нейронах аркуатного ядра менее выражены, чем в нейронах гистаминергических ядер. В последних они более выражены в клетках ядра Е2 и Е3, по сравнению с нейронами ядра Е4 и Е5.

Таблица 1. Активность ферментов в нейронах гистаминергических ядер и аркуатного ядра гипоталамуса крысы

	Е1	Е2	Е3	Е4	Е5	Аркуатное ядро
МАО Б	863.33±64.84	918.45±13,63	863,55±15,77	797.8±20.9	764,50±39,94	-
НАДН ДГ	631.33±54.74	710.75±40,74	682,52±44,60	680.20±50	642,50±55,16	552±6,6
ЛДГ	691.33±10,87	748,38±9,20	720,76±21,53	731.50±10	729,83±13,65	601,3±5,4
Г-6-Ф ДГ	428.17±10.04	435.57±8,31	420,40±10,09	414.90±5.3	404,66±3,89	484,9±8,7
СДГ	433.33±6.24	443.10±10.2	444,47±4,47	405,5±11.7	444,00±10,19	412,4±16,2
НАДФН ДГ	964.67±38.09	1059.36±29,2	1028,47±21,54	959±19.8	978.67±6,55	780,7±12,3

Активность всех ферментов представлена в единицах оптической плотности $\times 10^3$.

Каждое значение является средним арифметическим \pm ошибка среднего, полученным от 5 животных.

Достоверность различий между группами указана в тексте статьи.

Е1-Е5 – обозначения разных гистаминергических ядер, согласно классификации [8].

Наибольшая активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) наблюдалась в ядре E2, наименьшая – в E1 (достоверно меньше по сравнению с E2 на 8% и с E4 на 5%) (Рис. 2е; Табл.1). Активность данного фермента в нейронах аркуатного ядра достоверно (на 12-20%) меньше, чем в гистаминергических нейронах различных ядер (табл. 1). Это свидетельствует о различиях в интенсивности анаэробного гликолиза в нейронах разных гистаминергических ядер и аркуатном ядре.

Таким образом, в нейронах ядра E2 активность MAO B и дегидрогеназ (кроме СДГ) выше, чем в нейронах других гистаминергических ядер. Активность MAO B, НАДФ ДГ и СДГ в нейронах ядра E3 выше по сравнению с клетками ядер E4 и E5. То есть окислительное дезаминирование (метаболизм гистамина) и процессы окислительного метаболизма наиболее выражены в нейронах гистаминергических ядер E3 и особенно E2 и наименее выражены в нейронах ядер E4 и E5. Обнаружены особенности окислительного метаболизма нейронов гистаминергических ядер по сравнению с нейронами аркуатного (дофаминергического) ядра. Первые имеют достоверно более высокую активность сукцинат, лактат, НАДН и НАДФН дегидрогеназ, а активность Г-6-фосфат дегидрогеназы – ниже. В ядре E5 объём нейронов (данные представлены в другой статье [2]) отрицательно коррелирует с активностью НАДФ ДГ ($r = -0.95$, $p < 0,05$), Г-6-Ф ДГ ($r = -0.90$, $p < 0,05$) и ЛДГ ($r = -0.90$, $p < 0,05$). Учитывая, что объём нейронов в ядре E5 больше, чем в остальных гистаминергических ядрах [3], а активность НАДФ ДГ, Г-6-Ф ДГ и ЛДГ, наоборот, выше, можно предполагать, что с увеличением размеров перикарионов гистаминергических нейронов внемитохондриальные энергетические процессы и процессы анаэробного гликолиза в них ослабевают.

Выводы

Высокая активность MAO B является хорошим маркером гистаминергических нейронов и, соответственно, гистаминергических ядер E1-E5 гипоталамуса крысы. Нейроны гистаминергических ядер в целом значительно отличаются по окислительному метаболизму от нейронов дофаминергического аркуатного ядра. Популяция нейронов гистаминергических ядер неоднородна по интенсивности окислительного дезаминирования и окислительного метаболизма: эти процессы наиболее активны в нейронах гистаминергических ядер E3 и особенно E2 и наименее активны в нейронах ядер E4 и E5.

Литература

1. Анищик О.В., Зиматкин С.М. Центральная гистаминергическая система в норме и при некоторых патологических состояниях. // Вестн НАН Беларуси. - 2002. - №2. - с. 94-102.
2. Зиматкин С.М., Кузнецова В.Б., Анищик О.В. Гистаминергическая нейронная система мозга // Морфология. - 2003. - Т.123. - Вып.2. - С. 97 – 105.3.
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: Сб. тр. науч. конф. под ред. доц. Е.С. Околокулака. – Гродно: ГГМУ, 2003. - С.74-76.
4. Зиматкин С.М., Цыдик В.Ф. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге// Морфология. - 1994. - № 4-6. - С.157-161.
5. Brown R.E., David R. Stevens, Helmut L. Haas. The physiology of brain histamine// Prog.Neurobiol. - 2001, v. 63, p. 1-35.
6. Haas H., Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system// Neurosciences. - 2003. -Vol. 4. - P. 121-130.
7. Hess R., Scarpelli D.G., Pirse A.G.E. // Nature. - 1958. - Lond. - Vol. 174. - P. 1104. - Цит. по Пирс Э. Гистохимия. - М., 1962. С. 845-846.
8. Inagaki N., Toda K., Taniuchi I., Panula P., Yamatodani A., Tohyama M., Watanabe T. and Wada H. 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 - Vol. 80. - P. 374-380.
9. Nachlas M.M., Tsousou K.-C., de Souza E., Sheng C.-S., Seligman A.M. //J. Histochem.Cytochem., 1957, v.5, p. 420. - Цит. по Пирс Э. Гистохимия. - М., 1962, С. 844-844.
10. Nachlas M.M., Walker D.G., Seligman A.M. Improvement in the histochemical localization of leucine aminopeptidase with a new substrate// J. Biophys. Biochem. Cytol. - 1960. - V4, - P. 261-264.
11. Panula P., Yang Y.-Y. and Costa E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus// Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 1984. - Vol. 81. - P. 2572-2576.
12. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. - New York, 1986.

Summary

MAOB ACTIVITY AND DEHYDROGENASE ACTIVITY OF THE HISTAMINERGIC NUCLEI NEURONS IN RAT BRAIN

V.B.Kuznetsova, R.E.Lis, S.M.Zimatkin

It was found that MAO B activity is a good marker of histaminergic neurons and, histaminergic nuclei E1-E5 of the rat hypothalamus, accordingly. In general, the neurons of the histaminergic nuclei significantly differ from the neurons of dopaminergic arcuate nucleus in their oxidative metabolism. In the former neurons the succinate-, lactate- and NADPH dehydrogenase activities were higher, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was lower. The population of the histaminergic nuclei neurons was heterogeneous in their metabolic activity. Those processes were most active in the neurons of histaminergic nuclei E3 and, especially, E2 and the least active in the neurons of E4 and E5. It indicates the considerable peculiarities of oxidative metabolism and metabolic heterogeneity of neuron population in the histaminergic nuclei of the rat brain.