

А. В. Смирнов^{1,3}, **И. Н. Тюренков**², **А. А. Замлелов**¹,
А. В. Замлелова¹, **В. В. Багметова**², **Н. С. Ганзикова**², **И. В. Малюженко**²

Волгоградский государственный медицинский университет,

¹ кафедра патологической анатомии,

² кафедра фармакологии и биофармации ФУВ;

³ Волгоградский медицинский научный центр

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ В ПИРАМИДНОМ СЛОЕ ЗОНЫ СА1 ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ СОЕДИНЕНИЕМ НЕЙРОГЛУТАМ

УДК 616-091.8

Проведен качественный и количественный анализ морфологических изменений в пирамидном слое зоны СА1 гиппокампа крыс при моделировании хронической алкогольной интоксикации и фармакологической коррекции соединением Нейроглютам (гидрохлорид бета-фенилглутаминовой кислоты, РГПУ-135). У крыс, получающих соединение Нейроглютам, было определено менее выраженное развитие атрофических процессов в пирамидном слое зоны СА1 гиппокампа, которые были вызваны принудительной алкоголизацией. Предполагается, что эффективность соединения сопровождается повышенной функциональной активностью нейронов в пирамидном слое зоны СА1 гиппокампа крыс.

Ключевые слова: алкоголь, крыса, гиппокамп, патоморфоз, Нейроглютам.

A. V. Smirnov, I. N. Tyurenkov, A. A. Zamlelov,
A. V. Zamlelova, V. V. Bagmetova, N. S. Ganzikova, I. V. Malyuschenko

MORPHOLOGICAL TRANSFORMATIONS IN THE PYRAMIDAL LAYER OF CA1 HIPPOCAMPUS IN THE MODELING OF CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION AND PHARMACOLOGICAL CORRECTION BY NEUROGLUTAM

A qualitative and quantitative analysis of morphological changes in pyramidal layer of CA1 zone of hippocampus of rats was performed during simulation of chronic alcohol intoxication and pharmacological correction with Neuroglutam (beta-phenylglutamic acid hydrochloride, RGPU-135). In alcoholized rats receiving Neuroglutam development of atrophic processes in pyramidal layer of CA1 hippocampus was less. It is assumed that the effectiveness of Neuroglutam is accompanied by increased functional activity of neurons in pyramidal layer of CA1 hippocampus of rat.

Key words: alcohol, rat, hippocampus, pathomorphosis, Neuroglutam.

В виду широкой связи алкоголь-индуцированного повреждения головного мозга и нейродегенеративных заболеваний актуальность разработок нейропротективных средств остается весомой. Известно, что алкоголизм и депрессивные расстройства состоят в тесной связи [1], депрессия вызывает нарушения состояния здоровья и состояния качества жизни [3], поэтому исследование средств, обладающий психотропным действием, имеет ключевое значение. Среди таких веществ особое внимание привлекает соединение Нейроглютам (гидрохлорид бета-фенилглутаминовой кислоты, РГПУ-135) [2], т. к. данное вещество является производным естественных метаболитов нервной системы и поэтому имеет высокую физиологическую активность с малым побочным эффектом. Ранее в исследованиях были выявлены антидепрессивный и анксиолитический эффекты данного

соединения [4], однако морфологические изменения в ткани головного мозга под действием данного вещества остаются мало освещенными. К анатомическим структурам головного мозга, которые принимают участие в регуляции эмоций и их выраженности, относится гиппокамп. Известно, что повреждение гиппокампа сопровождается как нарушениями настроениями у человека [9], так и эмоциональной дисфункцией у крыс [8].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

С помощью световой микроскопии и методов количественного компьютерного анализа исследовать структурные изменения в нейронах зоны СА1 пирамидного слоя гиппокампа крыс при моделировании хронической алкогольной интоксикации и фармакологической коррекции соединением Нейроглютам.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование производилось на белых лабораторных крысах самцах 6-месячного возраста исходной массой 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 – группа «Алкоголь». Группа контроля получала воду – группа «Контроль». После прекращения 20-недельной алкоголизации в течение 28 дней животным лечебным курсом вводилось изучаемое соединение Нейроглютам – группа «Нейроглютам». Контрольные животные получали дистиллированную воду в эквивалентном объеме. По окончании курса введения изучаемых соединений животные подвергались эвтаназии путем декапитации под наркозом с целью забора головного мозга, фиксировали образцы головного мозга в 10%-м забуференном формалине. По стандартной методике изготавливали парафиновые блоки и срезы толщиной 5–7 мкм, по методу Ниссля толуидиновым синим. Проводили качественный и количественный анализ пирамидного слоя гиппокампа. Исследование микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа «Axio Lab. A1», фотодокументирование осуществляли камерой «AxioCam 105 color», морфологический анализ полученных микрофотографий производили с помощью программы Image-Pro Plus. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакетов программ Excell и Statistica. Данные представляли в виде медианы с указанием интерквартильного интервала. Различия между группами оценивали по критерию Манна – Уитни, Краскела – Уоллиса и считали статистически значимыми при $p < 0,05$. При проведении количественного анализа гистологических препаратов, использовались морфометрические методы, с помощью которых были описаны планиметрические свойства нейронов и их структур. Среди планиметрических свойств нейронов определялись такие показатели нейронов, как: относительная площадь перикарионов нейронов, относительная площадь ядер нейронов, относительная площадь цитоплазмы нейронов, относительная плотность нейропила в пирамидном слое гиппокампа, ядерно-цитоплазматическое отношение нейронов, толщина пирамидного слоя гиппокампа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Качественный морфологический анализ срезов головного мозга животных алкоголизированной группы, в сравнении с материалом интактных животных (рис. 1), продемонстрировал уменьшение размеров перикарионов и ядер нейронов с очаговым гиперхроматозом цитоплазмы перикарионов, ядра нейронов характеризовались умеренно выраженным гиперхроматозом, относительная площадь нейропила в алкоголизированной группе увеличилась, толщина пирамидного слоя уменьшилась (рис. 2). Гистологическое исследование головного мозга крыс, получавших соединение Нейроглютам, показало, что размеры перикарионов и ядер нейронов увеличиваются в сравнении с алкоголизированной и интактной группами, площадь цитоплазмы перикарионов уменьшена, вещество Ниссля часто имеет вид гиперхромного ободка в перинуклеарной области, ядра нейронов – гипохромные, нейроны в пирамидном слое плотно упакованы, отмечено малое содержание глии, толщина пирамидного слоя заметно увеличена (рис. 3).

При морфометрической оценке планиметрических свойств нейронов пирамидного слоя в зоне CA1 выявлено (см. табл.), что относительная площадь перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Нейроглютам» составила $Me\ 117,05\ [99,67;136,72]\ \mu\text{м}^2$, данное значение на 62,27 % больше, чем в группе «Алкоголь» и на 22,41 % больше, чем в группе «Контроль», сравнение всех групп проводили методом Kruskal – Wallis: $p < 0,05$.

Относительная площадь ядер нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Нейроглютам» составила $Me\ 86,41\ [72,90;100,99]\ \mu\text{м}^2$, данное значение на 84,95 % больше, чем в группе «Алкоголь» и на 27,84 % больше, чем в группе «Контроль», сравнение всех групп проводили методом Kruskal – Wallis: $p < 0,05$.

Относительная площадь цитоплазмы нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Нейроглютам» составила $Me\ 24,71\ [17,63;32,41]\ \mu\text{м}^2$, данное значение на 1,19 % меньше, чем в группе «Алкоголь» и на 14,5 % меньше, чем в группе «Контроль», сравнение всех групп проводили методом Kruskal – Wallis: $p < 0,05$.

Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Нейроглютам» составила $Me\ 3,07\ [2,29;4,07]\ \mu\text{м}^2$, данное значение на 71,5 % больше, чем в группе «Алкоголь» и на 25,3 % больше, чем в группе «Контроль», сравнение всех групп проводили методом Kruskal – Wallis: $p < 0,05$.

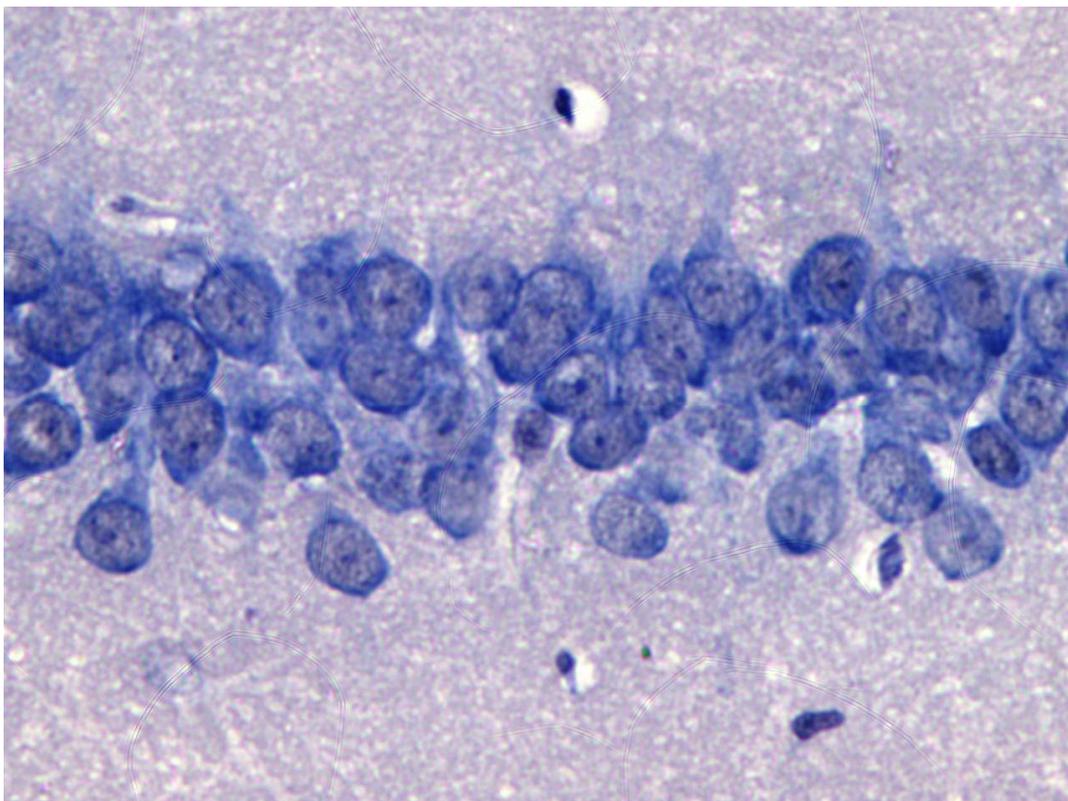


Рис. 1. Гистологическое строение пирамидного слоя зоны СА1 гиппокампа крыс интактной группы. Окраска по методу Ниссля. Ув. х400

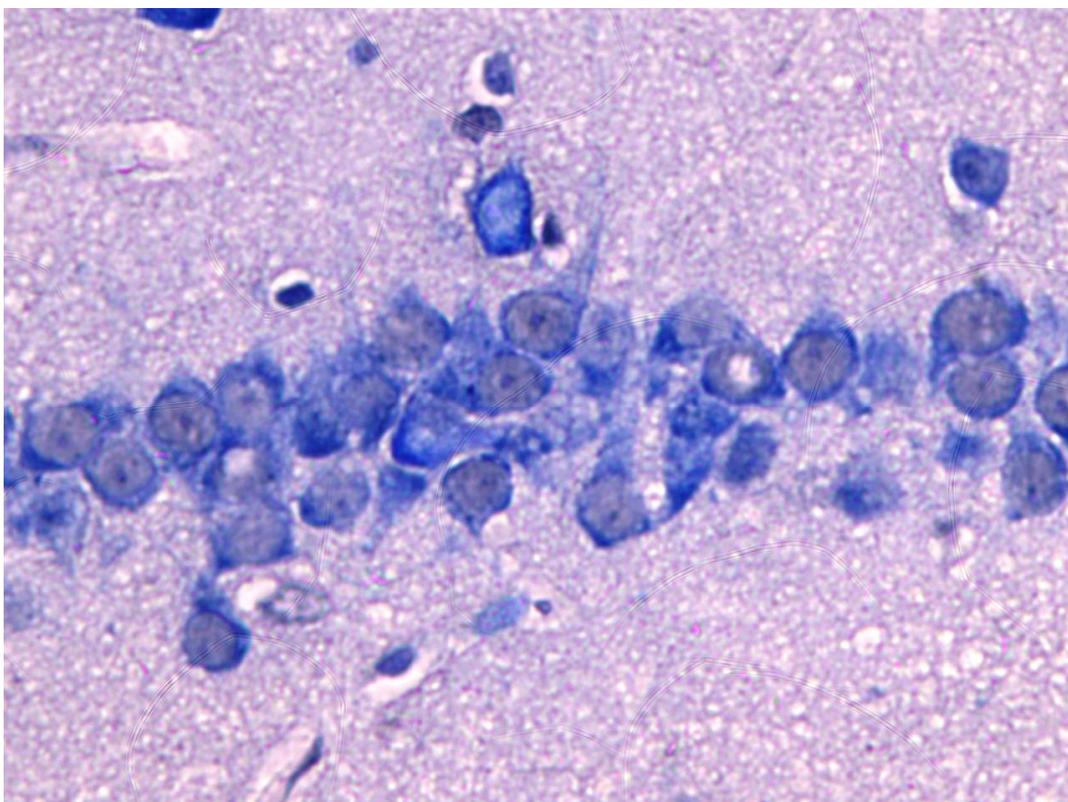


Рис. 2. Гистологическое строение пирамидного слоя зоны СА1 гиппокампа крыс алкоголизированной группы. Определяется снижение толщины пирамидного слоя, перикарионы и ядра нейронов уменьшены в размерах, увеличено содержание глии в межнейронном пространстве, выпадения нейронов из пирамидного слоя. Окраска по методу Ниссля. Ув. х400

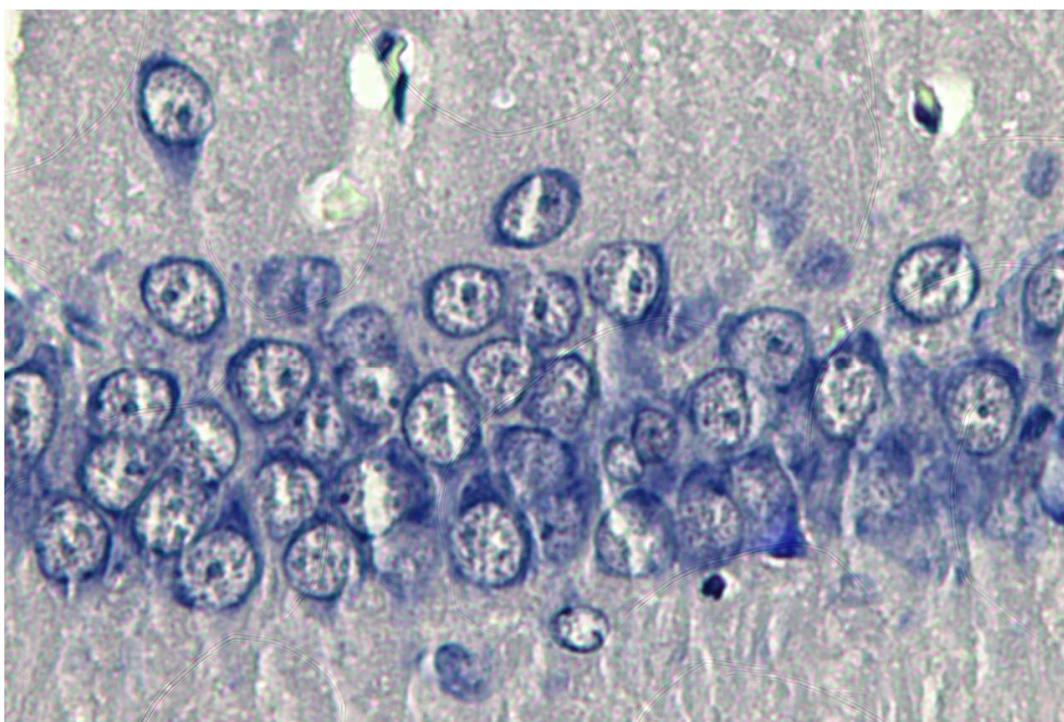


Рис. 3. Гистологическое строение пирамидного слоя зоны CA1 гиппокампа крыс группы, получавших соединение Нейроглутам. Увеличение толщины пирамидного слоя, снижение содержания глии в межнейронном пространстве, ядра нейронов гипохромные, содержание ядра преобладает над цитоплазмой перикарионов. Окраска по методу Ниссля. Ув. х400

Толщина пирамидного слоя гиппокампа в группе «Нейроглутам» составила Ме 36,69 [29,93; 43,74] мкм², данное значение на 60,21 % больше, чем в группе «Алкоголь» и на 13,5 % больше, чем в группе «Контроль», сравнение всех групп проводили методом Kruskal – Wallis: $p < 0,05$.

Относительная плотность нейропиля пирамидного слоя гиппокампа в группе «Нейроглутам» составила Ме 18,84 [12,8; 21,81] мкм², данное значение на 51,55 % меньше, чем в группе «Алкоголь» и на 36,92 % меньше, чем в группе «Контроль», сравнение всех групп проводили методом Kruskal – Wallis: $p < 0,05$.

Измерение морфометрических показателей нейронов гиппокампа в зоне CA1 экспериментальных групп крыс [6]

| Зона гиппокампа | Морфометрические показатели | Итоги измерения и вычисления морфометрических показателей. | | |
|--|---|--|-----------------------------|----------------------------------|
| | | Интактная группа [6] | Алкоголизованная группа [6] | Группа – Лекарство (Нейроглутам) |
| CA1 | Медиана площади перикарионов, мкм ² | Kruskal – Wallis test: $H (2, N = 609) = 235,0733, p < 0,05$ | | |
| | | 95,62 [72,81; 110,19] | 72,13 *** [61,61; 82,86] | 117,05 [99,67; 136,72] |
| | Медиана площади ядер, мкм ² | Kruskal – Wallis test: $H (2, N = 609) = 274,6579, p < 0,05$ | | |
| | | 67,59 [50,43; 79,01] | 46,72 *** [40,44; 55,05] | 86,41 [72,90; 100,99] |
| | Медиана площади цитоплазмы перикарионов, мкм ² | Kruskal – Wallis test: $H (2, N = 708) = 12,60839, p < 0,05$ | | |
| | | 28,91 [22,65; 36,16] | 25,01 ** [21,69; 30,95] | 24,71 [17,63; 32,41] |
| | Медиана ядерно-цитоплазматического отношения нейронов гиппокампа, число | Kruskal – Wallis test: $H (2, N = 643) = 222,8090, p < 0,05$ | | |
| | 2,45 [2,01; 2,87] | 1,79 *** [1,53; 2,09] | 3,07 [2,29; 4,07] | |
| Медиана толщины пирамидного слоя, мкм | Kruskal-Wallis test: $H (2, N = 1185) = 353,6872, p < 0,05$ | | | |
| | 32,3 [27,9; 38,3] | 22,9 *** [19,4; 28,8] | 36,69 [29,93; 43,74] | |
| Медиана относительной плотности нейропиля, % | Kruskal – Wallis test: $H (2, N = 79) = 47,50128, p < 0,05$ | | | |
| | 29,87 [25; 32,62] | 38,89 ** [30,37; 46,8] | 18,84 [12,8; 21,81] | |

* Различия между группами (интакт – алкоголь) статистически значимы (критерий Манна – Уитни).

На основании полученных данных качественного и количественного анализа животных крупы «Контроль» и «Алкоголь» можно сделать вывод о том, что используемая в нашем исследовании модель алкоголизации приводит к выраженным гистологическим изменениям в пирамидном слое зоны СА1 гиппокампа крыс, которые включают развитие атрофических процессов.

Преобразования в нейронах гиппокампа животных группы «Нейроглутам», которые были описаны ранее (увеличение размеров перикарионов нейронов, гипохромность ядер нейронов, увели-

чение ядерно-цитоплазматического отношения), могут объясняться изменением структурно-функционального состояния нейронов, которые по некоторым литературным источникам, определяются в усилении синтетических процессов в нейронах, что может сопровождаться повышенной функциональной активностью данных клеток [5, 7], об этом активно свидетельствуют данные морфометрии, прослеживается четкое достоверное увеличение размеров перикарионов нейронов (рис. 4) и повышение ядерно-цитоплазматического отношения нейронов (рис. 5).



Рис. 4. Графики, отображающие динамику изменений медианы площади перикарионов нейронов гиппокампа в зоне СА1 групп «Контроль», «Алкоголь» и «Нейроглутам». Демонстрируется выраженные обратные изменения морфометрических параметров, полученных от группы животных, получавших исследуемое соединение Нейроглутам



Рис. 5. Графики, отображающие динамику изменений ядерно-цитоплазматического отношения нейронов гиппокампа в зоне СА1 групп «Контроль», «Алкоголь» и «Нейроглутам». Демонстрируются выраженные обратные изменения морфометрических параметров, полученных от группы животных, получавших исследуемое соединение Нейроглутам

С учетом наличия данных о том, что функциональные изменения у крыс под воздействием соединения Нейроглютам имеют место быть [4], то можно сделать вывод – антидепрессивный и анксиолитический эффекты данного соединения сопровождаются структурно-функциональными преобразованиями нейронов в зоне СА1 гиппокампа крыс, которые, вероятно, обуславливают повышенное функциональное состояние нейронов гиппокампа, в том числе активации синтетического аппарата клеток [5, 7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных данных качественного и количественного анализа пирамидного слоя зоны СА1 гиппокампа у крыс контрольной, алкоголизированной групп и группы животных, получавших в качестве коррекции последствий хронической алкоголизации соединение Нейроглютам, можно сделать следующие выводы.

Хроническая алкогольная интоксикация вызывает процессы атрофии в пирамидном слое зоны СА1 гиппокампа крыс.

Коррекция соединением Нейроглютам (гидрохлорид бета-фенилглутаминовой кислоты, РГПУ-135) способствует выраженным обратным изменениям в пирамидном слое зоны СА1 гиппокампа у крыс, подверженных длительной хронической алкогольной интоксикации.

Соединение Нейроглютам оказывает нейро-протекторное влияние на структурно-функциональные преобразования структур пирамидного слоя зоны СА1 гиппокампа крыс после длительной хронической алкогольной интоксикации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Андрющенко, А. В.* Алкогольная зависимость и депрессия: подходы к диагностике и лечению // А. В. Андрющенко, Ю. А. Шуляк // Медицинский совет. – 2016. – № 19. – С. 28–36.
2. Влияние гидрохлорида бета-фенилглутаминовой кислоты (ргпу-135, нейроглутама) на иммунную систему и психоэмоциональное состояние животных / И. Н. Тюренков [и др.] // Иммунология. – 2014. – Т. 35, № 5. – С. 268–272.
3. Депрессия и алкоголизм клинко-социальные взаимоотношения / Е. А. Щербак [и др.]. – М.: РИТМ, 2018. – С. 10–18.
4. Изучение гамк-ергических механизмов нейропсихотропного действия нейроглутама / И. Н. Тюренков [и др.] // Нейрохимия. – 2015. – Т. 32, № 2. – С. 140–152.
5. *Калимуллина, Л. Б.* К вопросу о «темных» и «светлых» клетках / Л. Б. Калимуллина // Морфология. – 2002. – Т. 122, № 4. – С. 75–79.
6. Морфологические изменения в гиппокампе крыс при моделировании хронического алкоголизма / А. В. Смирнов [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2018. – № 2. – С. 10–14.
7. Структурно-метаболические изменения в нейронах гиппокампа и неокортекса мозга крыс под влиянием препарата "Полидан" / О. В. Курская [и др.] // Морфология. – 2007. – Т. 131, № 2. – С. 37–42.
8. *Ashok K. Shetty.* Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: Can early neural stem cell grafting intervention provide protection? / K. Ashok // Shetty – Epilepsy & Behavior. – 2014. – Vol. 38. – P. 117–124. – <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.12.001> дата обращения 06.12.19 г.
9. Hippocampal Volume and Mood Disorders After Traumatic Brain Injury / E. Ricardo [et al.] // Biological Psychiatry. – 2007. – Vol. 62, 1.4. – P. 332–338. – <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.07.024> дата обращения 06.12.19 г.