

*А. В. ЗАЕРКО, Е. М. ФЕДИНА, С. М. ЗИМАТКИН*

## **НАРУШЕНИЯ РАЗВИТИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ МОЗГА У ПОТОМСТВА КРЫС, ПОТРЕБЛЯВШИХ АЛКОГОЛЬ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ**

*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,  
г. Гродно, Республика Беларусь*

Установлено, что потребление алкоголя самками крыс во время беременности приводит к значительным ультраструктурным изменениям энергетического аппарата гистаминергических нейронов гипоталамуса их потомства, которые на 5, 20 и 45-е сутки после рождения животных проявляются сниженным количеством митохондрий на единицу площади цитоплазмы клеток, на ранних этапах постнатального онтогенеза (5-е сутки) гипертрофией митохондрий, а в дальнейшем (20-е, 45-е сутки) уменьшением размеров этих органелл, что отражает деструктивные и адаптационные изменения изучаемых нейронов.

*Ключевые слова:* гистаминергические нейроны, головной мозг, митохондрии, пренатальная алкоголизация.

**Введение.** Гистаминергические нейроны головного мозга регулируют многие функции и системы организма. Гистамин обладает антигипнотическим действием – сокращает парадоксальную фазу сна и облегчает пробуждение; стимулирует общую двигательную и половую активность; оказывает анальгетическое действие; усиливает жажду, но подавляет аппетит; участвует в регуляции артериального давления (повышает его), температуры тела (снижает её), энергетического метаболизма мозга (стимулирует гидролиз гликогена). Известна роль центрального гистамина при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, таких как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и энцефалопатия Вернике и др. [1]. У млекопитающих перикарионы гистаминергических нейронов головного мозга локализованы только в заднем отделе гипоталамуса, в туберомамиллярных ядрах, там они формируют пять ядер (E1 – E5). Гистаминергическое ядро E2 – самое крупное ядро, на него приходится более 50 % гистаминергических нейронов гипоталамуса [2].

Митохондрии – это органеллы, которые встречаются практически во всех эукариотических клетках. Большинство клеток содержат очень много митохондрий, причем наибольшее их количество приходится на клетки с самыми высокими энергетическими потребностями, например нейроны. Эти органеллы отвечают за клеточную энергию, которая образуется при окислительных процессах и запасается в виде макроэргических связей молекул АТФ. Митохондрии состоят из тысяч различных типов белков, подавляющее большинство которых закодировано в ядре, и которые выполняют очень широкий спектр метаболических функций. Дыхательная цепь митохондрий является основной структурой окислительного фосфорилирования и играет центральную роль в клеточном энергетическом метаболизме [3].

Считается, что митохондриальные заболевания могут быть причиной или фактором риска для многих других заболеваний, в частности, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера [4], в патогенезе которых принимают участие и гистаминергические нейроны [1]. В связи с этим, интересным и важным является оценить состояние энергетического аппарата в развивающихся гистаминергических нейронах головного мозга крыс, развивавшихся в условиях пренатальной алкоголизации.

Цель исследования – оценить состояние энергетического аппарата в развивающихся гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности.

**Материалы и методы исследования.** Исследование выполнено на потомстве беспородных белых крыс (12 крысят), в соответствии с принципами биоэтики и требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей (Directive, 2010) [5]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 30.01.2018). Животные находились на стандартном рационе вивария. Декапитация крысят осуществлялась на 5, 20 и 45-е сутки после рождения (для лучшей оценки динамики развития брали по одному крысенку из каждого помета на каждый срок, всего по 4 крысенка). Быстро извлекали головной мозг, вырезали гипоталамус и помещали его в 1 % осмиевый фиксатор на буфере Миллонига (pH = 7,4) на 2 часа при температуре +4° С. Далее образцы промывали в смеси буфера Миллонига (20 мл) и сахарозы (900 мг), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, смеси спирта и ацетона и ацетоне, проводили через смеси смолы и ацетона и заключали в заливочную смолу (аралдит М + аралдит Н + дибутилфталат + ДМР-30).

Полутонкие срезы (толщиной около 350 нм) изготавливали на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica, Germany), окрашивали метиленовым синим для уточнения локализации изучаемой структуры – гистаминергического ядра E2. Ультратонкие срезы (толщиной около 35 нм) собирали на опорные сеточки, контрастировали ацетатом урана [6] и цитратом свинца [7].

Готовые препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония). Для фотографирования использовался комплекс из цифровой камеры Olympus Mega View III (Germany) и программы iTEM (Version 5.0 (Build 1224); Serial Number A3766900-7E852FAB). Ультраструктурную морфометрию проводили с помощью программы обработки изображения iTEM (Version 5.0; Build 1224; Serial Number A3766900-7E852FAB, Германия), обводя курсором на мониторе компьютера выбранные объекты и оценивая их количество и размеры.

Полученные данные обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Количественные результаты представляли в виде «Me (LQ; UQ)», где Me – медиана, LQ – верхняя граница нижнего квартиля, UQ – нижняя граница верхнего квартиля. Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test). Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ( $p < 0,05$ ) [8].

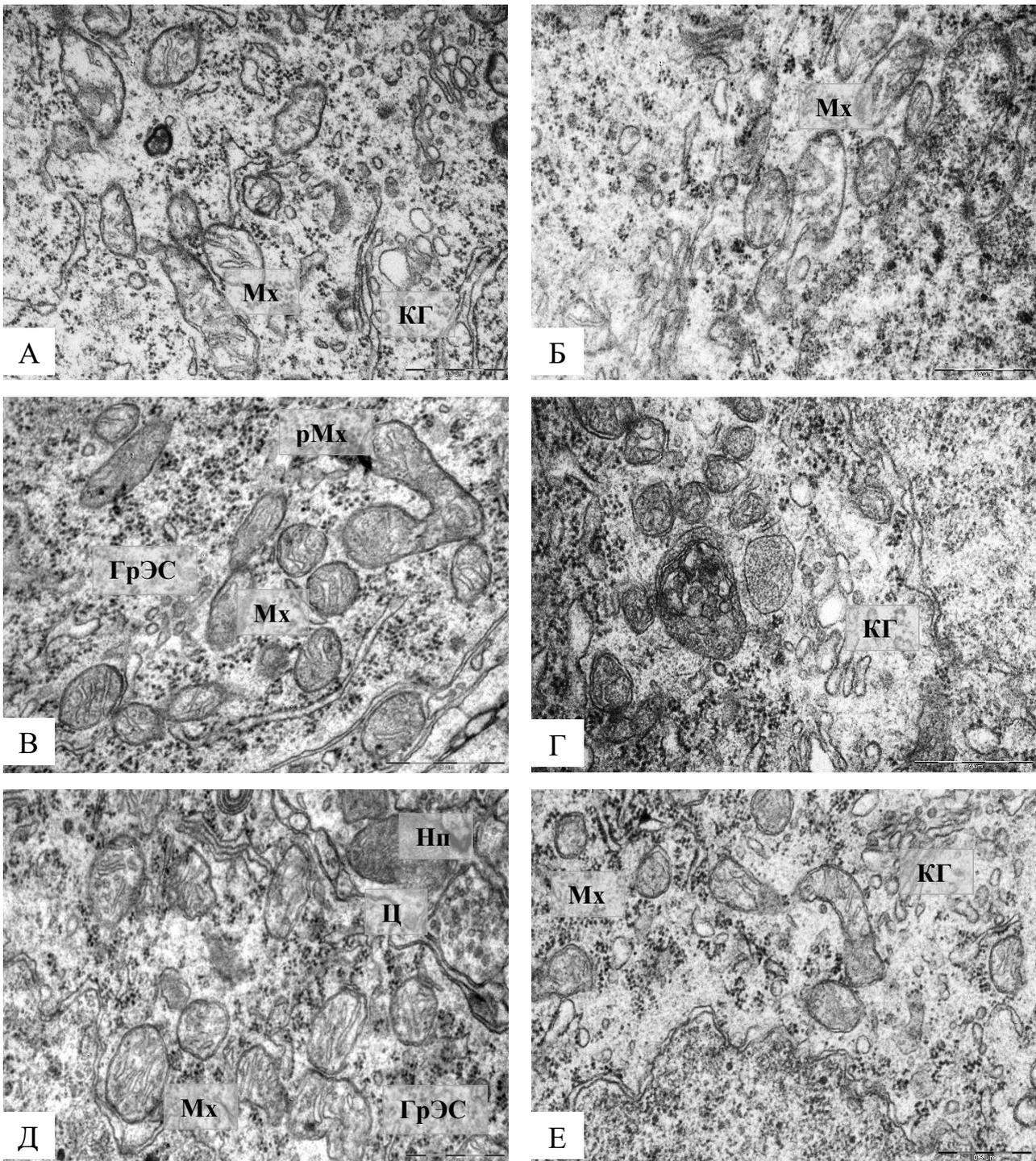
**Результаты и их обсуждение.** Результаты электронно-микроскопического исследования показали, что в гистаминергических нейронах ядра E2 гипоталамуса у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности, с 5-х по 45-е сутки постнатального развития наблюдаются значительные и разнообразные ультраструктурные изменения их энергетического аппарата в сравнении с контрольной группой животных.

Так, количество митохондрий в гистаминергических нейронах головного мозга крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию, на все исследованные сроки постнатального развития существенно снижено: на 5-е сутки – в 1,3 раза, на 20-е и 45-е сутки – в 1,2 раза (таблица 1, рисунок 1).

**Таблица 1.** Изменение показателей митохондрий гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности (Me (LQ; UQ))

Показатель	Контроль	Опыт
<b>5 сутки</b>		
Количество митохондрий шт/мкм <sup>2</sup> цитоплазмы	1,65 (1,16; 2,08)	1,23 (1,02; 1,45)*
Минимальный диаметр, мкм	0,16 (0,15; 0,18)	0,18 (0,17; 0,19)*
Максимальный диаметр, мкм	0,27 (0,23; 0,30)	0,29 (0,25; 0,31)*
Периметр, мкм	0,72 (0,66; 0,81)	0,76 (0,73; 0,88)*
Площадь митохондрий, мкм <sup>2</sup>	0,03 (0,03; 0,04)	0,05 (0,03; 0,07)*
Относительная площадь митохондрий, мкм <sup>2</sup> /мкм <sup>2</sup> цитоплазмы	0,07 (0,05; 0,09)	0,09 (0,07; 0,11)*
Форм-фактор	0,79 (0,75; 0,81)	0,82 (0,78; 0,98)*
Фактор элонгации	1,56 (1,44; 1,72)	1,53 (1,49; 1,73)
Длина крист митохондрии, мкм	0,12 (0,10; 0,16)	0,06 (0,04; 0,8)*
<b>20 сутки</b>		
Количество митохондрий шт/мкм <sup>2</sup> цитоплазмы	2,21 (1,67; 2,75)	1,82 (1,65; 2,15)*
Минимальный диаметр, мкм	0,15 (0,14; 0,17)	0,12 (0,11; 0,14)*
Максимальный диаметр, мкм	0,26 (0,22; 0,29)	0,23 (0,21; 0,25)*
Периметр, мкм	0,71 (0,62; 0,77)	0,68 (0,61; 0,73)*
Площадь митохондрий, мкм <sup>2</sup>	0,03 (0,02; 0,03)	0,02 (0,01; 0,03)*
Относительная площадь митохондрий, мкм <sup>2</sup> /мкм <sup>2</sup> цитоплазмы	0,08 (0,06; 0,10)	0,07 (0,05; 0,09)*
Форм-фактор	0,78 (0,76; 0,81)	0,78 (0,73; 0,80)
Фактор элонгации	1,66 (1,56; 1,78)	1,63 (1,58; 1,69)*
Длина крист митохондрии, мкм	0,14 (0,11; 0,18)	0,10 (0,08; 0,12)*
<b>45 сутки</b>		
Количество митохондрий шт/мкм <sup>2</sup> цитоплазмы	2,85 (2,22; 3,60)	2,35 (2,15; 2,65)*
Минимальный диаметр, мкм	0,16 (0,14; 0,17)	0,16 (0,13; 0,18)
Максимальный диаметр, мкм	0,26 (0,22; 0,29)	0,25 (0,22; 0,27)*
Периметр, мкм	0,71 (0,62; 0,82)	0,69 (0,63; 0,75)*
Площадь митохондрий, мкм <sup>2</sup>	0,03 (0,02; 0,04)	0,03 (0,02; 0,04)
Относительная площадь митохондрий, мкм <sup>2</sup> /мкм <sup>2</sup> цитоплазмы	0,11 (0,09; 0,13)	0,10 (0,08; 0,12)*
Форм-фактор	0,78 (0,74; 0,80)	0,78 (0,75; 0,81)
Фактор элонгации	1,67 (1,56; 1,82)	1,66 (1,63; 1,70)
Длина крист митохондрии, мкм	0,18 (0,15; 0,24)	0,15 (0,12; 0,17)*

Примечание: \* –  $p < 0,05$ , при сравнении с контролем.



**Рисунок 1.** Митохондрии в цитоплазме гистаминергических нейронов гипоталамуса крыс на 5-е (А, Б), 20-е (В, Г) и 45-е (Д, Е) сутки постнатального развития. Гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), комплекс Гольджи (КГ), митохондрии (Мх), нейропиль (Нп), разветвленная митохондрия (рМх), цитолемма (Ц). Электронограммы. Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Увелич. 50000

В митохондриях гистаминергических нейронов 5-суточных крысят отмечается повреждение крист, сопровождающееся просветлением внутримитохондриального матрикса. Некоторые митохондрии находятся в состоянии набухания. При этом средние размеры и периметр митохондрий увеличены. Относительная площадь митохондрий на единицу площади цитоплазмы превышает контрольное значение в 1,3 раза (таблица 1). Форм-фактор

митохондрий в опытных образцах также возрастает (в 1,04 раза), что говорит об увеличении сферичности данных органелл по сравнению с контролем.

Согласно данным Ramachandran и соавторов [9], в митохондриях мозга плода, подвергшихся воздействию этанола, накапливается 4-гидрокси-2-ноненал (4-HNE), токсичный продукт перекисного окисления липидов, который вызывает отек митохондрий, сохраняющийся и на ранние сроки постнатального развития гистаминергических нейронов гипоталамуса. Набухание митохондрий свидетельствует о функциональном напряжении клетки, обусловленном кислородным голоданием и развитием в нервной ткани гипоксических процессов [10, 11].

У 20-суточного и 45-суточного потомства крыс, потреблявших алкоголь в период беременности, при сравнении с контрольной группой животных отмечается уменьшение относительной площади митохондрий в 1,1 раза (таблица 1).

Длина крист митохондрий в гистаминергических нейронах на все исследованные сроки постнатального развития у крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию, значительно уменьшена: на 5-е сутки – в 2 раза, на 20-е сутки – в 1,4 раза, на 45-е сутки – в 1,2 раза (таблица 1).

Согласно классификации, предложенной Э. Н. Поповой [12], ультраструктурные изменения в цитоплазме нейронов головного мозга пренатально алкоголизированных животных можно разделить на три категории: задержка созревания некоторых органелл, деструктивные изменения органелл, преобразования, носящие компенсаторный характер. У гистаминергических нейронов выявленные отличия в количестве и структуре митохондрий можно отнести к деструктивным изменениям данных органелл, которые указывают на снижение их функциональной активности [13], что подтверждается описанными нами ранее нарушениями метаболизма гистаминергических нейронов гипоталамуса опытных животных, согласно которым у крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию, на разные сроки постнатального развития наблюдается сниженная активность сукцинатдегидрогеназы и экспрессия АТФ-синтазы – маркеров внутренней мембраны митохондрий [14–16].

Следует отметить, изменение функциональной активности митохондрий может выступать в качестве основного пускового фактора в патогенезе некоторых нейродегенеративных расстройств, включая нейродегенерацию центральной нервной системы, вызванную этанолом [4, 9].

**Заключение.** Потребление алкоголя самками крыс во время беременности приводит к значительным ультраструктурным изменениям энергетического аппарата гистаминергических нейронов гипоталамуса их потомства, которые на 5, 20 и 45-е сутки после рождения животных проявляются сниженным количеством митохондрий на единицу площади цитоплазмы клеток, на ранних этапах постнатального онтогенеза (5-е сутки) гипертрофией митохондрий, а в дальнейшем (20-е, 45-е сутки) уменьшением размеров этих органелл, что отражает деструктивные и адаптационные изменения изучаемых нейронов.

*Источники финансирования. Работа выполнена в рамках Гранта БРФФИ «Наука М» на тему «Нарушения развития гистаминергических нейронов мозга у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности», договор № M23M-104.*

*Sources of financing. The research was carried out within the frames of the grant from the Belarussian Foundation for Basic Research «Science M» on the topic "Disturbances in the development of histaminergic neurons of the brain in the offspring of rats that consumed alcohol during pregnancy», № M23M-104.*

#### Литература:

- [1]. Haas H., Sergeeva O., Selbach O. Histamine in the nervous system // *Physiol Rev.* 2008. Vol. 88, № 3. P. 1183–1241.
- [2]. Зиматкин С.М. Гистаминергические нейроны мозга. Мн.: Новое знание, 2015. 319 с.
- [3]. Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Роль митохондрий в энергетике клетки и характеризующие ее молекулярные маркеры // *Оренбург. мед. вестн.* 2019. Т. 7, № 1 (25). С. 47–52.

- [4]. *Manfredi G., Beal M.F.* The role of mitochondria in the pathogenesis of neurodegenerative diseases // *Brain Pathol.* 2000. Vol. 10, № 3. P. 462–472.
- [5]. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes: text with EEA relevance 20.10.2010. Strasbourg: Official Journal of the European Union, 2010. 46 p.
- [6]. *Watson M.L.* Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals // *J Biophys Biochem Cyt.* 1958. Vol. 4, № 4. P. 475–478.
- [7]. *Reynolds E.S.* The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // *J Cell Biol.* 1963. Vol. 17, № 1. P. 208–212.
- [8]. *Омельянченко В.П., Демидова А.А.* Информатика, медицинская информатика, статистика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. 608 с.
- [9]. *Ramachandran V, Perez A., Chen J. et al.* In utero ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction, which can result in apoptotic cell death in fetal brain: a potential role for 4-hydroxynonenal // *Alcohol Clin Exp Res.* 2001. Vol. 25, № 6. P. 862–871.
- [10]. *Brooks G.A.* Hypoxia: translation in progress. Eds. R.C. Roach, P.H. Hackett, P.D. Wagner. Springer Science+Business Media: New York, 2016. P. 439–455.
- [11]. *Gonchar O., Mankovskaya I.* Effect of moderate hypoxia/reoxygenation on mitochondrial adaptation to acute severe hypoxia // *Acta Biol Hung.* 2009. Vol. 60, № 2. P. 185–194.
- [12]. *Попова Э.Н.* Ультраструктура нейронов и межнейронных связей сенсомоторной коры у потомства алкоголизированных крыс. М.: Науч. мир, 2010. 158 с.
- [13]. *Vukiya A.N.* Fetal cerebral artery mitochondrion as target of prenatal alcohol exposure // *Int J Environ Res Public Health.* 2019. Vol. 16, № 9. P. 1–16.
- [14]. *Заерко А.В., Федина Е.М., Зиматкин С.М.* Морфофункциональное состояние гистаминергических нейронов мозга 45-суточного потомства крыс, потреблявших этанол во время беременности // *Журн. Гродн. гос. мед. ун-та.* 2018. Т. 16, № 6. С.685–689.
- [15]. *Заерко А.В., Федина Е.М., Зиматкин С.М.* // Особенности окислительного метаболизма гистаминергических нейронов мозга 5-суточного потомства крыс, потребляющих этанол во время беременности // *Биохимия и молекулярная биология. Механизмы регуляции процессов жизнедеятельности в норме и патологии* : сб. науч. тр.. Минск. 2019. Вып. 3. С.164–167.
- [16]. *Заерко А.В., Федина Е.М., Зиматкин С.М. и др.* // Иммуногистохимические изменения в гистаминергических нейронах гипоталамуса крыс 45-суточного возраста, перенесших пренатальную алкоголизацию // *Актуальные проблемы медицины* : сб. материалов итоговой науч.-практ. конф.. Гродно. 2023. С. 146–148.

*A. V. ZAERKO, E. M. PHEDINA, S. M. ZIMATKIN*

**DISORDERS IN THE ENERGY APPARATUS DEVELOPMENT OF THE BRAIN  
HISTAMINERGIC NEURONS IN THE OFFSPRING OF RATS THAT CONSUMED ALCOHOL  
DURING PREGNANCY**

*Educational Establishment “Grodno State Medical University”, Grodno, Republic of Belarus*

**Summary**

It has been established that alcohol consumption by female rats during pregnancy leads to significant ultrastructural changes in the energy apparatus of histaminergic neurons of the hypothalamus of their offspring, which on the 5th, 20th and 45th days after the birth of the animals are manifested by a reduced number of mitochondria per unit area of the cell cytoplasm, in the early stages of postnatal ontogenesis (5th day) by hypertrophy of mitochondria, and later (20th, 45th day) by a decrease in the size of these organelles, which reflects destructive and adaptive changes in the neurons studied.

*Keywords:* histaminergic neurons, brain, mitochondria, prenatal alcoholization.