

© Д.П. Мусеридзе, Л.Г. Гегенава, 2009
УДК 611.81.018:612.65:599.323.4

Д.П. Мусеридзе и Л.Г. Гегенава

ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА ПЛОТНОСТЬ РАСПОЛОЖЕНИЯ НЕЙРОНОВ В ЛИМБИЧЕСКОЙ КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА И КОРРЕКЦИЯ ВЫЗВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ АНТИОКСИДАНТОМ ДОЛИВИНОМ

Отдел нейроанатомии (руков. — проф. И.К. Сванидзе) Института физиологии им. И. Бериташвили, г. Тбилиси, Грузия;
e-mail: dianamuseridze@yahoo.com, lali_gegenava@mail.ru

Целью данной работы являлось определение плотности расположения нейронов лимбической коры у потомства самок белых крыс, получавших 15% раствор этанола в период беременности и лактации, и выявление возможности коррекции этанолом вызванных нарушений на ранних этапах постнатального развития (ПР), с помощью антиоксиданта доливина. Число нейронов определяли в поясной извилине и энторинальной коре на 3-, 7-, 15-, 21-е и 30-е сутки ПР (по 3 животных в каждой возрастной группе). С целью предупреждения изменений, вызванных этанолом, в пищу самок добавляли доливин (0,7 мг). Было выявлено, что в лимбической коре цитотоксическое воздействие этанола вызывает уменьшение общего числа клеток на ранних этапах ПР, особенно на 7-е сутки. Наиболее чувствительными к воздействию этанола оказались нейроны глубокого отдела лимбической коры. Применение доливина выявило его превентивное влияние, ослабляющее цитотоксический эффект этанола на всех этапах развития.

Ключевые слова: *лимбическая кора, этанол, антиоксидант.*

Потребление этанола в период беременности вызывает серьезные нарушения в развитии плода, вследствие чего формируется плодный алкогольный синдром (FAS — Fetal Alcohol Syndrome), в дальнейшем обуславливающий дисфункцию ЦНС и развитие неврологических заболеваний. В процессе формирования ЦНС нарушение образования нейронов у потомства алкоголизированных родителей в дальнейшем вызывает торможение миграции нейробластов из пролиферативных зон боковых желудочков к корковым и подкорковым структурам головного мозга, замедление интенсивности роста аксонов и спраутинга, и в конечном итоге аномальное развитие коры [8, 12]. Снижение интенсивности роста аксонов и спраутинга было выявлено после воздействия этанолом в культурах спинного мозга [2]. В условиях алкогольной интоксикации оксидативный стресс ведет к формированию свободных радикалов, и в результате их воздействия гибель нейронов нарушает количественный баланс клеток в головном мозгу. ЦНС наиболее чувствительна к оксидативному повреждению, так как мембраны нервных клеток богаты полиненасыщенными жирными кислотами и характеризуются сравнительно низкой активностью антиоксидантных систем [5].

Особое значение приобретает возможность коррекции вызванных этанолом нарушений на основных этапах нейrogenеза. С этой целью часто используют антиоксиданты, которые способствуют ослаблению нарушения процессов пролиферации и миграции нервных клеток вследствие алкогольной

интоксикации, а также стимулируют активность эндогенной антиоксидантной ферментной системы [3, 10, 13]. В условиях *in vitro*, после воздействия алкоголя, также было выявлено нейропротективное влияние антиоксидантов [2, 5].

Поскольку влияние этанола в основном проявляется изменением числа клеток, целью данной работы являлось определение плотности расположения нейронов на ранних этапах постнатального развития лимбической коры потомства алкоголизированных самок белых крыс, когда происходит окончательное формирование корковых структур, и выявление возможности коррекции наблюдаемых нарушений с помощью антиоксиданта доливина.

Материал и методы. Опыты проведены на трех группах беспородных белых крыс. 1-я группа (контрольная) — потомство интактных самок (15 животных), 2-я группа — потомство самок, которые в период беременности и лактации вместо воды получали 15% раствор этанола (15 животных) и 3-я группа — потомство алкоголизированных самок, которые вместе с пищей получали доливин (Мирра-Люкс, Россия) — 0,7 мг утром, натошак (15 животных). Использование доливина обусловлено наличием в его составе гипоксена, вещества с высокими антиоксидантными свойствами. По фармакодинамике гипоксен приближается к цитохрому С и убихинону, однако из-за малой молекулярной массы его эффективность в 10 раз выше. Присутствие тиосульфатной группы в составе гипоксена обуславливает его антирадикальные и нейропротективные свойства [4]. Кроме гипоксена, доливин содержит автолизат дрожжей, а также аминокислоты, макро- и микроэлементы, полисахариды, витамины групп В, РР и Н, а также витамин Е.

Количество нейронов в лимбической коре потомства алкоголизованных самок крыс до и после коррекции доливов

Объект исследования	Возраст, сут	Число нейронов								
		общее			в верхнем отделе			в глубоком отделе		
		1-я группа	2-я группа	3-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Поясная извилина	3	98,1±0,9	59,4±0,9*	61,5±1,1	38,3±0,7	35,0±0,6*	31,5±1,0*	59,8±0,9	24,4±0,6*	30,0±0,6*
	7	82,7±0,4	41,3±0,9*	45,3±0,9*	37,9±0,5	25,6±0,7*	26,7±0,5	44,8±0,7	15,7±0,5*	18,6±0,6*
	15	71,6±0,6	44,1±0,6*	45,1±0,8**	38,0±0,5	26,7±0,4*	25,4±0,5	33,6±0,6	17,4±0,5*	19,7±0,5*
	21	51,7±0,9	38,7±0,7*	44,2±0,5*	29,8±0,6	23,8±0,6*	24,2±0,4	21,9±0,6	14,9±0,6*	20,0±0,3*
	30	44,3±0,6	31,9±0,7*	39,3±0,7*	30,5±0,5	19,8±0,6*	24,2±0,5*	13,8±0,4	12,1±0,3*	15,1±0,4*
Энторинальная кора	3	47,2±0,7	27,8±0,5*	28,3±0,4	21,2±0,3	17,8±0,3*	16,3±0,3*	26,0±0,5	10,0±0,3*	12,0±0,4*
	7	53,0±1,0	42,0±0,6*	35,8±0,5*	32,7±0,8	30,5±0,5*	23,9±0,5*	20,3±1,0	11,5±0,3*	11,9±0,3
	15	49,8±0,7	35,6±0,6*	36,6±0,8*	31,4±1,1	22,6±0,4*	21,3±0,6	18,4±0,5	13,0±0,4*	15,3±0,6*
	21	39,7±0,6	23,5±0,7*	29,7±0,5*	22,7±0,5	14,1±0,7*	18,7±0,4*	17,0±0,5	9,40±0,20*	11,01±0,20*
	30	37,1±0,7	24,2±0,7*	32,0±0,8*	21,8±0,3	15,2±0,7*	20,1±0,6*	15,3±0,6	9,0±0,5*	11,9±0,7*

Примечание. 1-я группа (контроль) — интактные животные; 2-я группа — потомство алкоголизованных самок; 3-я группа — потомство алкоголизованных самок, получавших доливов. Цифровые показатели во 2-й группе сравнивали с показателями в 1-й, а в 3-й группе — с показателями во 2-й.

* $P < 0,01$.

** $P < 0,05$.

Количество нервных клеток определяли суммарно в лимбической коре (поясной извилине и энторинальной области). На ранних этапах развития, на фоне продолжающейся стратификации коры, формирование отдельных слоев пока не завершено, поэтому количество клеток определяли в верхних и глубоком отделах, которые соответствовали I–III и IV–VI слоям. Потомство алкоголизованных в период беременности и лактации самок на 3-, 7-, 15-, 21-е и 30-е сутки постнатального развития (P3, P7, P15, P21, P30) умерщвляли под эфирным наркозом согласно правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных. Мозг фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы толщиной 10 мкм окрашивали крезоловым фиолетовым. Плотность расположения нервных клеток определяли в каждом 3-м срезе в 10 полях зрения ($0,0256 \text{ мм}^2$) с помощью окулярной сетки (об. 40, ок. 10) (Amplival, Zeiss, Германия). Полученные цифровые данные обрабатывали параметрическими методами вариационной статистики с использованием критериев Фишера и Стьюдента.

Результаты исследования. При определении плотности расположения нервных клеток в поясной извилине и энторинальной коре обнаружено, что у крыс 2-й группы число нервных клеток было значительно меньше, чем у животных 1-й группы. Это уменьшение числа нервных клеток было наиболее значительным в поясной извилине на 7-е сутки постнатальной жизни, когда оно составило почти половину общего количества клеток. На последующих этапах (P15, P21, P30) под влиянием этанола число клеток также уменьшалось (таблица). Таким образом, интоксикация этанолом в поясной извилине вызывала снижение числа нейронов, увеличивающееся с возрастом. В энторинальной коре на всех этапах постнатального развития также уменьшалось общее число нейронов по сравнению с таковым в контроле, но в отличие от поясной извилины в ней этот процесс происходил менее интенсивно (см. таблицу).

При определении числа нейронов в верхнем и глубоком отделах поясной извилины и энторинальной коры было обнаружено, что этаноловая интоксикация в основном поражала нейроны глубокого отдела. Так, в этом отделе поясной извилины на начальных этапах постнатального развития (P3, P7, P15) число нейронов снижалось на 55, 64 и 47%, а на последующих этапах (P21 и P30) — на 18 и 14%. В верхнем отделе уменьшение числа нейронов колебалось в пределах 23–30%. В энторинальной коре также наблюдалось более выраженное уменьшение числа нейронов в глубоком отделе (см. таблицу).

Таким образом, подсчет количества нейронов показал, что наиболее чувствительными к этаноловой интоксикации оказались крупные нейроны глубоких слоев.

Общее число нейронов у животных 3-й группы в поясной извилине преобладает над таковым у крыс 2-й группы на всех исследованных этапах постнатального развития начиная с 7-х суток, в то время как в энторинальной коре превентивные свойства долифина проявляются лишь на более поздних этапах развития (P21 и P30).

При определении плотности расположения нервных клеток было обнаружено, что в поясной извилине на 7-е сутки постнатального развития после введения долифина количество клеток уменьшилось на 50%, а при этаноловой интоксикации — на 64%.

Анализ динамики количества нервных клеток в процессе постнатального развития в обоих регионах лимбической коры выявил, что на его ранних этапах (P3, P7, P15) уменьшение числа нейронов происходит значительно, чем на последующих (P21 и P30).

Обсуждение полученных данных. Воздействие этанолом на развивающуюся ЦНС вызывает отчетливо выраженные морфологические изменения в коре большого мозга. Нарушение процессов пролиферации и миграции вызывает изменение нормального развития корковых и подкорковых структур головного мозга [13].

Обнаруженное нами уменьшение значительного числа нейронов на 7-е сутки постнатального развития потомства алкоголизированных самок согласуется с данными исследователей, которые отмечали, что увеличение числа гибнущих клеток может быть вызвано влиянием этанола в критический для развития головного мозга период (P7), когда выявлен пик гибели глиальных клеток в коре развивающегося мозга [12]. Было показано также, что после этаноловой интоксикации первые 10 сут лактации являются критическими для развития ферментной системы развивающегося мозга [1]. Исходя из сказанного выше, можно предположить, что выявленное нами уменьшение числа нейронов на ранних этапах постнатального развития (особенно на 7-е сутки) может быть следствием низкого уровня развития эндогенной антиоксидантной ферментной системы, защищающей клетки от воздействия свободных радикалов. На более поздних этапах активность этой системы усиливается, и влияние этанола вызывает меньшее снижение числа клеток. Этот факт можно объяснить также более высоким уровнем нейротрофических факторов, способствующих лучшему выживанию нейронов после влияния этанола на P21, чем на P7 [9].

Согласно данным литературы, в раннем постнатальном онтогенезе, восстановительные про-

цессы усиливаются, хотя деструктивные изменения нейронов продолжают в дальнейшем и встречаются в течение длительного времени [15]. При изучении метаболической активности клеток коры большого мозга половозрелого потомства алкоголизированных в период беременности самок было обнаружено накопление супероксидных радикалов, инактивация супероксиддисмутазы, а также увеличение содержания оксида азота [3].

Исходя из сказанного выше, выявленное нами особенно отчетливо выраженное уменьшение числа нейронов на 7-е сутки постнатального развития, по сравнению с таковым на более поздних этапах (P21, P30), когда число гибнущих клеток значительно снижалось, можно объяснить еще отсутствием формирования ферментной системы, дефицитом нейротрофических факторов и восстановительных процессов на ранних этапах постнатального развития.

Выявленное снижение содержания нейронов лимбической коры у потомства алкоголизированных самок, вызванное в значительной мере гибелью этих клеток, ведет к дегенерации афферентных и ассоциативных связей, приводящей к нарушению функциональной активности лимбической системы в целом. Поясная извилина проецируется на энторинальную кору, которая является главным источником корковых афферентных волокон гиппокампа. Нейроны энторинальной коры образуют связи с клетками-зернами зубчатой извилины гиппокампа и пирамидными клетками полей CA1 — CA2 аммонова рога. Поэтому обнаруженное нами уменьшение числа нейронов поясной извилины и энторинальной коры после этаноловой интоксикации в дальнейшем вызовет нарушение формирования корково-гиппокампальных и корково-таламических связей, которое проявится в процессах обучения и памяти [14]. Полученные нами данные, касающиеся уменьшения числа нейронов в лимбической коре потомства алкоголизированных самок, преимущественно за счет гибели клеток глубокого отдела (IV–VI слои), совпадают с результатами исследователей, также обнаруживших, что пренатальная этаноловая интоксикация в неокортексе поражает особенно пирамидные нейроны V слоя [7, 15].

Токсическое действие свободных радикалов, вызванное алкоголем, подавляется разными антиоксидантами. Эндогенная антиоксидантная ферментная система в нейронах предохраняет их от оксидативного воздействия, поэтому снижение активности этой системы, вследствие алкогольной интоксикации, может вызвать поражение клеток и затем их гибель. Деструктивные процессы

при неврологических заболеваниях, а также после алкогольной интоксикации подавляются антиоксидантами [5, 6, 11]. Показано, что применение антиоксиданта доливина ведет к ослаблению вызванных этанолом нарушений пролиферативных процессов матричных клеток боковых желудочков головного мозга, снижению интенсивности окислительного метаболизма в коре большого мозга и улучшению процессов обучения и памяти половозрелого потомства алкоголизированных самок белых крыс, а также нормализации роста аксонов, спраутинга и миграции глиоцитов в условиях *in vitro* [2, 3, 13, 14].

Таким образом, было выявлено уменьшение числа нейронов в лимбической коре у потомства самок белых крыс, которые в период беременности и лактации получали этанол. Особенно отчетливо это уменьшение под воздействием этанола проявилось в глубоких отделах и на более ранних этапах развития. Применение одновременно с этанолом антиоксиданта доливина выявило его превентивные свойства, выражающиеся в ослаблении цитотоксического эффекта этанола. Таким образом, прием доливина алкоголизированными в период беременности и лактации самками не ингибирует полностью деструктивное влияние этанола, но значительно снижает число погибших клеток.

ЛИТЕРАТУРА

- Мишук Д.О. и Капля А.А. Состояние Na^+ , K^+ -АТФ-азной системы коры головного мозга крыс в постнатальный период в условиях потребления этанола самками при беременности и лактации. Укр. біохім. журн., 2002, т. 74, № 6, с. 58–64.
- Мусеридзе Д.П. Влияние этанола на рост и дифференцировку мотонейронов спинного мозга и возможность коррекции этого влияния в условиях *in vitro*. Бюл. exper. биол., 2005, т. 139, № 5, с. 597–600.
- Мусеридзе Д.П., Саникидзе Т.В. и Сванидзе И.К. Изучение изменения метаболической активности клеток коры головного мозга после алкогольной интоксикации и коррекция этих изменений доливином. Бюл. exper. биол., 2006, т. 142, № 9, с. 252–254.
- Попов В.Г. Новое антигипоксическое вещество гипоксен. В кн.: Материалы конф., посвящ. памяти акад. И.Н. Блохиной. М., изд. Рос. акад. медико-технических наук, 1999, с. 33–34.
- Aksenova M.V., Aksenov M.Y., Mactutus Ch.F. and Booze R.M. Cell culture models of oxidative stress and injury in the Central Nervous System. Curr. Neurovasc. Res., 2005, v. 2, № 1, p. 73–89.
- Chen S.Y., Dehart D.B. and Sulik K.K. Protection from ethanol-induced limb malformation by the superoxide dismutase/catalase mimetic, EUK-134. FASEB J., 2004, v. 18, № 11, p. 1234–1236.
- Fakoya P.A. Persistent neocortical astrogliosis in adult Wistar rats following prenatal ethanol exposure. Brain Dev., 2005 v. 27, № 4, p. 259–265.
- Goodlett C.R. and Horn K.H. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. Alcohol Res. Health., 2001, v. 25, № 3, p. 175–184.
- Heaton M.B., Paiva M., Madorsky I. and Shaw G. Ethanol effects on neonatal rat cortex: Comparative analyses of neurotrophic factors, apoptosis-related proteins, and oxidative processes during vulnerable and resistant periods. Brain Res. Dev. Brain Res., 2003, v. 145, № 2, p. 249–262.
- Herrera D.G., Yague A.G., Johnsen-Soriano S. et al. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, v. 100, p. 7919–7924.
- Keswani S.C., Buldanlioglu U., Fischer A. et al. A novel endogenous erythropoietin mediated pathway prevents axonal degeneration. Ann. Neurol., 2004, v. 56, № 6, p. 815–826.
- Miller M.W. Effects of prenatal exposure to ethanol on the development of cerebral cortex: Neuronal degeneration. Alcohol. Clin. exp. Res., 1998, v. 12, № 3, p. 440–449.
- Museridze D.P., Didimova E.V., Svanidze I.K. and Bregvadze I.A. Influence of ethanol on proliferation of the latezale ventricle matrix cells and the motor cortex gliocytes in the rats and correction of this influence. Georgian J. Neurosci., 2006, v. 2, № 1, p. 75–79.
- Museridze D.P., Tsiaishvili Ts.S., Svanidze I.K. and Khanayeva Z. Disorders in memory and learning of offspring of alcoholized female rats, and a possibility for correction of these changes. Neurophysiology, 2008, v. 40, № 2, p. 115–120.
- Popova E.N. Structure of the sensorimotor area of the cerebral cortex in the offspring of alcoholized rats. Neurosci. Behav. Physiol., 2004, v. 34, № 7, p. 663–669.

Поступила в редакцию 07.07.08

Получена после доработки 24.12.08

EFFECT OF ETHANOL ON THE DENSITY OF NEURON DISPOSITION IN LIMBIC CEREBRAL CORTEX AND CORRECTION OF INDUCED CHANGES WITH ANTIOXIDANT DOLIVIN

D.P. Museridze and L.G. Gegnava

The purpose of this study was to determine the density of neuron disposition at the early stages of postnatal development of limbic cortex in the offspring of female rats, that consumed 15% ethanol solution during pregnancy and lactation period instead of water, and to detect the possibility of the correction of ethanol-induced changes with antioxidant Dolivin. The number of neurons in the cingulate gyrus and entorhinal cortex was determined at different stages of postnatal development (postnatal days 3, 7, 15, 21, 30). With an aim to correct ethanol-induced disorders, alcoholized females for the similar period of time, were given Dolivin (0.7mg daily). It was shown that the cytotoxic effect of ethanol resulted in the decrease in the neuron numbers at the early stages of postnatal development, particularly at day 7. The neurons most sensitive to the ethanol action were observed in the deeper limbic cerebral cortex. The application of Dolivin has demonstrated its preventive effect, by weakening the ethanol cytotoxicity at the all stages of postnatal development.

Key words: *limbic cortex, ethanol, antioxidant.*

Department of Neuroanatomy, I. Beritashvili Institute of Physiology, Tbilisi, Georgia.