

© Коллектив авторов, 2012
УДК 611.813.018:613.81:599.323.4

*И. К. Сванидзе, Д. П. Мусеридзе, Е. В. Дидимова, Т. В. Саникидзе, Л. Г. Гегенава
и Н. Н. Гвинадзе*

НАРУШЕНИЕ НЕЙРОГЕНЕЗА КОРКОВЫХ И ПОДКОРКОВЫХ СТРУКТУР ЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ПЛОДНОГО АЛКОГОЛЬНОГО СИНДРОМА

Отдел нейроанатомии (руков. — д-р биол. наук И. Л. Лазришвили), Центр по изучению наук о жизни, г. Тбилиси, Грузия,
e-mail: igor-svanidze@mail.ru

Изучен нейрогенез корковых и подкорковых структур лимбической системы головного мозга у потомства крыс, употреблявших во время беременности этанол. Использованы методы: исследование гистологических срезов, окрашенных крезиловым фиолетовым, культивирование *in vitro* и электронный парамагнитный резонанс. Показано, что пренатальная интоксикация алкоголем вызывает нарушение пролиферативной активности клеток зернистого слоя зубчатой извилины гиппокампа, миграцию нейро- и глиобластов, усиление выработки свободного NO, липопероксидов и гибель клеток, что ведет к изменению численного состава нейронов в корковых и подкорковых структурах и формированию плодного алкогольного синдрома.

Ключевые слова: *нейрогенез, алкогольная интоксикация, плодный алкогольный синдром*

Пренатальное воздействие алкоголя приводит к нарушению развития различных структур ЦНС и формированию плодного алкогольного синдрома (ПАС). Наблюдается торможение пролиферативной активности клеток-предшественников, миграции нейробластов, развития отростков и синаптогенеза [11, 14]. Интоксикация оказывает влияние на синтез белка, ингибирует репликацию ДНК, участие циклинов и митогенных факторов тормозит развитие клеточного цикла [8], ведет к развитию оксидативного стресса и увеличению количества свободных радикалов, повреждению клеточных мембран и гибели нейронов путем апоптоза или некроза [9, 10].

Особое значение приобретает изучение нарушения нейрогенеза корковых и подкорковых областей лимбической системы головного мозга при пренатальной этаноловой интоксикации, поскольку благодаря своей multifunctionality система осуществляет реализацию мотивационно-эмоциональных реакций, участвует в организации процессов обучения и памяти и регуляции цикла бодрствование — сон.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния потребления этанола беременными крысами на нейрогенез корковых и подкорковых структур лимбической системы и формирование ПАС у их потомства.

Материал и методы. Исследование проведено на белых беспородных крысах, которые были разделены на 2 группы (по 20 животных в каждой). Животные 1-й (контрольной) группы получали 20% раствор сахарозы, 2-й — 15% раствор этанола в течение беременности. Новорожденных животных на 3-, 7-, 15-, 21-, 30-е сутки пост-

натального развития декапитировали под эфирного наркозом, согласно правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Их головной мозг фиксировали в жидкости Карнуа, после стандартной проводки заливали в парафин, делали серийные срезы толщиной 10 мкм и окрашивали крезиловым фиолетовым. С помощью окулярной сетки, равной 0,025 мм², при об. 40, ок. 10, в каждом 3-м срезе определяли число пирамидных нейронов в энторинальной коре, поясной извилине, аммоновом роге, мультиполярных и веретенообразных нейронов в супраоптическом, паравентрикулярном, вентромедиальном ядрах гипоталамуса, срединном ядре мамиллярного тела, латеральном и медиальном ядрах прозрачной перегородки, нейронов в зернистом слое зубчатой извилины гиппокампа. Для определения локализации структур лимбической системы использовали атлас стереотаксических координат мозга крысы [12].

Пролиферативную активность нейронов зернистого слоя зубчатой извилины в промилях при об. 40, ок. 10, определяли у животных на 3-, 7-, 15-е сутки. Число митотически делящихся клеток подсчитывали отдельно в дорсальной и вентральной частях зубчатой извилины, но так как различия были не значимы, то в дальнейшем представлено их суммарное количество. При определении числа нейронов и пролиферативной активности на каждый срок использовали по 4 животных.

Для выявления влияния этанола на миграционную способность нейронов и клеток глии, а также рост аксонов и спрутинг культивировали кусочки коры 1–3-суточных животных в камерах Максимова на коллагене в питательной среде, состоящей из модифицированной среды Игла (DMEM, Sigma, США), бычьей сыворотки F-1051 (Sigma, США). Культуры исследовали каждые 24, 48 ч, 3 и 7 сут в фазовом и интерференционном контрасте по Номарскому. Выполнены по 2 серии посевов — интактные культуры и культуры, питательная среда которых содержала этанол в концентрации 100 ммоль. Было исследовано по 100 культур каждого срока.

С целью выявления оксидативного стресса и образования свободных радикалов использовали метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Исследовали интенсивность сигналов (в относительных единицах) спин-меченых липопероксирадикалов ($\text{LOO}\cdot$) и свободного оксида азота (NO). Для определения содержания липопероксирадикалов ($\text{LOO}\cdot$) использовали спин-ловушку PBN (α -phenyl-tertbutylnotrone) (Sigma, США), с целью регистрации ЭПР-сигналов свободного NO использовали спин-метку DETC (sodium diethylthiocarbonate) (Sigma, США). Спектры ЭПР в коре, гиппокампе и печени 30-суточного потомства контрольной и экспериментальной групп белых крыс регистрировали на радиоспектрометре РЭ-1307 (Россия) (СВЧ 9,77 ГГц, частота модуляции 50 кГц). ЭПР-спектры регистрировали в условиях микроволновой мощности 20 мВт при температуре жидкого азота (-196°C). При статистической обработке результатов для оценки значимости цифровых данных использовали t -критерий Стьюдента.

Результаты исследования. В зубчатой извилине у крыс на ранних этапах постнатального развития сохраняется способность нейробластов к пролиферации и формированию субгранулярного слоя (рис. 1). Субгранулярный слой содержит большое количество делящихся нейробластов и незначительное число делящихся глиобластов. Изучение пролиферативной активности нейронов зернистого слоя зубчатой извилины показало, что потребление этанола крысами в течение беременности оказывает ингибирующее влияние на размножение клеток у их потомства. Снижение пролиферативной активности наблюдалось на 3-, 7-е и 15-е сутки постнатального развития (табл. 1).

Таблица 1

Митотический индекс зернистых нейронов зубчатой извилины гиппокампа в условиях пренатальной алкогольной интоксикации ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Возраст крыс (сутки)	Контрольная группа (сахароза)	Подопытная группа
3-и	6,1 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,3*
7-е	6,2 $\pm$ 0,7	4,3 $\pm$ 0,4*
15-е	1,5 $\pm$ 0,3	1,20 $\pm$ 0,10**

Различия по сравнению с контролем значимы: * при $P < 0,001$; ** при $P < 0,005$.

Пролиферирующие нейроны зернистого слоя относятся к уже мигрировавшим нейробластам. Их количество, как и количество нейронов в лимбической коре и подкорковых ядрах, зависит от воздействия пренатальной алкогольной интоксикации на процессы миграции нейробластов.

Прижизненное изучение миграции нейробластов и клеток глии в условиях культивирования показало, что в контрольных сериях культур лимбической коры через 24 ч зону роста образуют мигрирующие из эксплантатов фибробласты, а после их распада из эксплантата мигрируют клет-

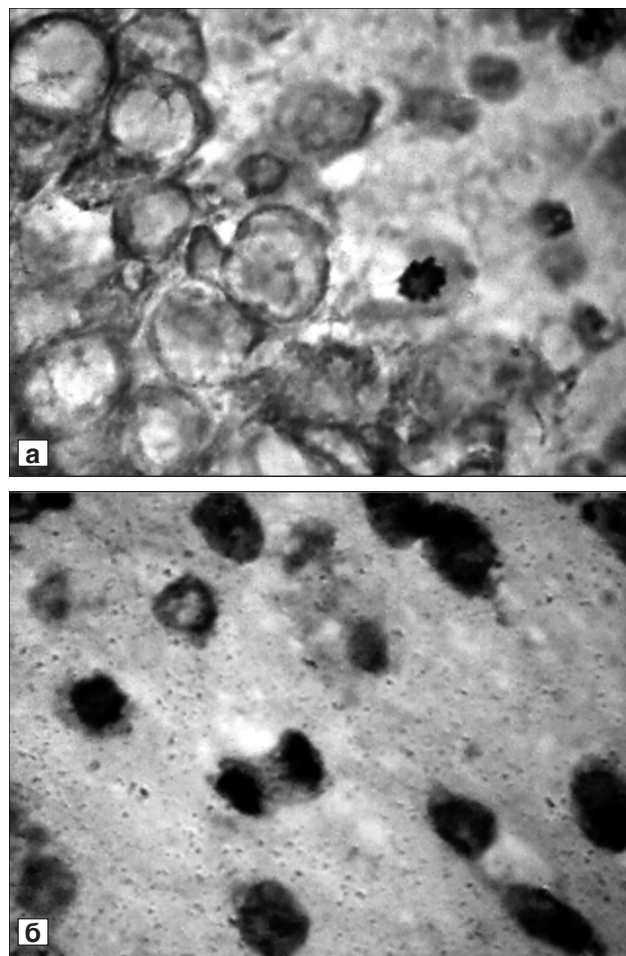


Рис. 1. Нейроны зернистого слоя зубчатой извилины гиппокампа.

а — метафаза; б — анафаза. Окраска крезиловым фиолетовым. Об. 100, ок. 10.

ки нейроглии. К 48 ч вокруг эксплантатов образуется зона роста, в которую врастают аксоны нейробластов. К 3-м суткам культивирования зона роста представлена нейропилем, включающим тела глиоцитов и отростки нейронов. Рост аксонов сопровождается спраутингом. После посева в питательную среду, которая содержала этанол, миграция глио- и нейробластов слабо выражена, и периметр эксплантата состоит из малого числа глиальных клеток (рис. 2).

Торможение миграции нейро- и глиобластов в условиях алкогольной интоксикации является одним из факторов, оказывающим влияние на количество нейронов в структурах лимбической системы. Определение количества пирамидных нейронов в энторинальной коре, поясной извилине и аммоновом роге, а также мультиполярных и веретенообразных клеток в подкорковых ядрах контрольной группы животных обнаружало закономерное снижение числа нейронов на всех изученных стадиях развития. Уменьшение

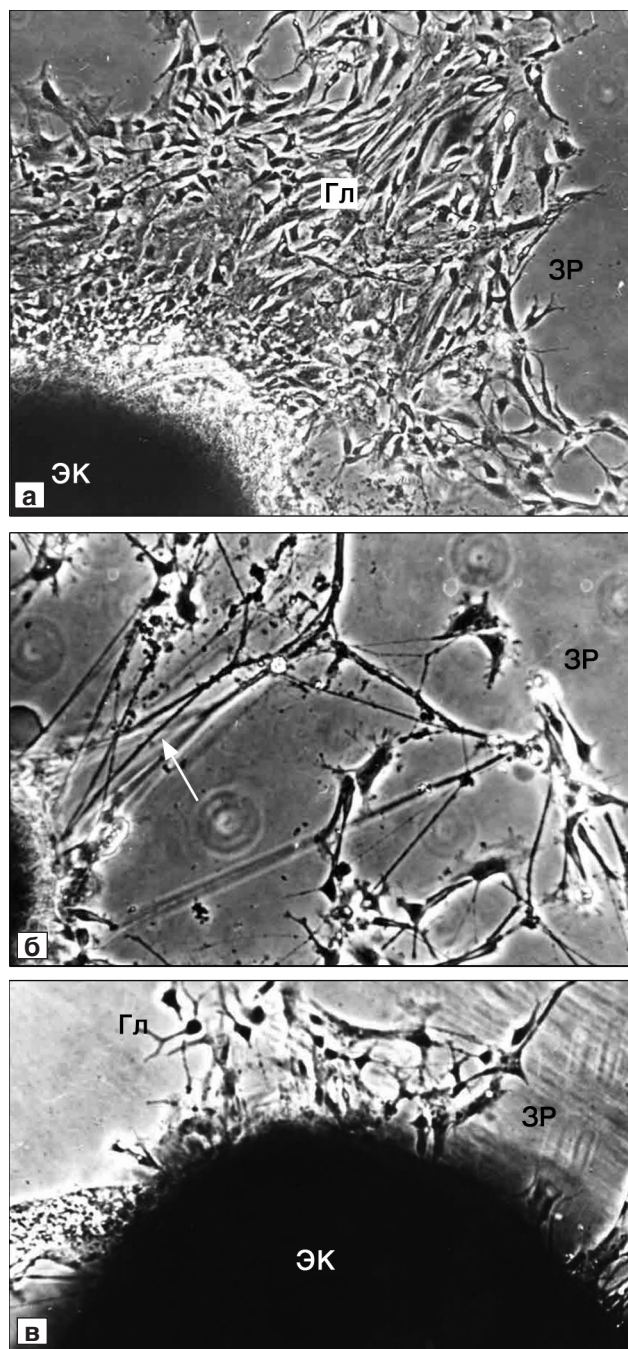


Рис. 2. Эксплантаты коры (ЭК) головного мозга новорожденных крыс, 3 сут культивирования.

а — активно мигрирующие глиоциты в зоне роста (ЗР) эксплантата в стандартной среде; б — выселившиеся глиоциты и растущие аксоны в стандартной среде; в — зона роста эксплантата, культивируемого в питательной среде, содержащей этанол. Гл — глия. Черная стрелка — аксон; белая стрелка — коллатераль. Фазовый контраст. а — об. 20, ок. 7; б — об. 40, ок. 7; в — об. 25, ок. 7.

плотности расположения нейронов у животных контрольной группы связано с продолжающимся нейрогенезом лимбической системы, стратификацией коры, ростом дендритов и аксонов, увеличением числа глиоцитов и их отростков. Развитие афферентных и эфферентных путей и нейропиля

ведет к более разреженному распределению нейронов. Аналогичное явление наблюдалось у крысят, родившихся от самок, получавших этанол в течение беременности. Однако число нейронов в лимбической системе было меньше. Снижение числа пирамидных нейронов было обнаружено в энторинальной коре, поясной извилине, аммоновом роге и зубчатой извилине гиппокампа в вентролатеральном, супраоптическом и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса, в латеральном и медиальном ядрах прозрачной перегородки, в срединном ядре сосцевидного тела (табл. 2)

Определение интенсивности сигнала свободного NO и липопероксидов (LOO•) показало, что пренатальная интоксикация этанолом вызывает формирование липопероксидов в тканях печени, коре и гиппокампе (табл. 3).

Обсуждение полученных данных. Полученные данные свидетельствуют, что пренатальная интоксикация и формирование ПЛС вызывают нарушение основных процессов, принимающих участие в нейрогенезе, ведущее к изменению численного состава нейронов в корковых и подкорковых структурах лимбической системы.

Ранее было показано, что интоксикация алкоголем оказывает влияние на пролиферативную активность стволовых клеток боковых желудочков головного мозга эмбрионов [4], что проявлялось падением общего числа мигрирующих нейро- и глиобластов. Торможение пролиферативной активности стволовых клеток может быть одной из причин снижения общего числа нейронов, принимающих участие в организации корковых и подкорковых структур ЦНС, в том числе и лимбической системы. В двигательной системе при пре- и постнатальной интоксикации этанолом и ксенобиотиком толуолом уменьшение числа пирамидных и мультиполярных нейронов было обнаружено в соматосенсорной коре, подкорковых ядрах, мотонейронов — в спинном мозгу, а также нейронов в зернистом слое зубчатой извилины гиппокампа [2, 5]. Снижение пролиферативной активности стволовых клеток, а также нервных клеток в зернистом слое зубчатой извилины, торможение миграции, некроз и апоптоз нейронов отражаются на общей численности нейронов в корковых и подкорковых структурах лимбической системы. Гибели нейронов предшествуют дистрофические процессы. При интоксикации этанолом и ксенобиотиком толуолом в корковых и подкорковых структурах лимбической и двигательной систем уменьшению числа нейронов сопутствует атрофия нервных клеток. Определение соотношения площади и сухой массы тела клеток выявило одновременное снижение этих величин [5, 13]. В

Таблица 2
Количество нейронов в корковых и подкорковых структурах лимбической системы крыс в контроле и после пренатальной алкогольной интоксикации ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Исследованные структуры	Возраст животных (сут)							
	3		7		15		21	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Энторинальная кора	28,3±0,9	29,8±0,5	22,9±0,6	21,3±0,7	18,9±0,5	17,8±0,5	18,3±0,4	17,6±0,5*
Поясная извилина	35,4±1,2	29,5±0,9**	34,2±0,6	28,9±0,8**	35,2±1,2	27,2±0,8**	29,2±0,7	21,5±0,6**
Аммонов рог	424±4	327,3±3***	378,2±2,3	320,4±2,1***	308,0±2,5	209,7±2,4***	321±9	271,1±2,1***
Зубчатая извилина гиппокампа	80,3±2,1	62,4±1,3***	75±4	63,4±1,1***	85,0±1,9	60,4±2,3***	120,5±1,7	70,5±1,2***
Ядра гипоталамуса:								
супраоптическое	149,9±3,3	116,6±1,4**	132,4±1,9	122,8±1,8**	120±3	109±4*	114,6±2,2	114,8±1,4
паравентрикулярное	289,8±1,4	240±3**	260,4±2,1	236±4**	221,7±2,1	209,5±2,1**	199,9±2,2	186,1±2,5**
вентромедиальное	237,7±1,1	225,1±2,1**	229,9±2,2	214,3±1,6**	211±3	180,0±1,4**	200,0±1,2	177,1±2,9**

Различия по сравнению с контролем значимы: * при $P<0,05$; ** при $P<0,01$; *** при $P<0,001$.

Таблица 3

Интенсивность электронного парамагнитно-резонансного сигнала свободного NO и липопероксидов у крыс на 30-е сутки постнатального развития после пренатальной алкогольной интоксикации (усл. ед.)

Группа животных	Объект исследования	LOO•	NO
Контрольная	Печень	0	1,0
	Кора большого мозга	0	0,9
	Гиппокамп	0	0,2
Подопытная	Печень	1,2	1,5
	Кора большого мозга	1,5	1,2
	Гиппокамп	0,8	0,2

основе деструктивного влияния этанола на главные этапы нейрогенеза лежит процесс формирования свободных радикалов, влияющих на клеточный метаболизм [6]. В регуляции процессов пролиферации, миграции, дифференцировки и гибели клеток важная роль принадлежит внутриклеточному и межклеточному ретроградному мессенджеру NO, который регулирует активность ферментов и принимает участие в модуляции клеточного метаболизма.

Лимбическая система обладает обширной и сложно организованной афферентной и эфферентной сетью. Нарушение численного состава нейронов различных типов в лимбической коре, поясной извилине, гиппокампе и подкорковых ядрах ведет к уменьшению числа аксонов, принимающих участие в образовании афферентных, эфферентных и ассоциативных путей, и ослаблению нейронной активности. Последнее вызывает нарушение интегрирующей роли лимбической системы и изменение поведенческой активности животных. Алкогольная интоксикация самок в период беременности и лактации вызывает у потомства снижение способности пространственно-информационного обучения и консолидации следов памяти [3], а также регуляции цикла бодрствование — сон [7]. В то же время, следует принять во внимание, что беременные самки, получавшие алкоголь, могут отличаться генетически опосредованной различной активностью ферментных систем, метаболизма спиртов и альдегидов и иметь большее или меньшее предрасположение к потреблению алкоголя [1], что соответственно отражается на степени интоксикации потомства.

Работа выполнена при поддержке Национального научного фонда им. Ш. Руставели (грант 1–2.52).

ЛИТЕРАТУРА

- Бардина Л. Р., Сатановская В. И., Пронько П. С. и Кузьмин А. Б. Метаболическая адаптация к алкоголю крыс,

- различающихся по предпочтению этанола воде. Украинск. биохим. журн., 1997, т. 1, с. 94–99.
2. Мусеридзе Д. П., Дидимова Е. В., Брегвадзе И. А. и др. Влияние толуола на постнатальное развитие структур двигательной системы белых крыс. Изв. АН Грузии, серия биол., 2004, т. 30, № 4, с. 541–546.
 3. Мусеридзе Д. П., Цаишвили Ц. С., Сванидзе И. К. и Ханаева З. С. Нарушение памяти и процесса обучения у потомков алкоголизированных самок крыс и возможность коррекции этих изменений. Нейрофизиология, 2008, т. 40, № 2, с. 130–136.
 4. Сванидзе И. К., Дидимова Е. В. и Цаишвили Ц. С. Пролиферативная активность матричных клеток боковых желудочков и гранулярных клеток зубчатой извилины гиппокампа крыс в условиях пре- и постнатальной алкогольной интоксикации. Изв. РАН, серия биол., 2001, № 1, с. 117–120.
 5. Сванидзе И. К., Мусеридзе Д. П., Дидимова Е. В. и др. Коррекция изменений, вызванных толуолом в корковых и подкорковых структурах головного мозга белых крыс. Изв. РАН, серия биол., 2007, № 3, с. 325–328.
 6. Cheah J. H., Kim S. F., Hester L. D., Clancy K. W. et al. NMDA Receptor-Nitric Oxide Transmission Mediates Neuronal Iron Homeostasis via the GTPase Dexas1. *Neuron*, 2006, v. 51, № 4, p. 431–440.
 7. Gogichadze M., Oniani T. N., Omiadze N. et al. Influence of acute administration of high doses of ethanol on some features of the sleep-wakefulness cycle in rats. *Proc. Georgian Acad. Sci. Ser. A*, 2004, v. 30, № 3, p. 329–335.
 8. Gohlke J. M., Griffith W. C., Bartell S. M. et al. A computational model for neocortical neurogenesis predicts ethanol-induced neocortical neuron number deficits. *Dev. Neurosci.*, 2002, v. 24, № 6, p. 467–477.
 9. Heck N., Golbs A., Riedemann T. et al. Activity dependent regulation of neuronal apoptosis in neonatal mouse cerebral cortex. *Cereb. Cortex*, 2008, v. 18, № 6, p. 1335–1349.
 10. Ikonomidou Ch., Bittigau P., Ishimaru M. J. et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 2000, v. 287, № 11, p. 1056–1060.
 11. Kumada T., Jiang Y., Cameron D. B. and Komuro H. How does alcohol impair neuronal migration? *J. Neurosci. Res.*, 2007, v. 15, № 3, p. 465–470.
 12. Paxinos G. and Watson Ch. *The Rat Brain, in Stereotaxis Coordinates*. Sydney et al. Acad. Press, 1982.
 13. Svanidze I. K., Didimova E. V. and Gvinadze N. N. Dry Weight and size dynamics of the neurons in the brain subcortical structures of the limbic system in the offspring of the alcoholized albino rats. *Georgian J. Neurosci.*, 2002, № 1–2, p. 35–42.
 14. Yanni P. A. and Lindsley T. A. Ethanol inhibit development of dendrites and synapses in rat hippocampal pyramidal neuron cultures. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 2000, т. 14, № 2, p. 232–243.

Поступила в редакцию 23.06.2011
Получена после доработки 06.12.2011

DISORDERS OF NEUROGENESIS OF CORTICAL AND SUBCORTICAL STRUCTURES IN RAT BRAIN LIMBIC SYSTEM DURING FETAL ALCOHOL SYNDROME FORMATION

I. K. Svanidze, D. P. Museridze, Ye. V. Didimova, T. V. Sanikidze, L. G. Gegenava and N. N. Gvinadze

Disorders of neurogenesis of cortical and subcortical structures in rat brain limbic system were studied in the offspring of rats that received ethanol during pregnancy. The methods used included the staining of histological sections with cresyl violet, in vitro culture, and electron paramagnetic resonance. Prenatal alcohol intoxication was shown to induce the disturbances in proliferative activity of granular layer cells in the hippocampal dentate gyrus, neuron- and glioblast migration, enhancement of free NO and lipoperoxide production and cell death. This resulted in the changes in the number of neurons in cortical and subcortical structures of rat brain limbic system and in fetal alcohol syndrome formation.

Key words: *neurogenesis, alcohol intoxication, fetal alcohol syndrome*

Department of Neuroanatomy, Center of Life Sciences, Tbilisi, Georgia