
МОРФОЛОГИЯ

**А. В. Смирнов^{1,3}, А. А. Замлелов¹, А. В. Синельщикова¹, В. В. Багметова²,
Н. С. Ганзикова², И. В. Малюженко², Д. Н. Сидоров³**

Волгоградский государственный медицинский университет,

¹ кафедра патологической анатомии,

² кафедра фармакологии и биофармации ФУВ;

³ Волгоградский медицинский научный центр

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОГО АЛКОГОЛИЗМА

УДК 616-091.8

Проведен качественный и количественный анализ патоморфологических изменений в гиппокампе крыс при моделировании хронического алкоголизма. Были выявлены признаки обратимого и необратимого повреждения, максимально выраженные в пирамидном слое СА3, а также признаки развития компенсаторно-приспособительных процессов с преобладанием атрофии, которые были наиболее выражены в зоне СА1, выявлен очаговый характер поражения пирамидных нейронов.

Ключевые слова: хронический алкоголизм, крыса, гиппокамп.

**A. V. Smirnov, A. A. Zamlelov, A. V. Sinelshchikova, V. V. Bagmetova,
N. S. Ganzikova, I. V. Malyuschenko, D. N. Sidorov**

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE RAT HIPPOCAMPUS IN MODELING CHRONIC ALCOHOLISM

A qualitative and quantitative analysis of pathomorphological changes in the rat hippocampus was carried out in the modeling of chronic alcoholism. The signs of reversible and irreversible damage were revealed as maximum in the pyramidal layer of CA3, as well as signs of development of compensatory-adaptive processes with predominance of atrophy, which were most pronounced in the CA1, and the focal character of pyramidal neurons damage was revealed.

Key words: chronic alcoholism, rat, hippocampus.

Одним из органов-мишеней при воздействии хронической алкогольной интоксикации является головной мозг, при этом происходит нарушение его функции и строения [6]. Алкогольное повреждение нейронов определяется во всех отделах головного мозга. Особенно интенсивные признаки повреждения нейронов обнаруживаются в гиппокампе [10, 11].

Влияние этанола на головной мозг обусловлено его самостоятельным действием на нервную ткань, а также влиянием метаболитов алкоголя (ацетальдегид, ацетат, аденозин, сальсоинол и др.) [3, 5]. В конечном итоге под влиянием длительного воздействия алкоголя происходит повреждение нейронов в ЦНС и

развитие нейродегенеративных изменений [10]. По литературным данным, длительная алкоголизация вызывает структурные изменения в головном мозге, которые наблюдаются в результате ускоренного старения [5, 8, 9].

Поскольку гиппокамп является частью лимбической системы, то с его помощью осуществляются когнитивные, эмоциональные и пространственно-ориентировочные функции. Под влиянием алкоголя нарушается работа гиппокампа и его связи с другими анатомическими отделами головного мозга, в частности с неокортексом [1, 7]. Несмотря на то, что существует значительное количество работ, посвященных действию алкоголя на гиппокамп,

остается мало освещенным вопрос об морфологических изменениях гиппокампа в условиях хронической алкоголизации.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

С помощью морфометрических методик исследовать структурные изменения в зонах CA1–CA4 пирамидального слоя гиппокампа крыс при моделировании экспериментальной хронической алкоголизации.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на белых лабораторных крысах самцах 4–4,5-месячного возраста исходной массы 220–240 г. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», были учтены требования комиссии Российского национального комитета по биоэтике при Российской академии наук. Хронический алкоголизм моделировался на крысах путем замены питьевой воды 5%-м этиловым спиртом, подслащенным сахарозой (5 г сахара на 100 мл 5%-го раствора этанола) в течение 20 недель. По истечении 20-недельного срока крысы выводились из эксперимента. Декапитацию проводили гильотинным методом, фиксировали образцы головного мозга в 10 %-м забуференном формалине. По стандартной методике изготавливали парафиновые блоки и срезы толщиной 5–7 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, толуидиновым синим по методу Ниссля. Проводили качественный и количественный анализ пирамидного слоя гиппокампа. Исследование микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа «Axio Lab. A1», фотодокументирование осуществляли камерой «AxioCam 105 color». Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ Excell и Statistica 10.0. Данные представляли в виде медианы с указанием интерквартильного интервала. Различия между группами оценивали по критерию Манна-Уитни и считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для проведения количественного анализа гистологических препаратов, использовались морфометрические методы, с помощью которых были описаны планиметрические свойства нейронов и их структур. Среди планиметрических свойств нейронов определялись абсолютные показатели нейронов, такие как: площадь перикарионов, площадь ядер нейронов, площадь цитоплазмы нейронов. Выполнены измерения толщины пирамидного слоя гиппокампа, количества нейронов гиппокампа с признаками повреждения в поле зрения. На основании полученных абсолютных показателей

нейронов рассчитан относительный показатель – медиана относительной плотности нейропиля в пирамидном слое и определены медианы ядерно-цитоплазматического отношения нейронов гиппокампа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Качественный анализ в группе алкоголизованных животных продемонстрировал очаговый характер поражения всех зон гиппокампа, были выявлены множественные участки чередования умеренного и выраженного поражения. Наблюдались нейроны, которые имели видимую разницу в размерах перикарионов, обнаруживались преимущественно мелкие и средние размеры клеток. Цитоплазма части нейронов отличалась выраженным диффузным гиперхроматозом, в большем количестве встречались нейроны с очаговым гиперхроматозом (рис. 1). Отмечалось эксцентричное расположение ядер в нейронах, конденсация хроматина разной выраженности и эктопия ядрышек. У отдельных животных обнаружена вакуолизация ядра. Пирамидный слой CA3 имел неравномерную толщину, определялись очаговые участки с резким уменьшением его толщины до одного нейрона и места выпадения нейронов, а также очаговым глиозом. В группе алкоголизованных животных наблюдался выраженный перичеселлюлярный отек, с участками спонгиоза.

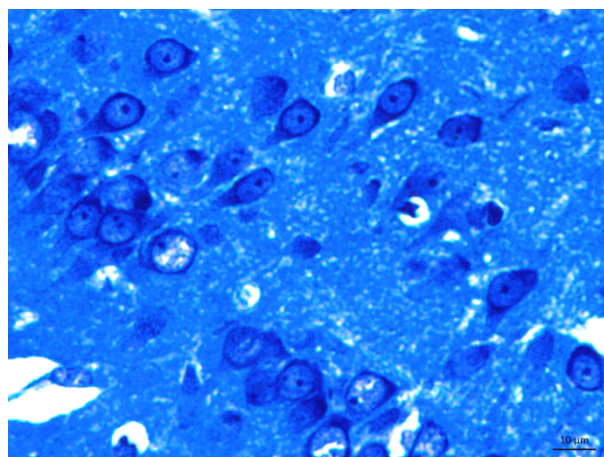


Рис. 1. Гистологическое строение пирамидного слоя зоны CA1 гиппокампа крыс в возрасте 4–4,5 месяцев при моделировании принудительной 20-недельной алкогольной интоксикации. Очаговый гиперхроматоз нейронов пирамидного слоя и эктопия ядрышек, участки выпадения нейронов.

Окр. тионином по методу Ниссля. Ув. X 400

При морфометрической оценке абсолютных показателей пирамидного слоя в зоне CA1 выявлено, что площадь перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа у алкоголизиро-

ванных крыс уменьшилась на 24,56 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 72, (13 61,61; 82,86) мкм², группа интакта – Ме 95,62 (72,81; 110,19) мкм²]. Площадь ядер нейронов пирамидного слоя у алкоголизованных крыс снизилась на 30,8 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 46,72 (40,44; 55,05) мкм², группа интакта – Ме 67,59 (50,43; 79,01) мкм²]. Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов пирамидного слоя у алкоголизованных животных снизилась на 13,4 %, $p < 0,01$ [группа алкоголя – Ме 25,01 (21,69; 30,95) мкм², группа интакта – Ме 28,91 (22,65; 36,16) мкм²]. Ядерно-цитоплазматическое отношение нейронов пирамидного слоя гиппокампа у алкоголизованных крыс снизилось на 26,9 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 1,79 (1,53; 2,09), группа интакта – Ме 2,45 (2,01; 2,87)]. Удельное количество нейронов с признаками повреждения у алкоголизованных крыс увеличилось на 20 %, $p > 0,05$ [группа алкоголя – Ме 5 (3; 7), группа интакта – Ме 4 (3; 5)]. Толщина пирамидного слоя зоны СА1 у алкоголизованных крыс (рис. 2, г) снизилась на 29,1 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 22,9 (19,4; 28,8) мкм, группа интакта – Ме 32,3 (27,9; 38,3) мкм]. Относительная плотность нейропилия у алкоголизованных крыс увеличилась на 23,19 %, $p < 0,01$ [группа алкоголя – Ме 38,89 (30,37; 46,8) %, группа интакта – Ме 29,87 (25; 32,62) %].

При морфометрическом изучении абсолютных показателей нейронов пирамидного слоя в зоне СА2 площадь перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа у алкоголизованных крыс уменьшилась на 26,2 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 80,44 (64,46; 97,48) мкм², группа интакта – Ме 109,04 (98,32; 127,13) мкм²]. Площадь ядер нейронов пирамидного слоя у алкоголизованных крыс уменьшилась на 27,6 % $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 52,37 (43,64; 65,93) мкм², группа интакта – Ме 72,36 (65,12; 84,34) мкм²]. Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов пирамидного слоя у алкоголизованных животных снизилась на 28,1 %, $p > 0,05$ [группа алкоголя – Ме 25,89 (21,11; 30,69) мкм², группа интакта – Ме 35,9 (30,19; 42,25) мкм²]. Ядерно-цитоплазматическое отношение нейронов пирамидного слоя гиппокампа у алкоголизованных крыс и интактных животных одинаково, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 1,99 (1,71; 2,35), группа интакта – Ме 1,99 (1,77; 2,29)]. Удельное количество нейронов с признаками повреждения в поле зрения у алкоголизованных крыс уменьшилось на 20 %, $p > 0,05$ [группа алкоголя – Ме 4 (3; 5)], группа интакта – Ме 5 (4,5; 6)]. Толщина пирамидного слоя зоны СА2 у алкоголизованных крыс (рис. 2, г) снизилась на 27,6 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 29,8

(25,3; 35,6) мкм, группа интакта – Ме 41,2 (36,2; 45,1) мкм]. Относительная плотность нейропилия у алкоголизованных крыс снизилась на 14,6 %, $p > 0,05$ [группа алкоголя – Ме 26,76 (24,05; 33,61) %, группа интакта – Ме 31,35 (28,07; 39,08) %].

Гистологическое исследование пирамидного слоя в зоне СА3. Площадь перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа у алкоголизованных крыс уменьшилась на 0,94 %, $p > 0,05$, [группа алкоголя – Ме 101,52 (88,05; 120,87) мкм², группа интакта – Ме 102,49 (95,47; 112,52) мкм²]. Площадь ядер нейронов пирамидного слоя у алкоголизованных крыс уменьшилась на 5,7 %, $p > 0,05$, [группа алкоголя – Ме 63,39 (54,48; 76,29) мкм², группа интакта – Ме 67,23 (62,09; 76,31)] мкм². Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов пирамидного слоя у алкоголизованных животных снизилась на 28,1 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 42,16 (33,83; 51,35) мкм², группа интакта – Ме 30,31 (26,14; 37,03) мкм²]. Ядерно-цитоплазматическое отношение нейронов пирамидного слоя гиппокампа у алкоголизованных крыс уменьшилось на 25,2 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 1,6 (1,33; 1,91), группа интакта – Ме 2,14 (1,77; 2,52)]. Удельное количество нейронов с признаками повреждения в поле зрения у алкоголизованных крыс увеличилось на 41,6 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 6 (5; 9), группа интакта – Ме 3,5 (3; 4)]. Толщина пирамидного слоя зоны СА3 у алкоголизованных крыс снизилась на 15,8 % (рис. 2, г), $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 31,4 (26,3; 36,9) мкм, группа интакта – Ме 37,3 (32,3; 42,4) мкм]. Относительная плотность нейропилия у алкоголизованных крыс снизилась на 8,22 %, $p > 0,05$ [группа алкоголя – Ме 36,09 (63,68; 31,21) %, группа интакта – Ме 33,12 (26,9; 38,44) %].

Гистологическое исследование абсолютных показателей пирамидного слоя в зоне СА4. Площадь перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа у алкоголизованных крыс увеличилась на 3,98 %, $p > 0,05$ [группа алкоголя – Ме 92,79 (81,81; 103,76) мкм², группа интакта – Ме 89,09 (71,28; 100,94) мкм²]. Площадь ядер нейронов пирамидного слоя у алкоголизованных крыс увеличилась на 10,3 %, $p > 0,05$ [группа алкоголя – Ме 58,85 (51,99; 66,29) мкм², группа интакта – Ме 52,74 (45,81; 58,19) мкм²]. Площадь цитоплазмы перикарионов нейронов пирамидного слоя у алкоголизованных животных увеличилась на 25,6 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 35,93 (30,07; 41,3) мкм², группа интакта – Ме 26,72 (22,85; 31,25) мкм²]. Ядерно-цитоплазматическое отношение нейронов пирамидного слоя гиппокампа у алкоголизованных крыс умень-

шилось на 27,1 %, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 1,53 (1,28; 1,88), группа интакта – Ме 2,1 (1,79; 2,41)]. Удельное количество нейронов с признаками повреждения в поле зрения у алкоголизованных и интактных животных одинаково, $p < 0,001$ [группа алкоголя – Ме 4 (4,5; 5), группа интакта – Ме 4 (3; 4)]. Толщина пирамидного слоя зоны CA3 у алкоголизованных крыс (рис. 2, г) снизилась на 16,7 %, $p > 0,05$ [группа алкоголя – Ме 45,7 (40,8; 54,9) мкм, группа интакта – Ме 54,9 (41,3; 74,2) мкм]. Относительная плотность нейропилля у алкоголи-

зированных крыс увеличилась на 16,2 %, $p < 0,03$ [группа алкоголя – Ме 40,63 (34,53; 50,03) %, группа интакта – Ме 34,03 (30,32; 37,6) %].

Такие морфологические изменения, по данным морфометрии, в целом соответствуют данным литературы [4, 6, 7], однако нами был выявлен очаговый характер поражения нейронов и пирамидного слоя нейронов, выявлены обратные изменения площади перикарионов, ядер и цитоплазмы в зонах CA1–CA4 (рис. 2 а, б, в).

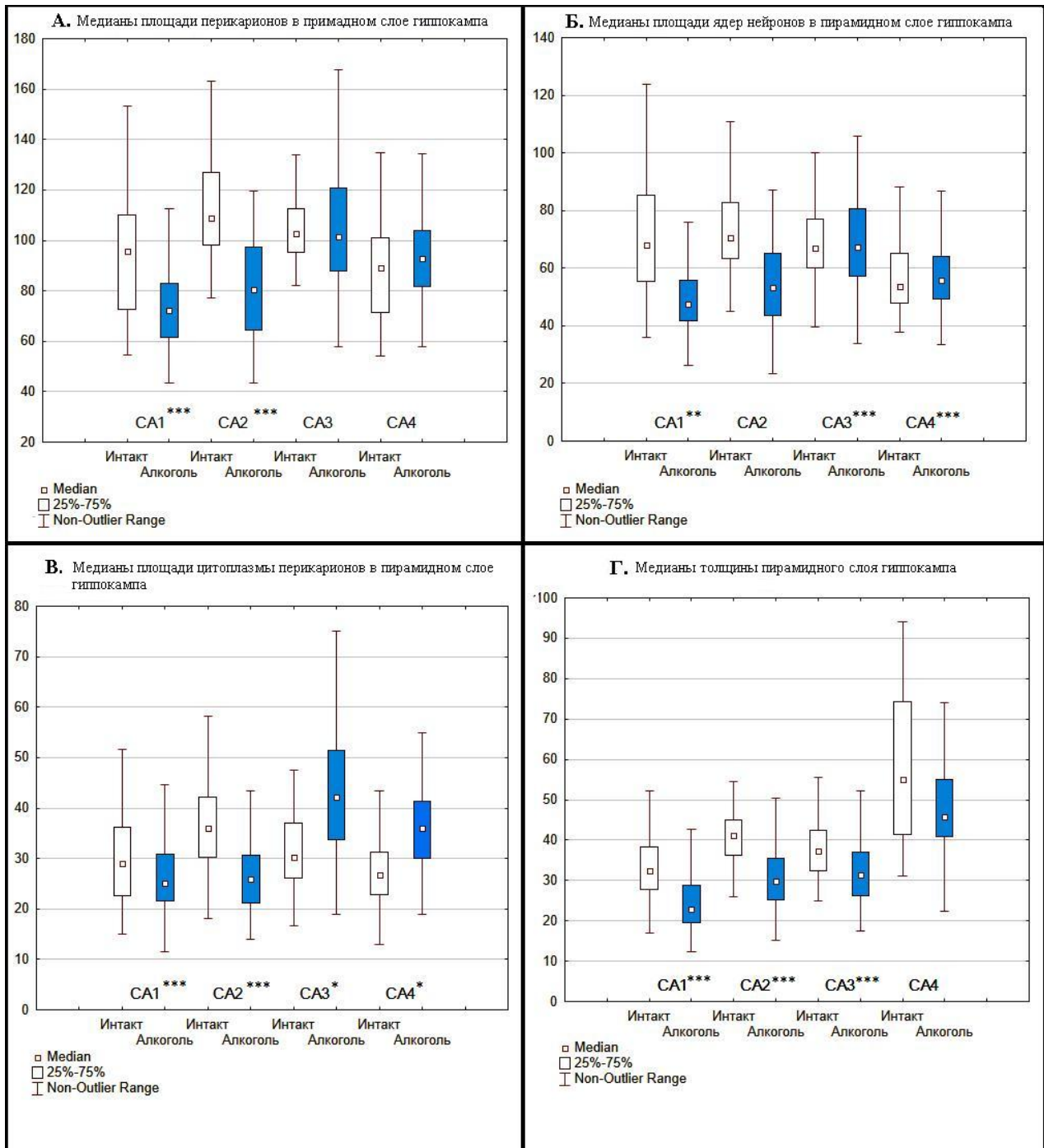


Рис. 2. Диаграмма изменения площади перикарион нейронов, площади ядер нейронов, площади цитоплазмы нейронов и толщины пирамидного слоя гиппокампа

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных при качественном и количественном морфологическом исследовании данных, можно сделать вывод о том, что выявленные изменения в гиппокампе крыс с принудительной алкоголизацией на протяжении 20 недель отражают развитие процессов обратимого и необратимого повреждения нейронов пирамидного слоя гиппокампа, что в целом соответствует существующим представлениям о наиболее выраженном повреждении нейронов в СА1 и СА3 зонах возможно за счет снижения выработки нейропротекторных факторов роста и активации апоптоза [11, 12], а также реализации компенсаторно-приспособительных процессов с преобладанием атрофии во всех зонах гиппокампа, с преобладанием атрофических изменений в зоне СА1 и СА3, характеризующихся очаговым глиозом и выпадением нейронов пирамидного слоя, что соответствует обнаружению схожих нарушений в головном мозге у лиц, страдавших хроническим алкоголизмом [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипов, В. И. Влияние внутригиппокампального введения каиновой кислоты на поведение крыс и функциональное состояние митохондрий в структурах головного мозга / В. И. Архипов, Т. В. Сирота, Д. С. Лебедев // Известия РАН. Сер. биологическая. Физиология животных и человека. – 2007. – № 5. – С. 507–576.
2. Березнева, Е. Ю. Морфологические особенности нейронных популяций медиодорсального ядра таламуса и гиппокампа головного мозга крысы белой / Е. Ю. Березнева, В. В. Александрова // Успехи современного естествознания. Биологические науки. – 2015. – № 9. – С. 288–289.
3. Быхалов, Л. С. Морфологическая характеристика легких у лиц с ВИЧ-инфекцией и туберкулезом на фоне алкогольной зависимости / Л. С. Быхалов, А. В. Смирнов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9, № 5. – С. 68–70.
4. Зиматкин С. М. Окисление этанола в мозге / С. М. Зиматкин // Журнал ГрГМУ. – 2007. – № 3. – С. 20.
5. Зиматкин, С. М. Клеточные и молекулярные механизмы повреждающего действия алкоголя на развитие мозга / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Вуцці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2013. – № 2. – С. 114–115.
6. Нейроиммуноэндокринные эффекты этанола в развитии патологии внутренних органов / С. И. Рапопорт [и др.] // Клиническая медицина. – 2012. – № 3. – С. 11.
7. Память человека и анатомические особенности гиппокампа / А. В. Вартанов [и др.] // Известия вестн. Моск. ун-та. Сер. 14. Психология. Экспериментальные и эмпирические исследования. – 2009. – № 4. – С. 3–16.
8. Разводовский Ю. Е. Алкогольное поражение мозга / Ю. Е. Разводовский // Медицинские новости. – 2006. – Архив. – № 1. – С. 13–17.
9. Шорманов, С. В. Структурные изменения головного мозга человека при хронической алкогольной интоксикации / С. В. Шорманов, Н. С. Шорманова // Судебно-медицинская экспертиза. – 2006. – Т. 49, № 4. – С. 3–5.
10. Haorah, J. Reduction of brain mitochondrial β -oxidation impairs complex I and V in chronic alcohol intake: the underlying mechanism for neurodegeneration / J. Haorah, T. J. Rump, H. Xiong. // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (8). – P. 8–85.
11. Reynolds, A. R. Ethanol Stimulates Endoplasmic Reticulum Inositol Triphosphate and Sigma Receptors to Promote Withdrawal-Associated Loss of Neuron-Specific Nuclear Protein Fox-3. / A. R. Reynolds, M. A. Saunders, M. A. Prendergast // Alcohol Clin Exp Res. – 2016. – Vol. 40 (7). – P. 1454–1461.
12. Suman, S. Increased DNA double-strand break was associated with downregulation of repair and up-regulation of apoptotic factors in rat hippocampus after alcohol exposure / S. Suman, S. Kumar, P. N. Gouemo // Alcohol. – 2016. – Vol. 54. – P. 45–50.