

ВЛИЯНИЕ СЕМИДНЕВНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ МОЗГА КРЫСЫ

Е. М. Федина, С. М. Зиматкин

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Цель исследования – оценка влияния алкоголя на гистаминергические нейроны мозга крысы после семидневной алкогольной нагрузки путем внутрибрюшинного введения 20% -раствора этанола в дозе 4 г/кг/сут. Исследование выполнено на 18 самцах беспородных белых крыс с использованием гистологических, гистохимических, цитофотометрических и морфометрических методов анализа. В цитоплазме гистаминергических нейронов опытных животных происходит увеличение активности лактатдегидрогеназы и кислой фосфатазы, а также снижение активности дегидрогеназ НАДН, НАДФН и сукцината. Перикарионы гистаминергических нейронов уменьшаются в размере и становятся более сферичными. Ядра также немного уменьшаются и вытягиваются.

Ключевые слова: мозг, гистаминергические нейроны, структура, метаболизм, алкоголь.

Введение

Алкоголь – токсическое и вызывающее зависимость вещество, злоупотребление которым является актуальной проблемой современного общества. Алкоголь может приводить к повреждению большинства органов, он способствует развитию более чем 60 различных болезней, вносит значительный вклад в заболеваемость и смертность населения [7, 3]. В настоящее время потребление спиртных напитков выступает в качестве третьей ведущей причины нарушений здоровья в Европе. При этом мозг особенно чувствителен к токсическому действию алкоголя [13]. В литературе накапливается всё больше данных о вовлечении гистаминергической системы мозга в механизмы действия алкоголя на мозг и патогенез алкоголизма [14, 1, 5, 10].

Одним из наиболее широко известных эффектов алкоголя, используемым в экспериментальных исследованиях, как индикатор чувствительности к этанолу, является атаксия (гипнотический эффект этанола, или наркотический сон) [7]. Известно, что при многократном введении наркотической тест-дозы этанола длительность алкогольиндуцированного сна постепенно снижается, что отражает повышение устойчивости к этанолу. Поскольку одной из основных функций гистаминергической системы мозга в организме является регуляция процессов сна и бодрствования, важную роль в механизмах формирования толерантности к наркотическому действию алкоголя могут играть гистаминергические нейроны мозга [4]. Поэтому изучение изменения их морфофункционального состояния после многократного введения наркотической дозы алкоголя представляется особенно интересным.

Все вышеизложенное отражает актуальность проведенного исследования, цель которого – оценка влияния субхронического введения наркотической дозы этанола на структурные и гистохимические показатели гистаминергических нейронов мозга крыс.

Материалы и методы

В работе использован материал от 18 беспородных белых крыс-самцов массой 175 ± 25 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Все опыты проведены с учётом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета. Опытным животным (10 крыс) на протяжении 7 дней внутрибрюшинно вводили 20% -раствор этанола в дозе 4 г/кг/сут. После каждого введения измеряли длительность

алкогольного наркоза подопытных животных, которую определяли по продолжительности потери рефлекса переворачивания у крыс. Критерием снижения чувствительности к алкоголю служило уменьшение времени алкогольиндуцированного сна, вызванного введением тест-дозы этанола. Контролем служили животные (8 крыс), которым в те же сроки внутрибрюшинно вводили эквивалентный объем физиологического раствора. Декапитацию проводили через 24 часа после последнего введения этанола, быстро извлекали головной мозг, вырезали образцы гипоталамуса, которые замораживали и хранили в жидком азоте для дальнейшего светооптического исследования.

Серийные криостатные срезы (криостат Leica CM 1840, Германия) окрашивали 0,1% толуидиновым синим по методу Ниссля, гистохимически выявляли в них активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ), НАДФН-дегидрогеназы (НАДФН-ДГ), глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-Ф-ДГ), кислой фосфатазы (КФ) [9], а также моноаминоксидазы типа Б (МАО Б) (инкубация 45 минут) [8, 6].

Размеры и форму перикарионов и ядер гистаминергических нейронов оценивали в препаратах, окрашенных по методу Ниссля и на выявление активности МАО Б (инкубация 90 минут). Активность ферментов определяли цитофотометрически по оптической плотности полученного осадка хромогена в цитоплазме нейронов. При идентификации гистаминергических нейронов ядра E2 мозга крысы использовали соответствующие топографические схемы и атласы [6, 12], иммуногистохимическим методом выявления гистамина [10] и гистохимическим методом выявления активности МАО Б [8].

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию и цитофотометрию проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (Leica DFC 320, Германия) и программы анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). В каждой экспериментальной группе оценивали не менее 120-150 нейронов, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа.

Полученные результаты анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). В описательной статистике для каждого показателя определяли значение медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Достоверными считали различия между конт-

рольной и опытной группами при значениях $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-test) [2].

Результаты и обсуждение

При введении животным на протяжении 7 дней 20%-аствора этанола в дозе 4 г/кг/сут отмечено, что потеря рефлекса переворачивания у подопытных крыс происходит в среднем через 2-3 минуты после введения алкоголя и продолжается от 15 минут до 4 часов. При этом наблюдается постепенное уменьшение времени алкогольноиндуцированного «сна», которое становится статистически значимым с 5-го дня эксперимента, что может свидетельствовать о формировании толерантности к наркотическому действию этанола у исследуемых животных [7].

Морфометрическое исследование гистаминергических нейронов E2 заднего отдела гипоталамуса головного мозга крыс после семидневной алкогольной нагрузки показало уменьшение у опытных животных минимального и максимального диаметров на 5,2% и на 7,9%, соответственно, периметра – на 8,3%, площади – на 10,2% и объема – на 14,7%, а также увеличение форм-фактора на 8,6% (табл. 1). Это свидетельствует об уменьшении размеров и увеличении сферичности нейронов. При этом размеры и форма ядер гистаминергических нейронов претерпевают следующие изменения: минимальный диаметр снижается на 6,3%, площадь и объем – на 9,6% и 13,9%, соответственно, в то время как фактор элонгации повышается на 3,7%, а форм-фактор уменьшается на 3,6% (табл. 2). Это свидетельствует об уменьшении их размеров и сферичности, а также вытягивании ядер. Ядерно-цитоплазматическое соотношение гистаминергических нейронов достоверно не изменяется.

Таблица 1 – Показатели размеров и формы перикарионов гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крыс (окраска по Нисслю) через сутки после семикратного введения алкоголя в дозе 4 г/кг ($Me \pm IQR$)

Параметры	Контроль	Алкоголь
Мин. диаметр, мкм	12,266 \pm 0,699	11,552 \pm 0,380 * v
Макс. диаметр, мкм	19,122 \pm 0,515	17,562 \pm 1,024 * v
Периметр, мкм	54,962 \pm 2,642	49,356 \pm 4,315 ** v
Площадь, мкм ²	182,567 \pm 22,726	161,459 \pm 32,519 * v
Объем, мкм ³	1856,356 \pm 343,245	1544,323 \pm 468,144 * v
Форм-фактор	0,749 \pm 0,058	0,815 \pm 0,057 ** ^
Фактор элонгации	1,532 \pm 0,122	1,462 \pm 0,211

Примечание: ^ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра; v – статистически значимое снижение изучаемого параметра; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ при сравнении с контролем

Таблица 2 – Показатели размеров и формы ядер гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крыс (окраска по Нисслю) через сутки после семикратного введения алкоголя в дозе 4 г/кг ($Me \pm IQR$)

Параметры	Контроль	Алкоголь
Мин. диаметр, мкм	7,891 \pm 0,804	7,384 \pm 0,222 * v
Макс. диаметр, мкм	11,052 \pm 0,871	10,870 \pm 0,938
Периметр, мкм	30,811 \pm 2,972	31,733 \pm 2,121
Площадь, мкм ²	67,985 \pm 8,652	60,842 \pm 9,702 * v
Объем, мкм ³	421,845 \pm 80,510	357,171 \pm 86,453 * v
Форм-фактор	0,846 \pm 0,036	0,819 \pm 0,024 ** v
Фактор элонгации	1,492 \pm 0,076	1,519 \pm 0,040 * ^
Ядерно-цитоплазматическое соотношение	0,647 \pm 0,128	0,642 \pm 0,191

Примечание: ^ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра; v – статистически значимое снижение изучаемого параметра; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ при сравнении с контролем

Таблица 3 – Количество разных типов гистаминергических нейронов заднего гипоталамуса крыс (по степени хромофилии цитоплазмы) в норме и через сутки после семикратного введения алкоголя в дозе 4 г/кг ($Me \pm IQR$)

Показатели	Контроль	Алкоголь
Нормохромные нейроны	90,652 \pm 7,993	78,543 \pm 9,452
Гипохромные нейроны	3,700 \pm 2,540	11,331 \pm 4,429 * ^
Гиперхромные нейроны	3,145 \pm 2,995	4,673 \pm 6,342
Клетки-тен и	2,793 \pm 1,652	6,799 \pm 4,328 * ^

Примечание: * – сравнение с контролем при $P < 0,05$;

^ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра

Аналогичные результаты получены и при морфометрии гистаминергических нейронов, окрашенных на выявление активности MAO Б: снижение минимального диаметра перикарионов на 5,9%, периметра – на 8,2%, площади – на 8,2% и объема – на 11,8%, а также уменьшение минимального диаметра ядер данных нервных клеток на 5,7%, площади и объема на 4,7% и 6,9%, соответственно, и увеличение их фактора элонгации на 4,1%.

Под действием алкоголя среди исследованных гистаминергических нейронов значительно возрастает число гипохромных нейронов (с 3 до 15%) и клеток-теней (с 2 до 9%) (табл. 3). Последнее отражает «тяжелые изменения» и гибель части нейронов под действием алкоголя.

Поскольку статистически достоверно изменяются практически все изученные морфометрические показатели, полученные данные свидетельствуют о реактивных изменениях перикарионов и ядер гистаминергических нейронов мозга. В ходе адаптационных перестроек гистаминергические нейроны сжимаются и округляются. Напротив, их ядра становятся менее сферичными и несколько вытягиваются.

Проведенное гистохимическое исследование показало, что в цитоплазме гистаминергических нейронов опытных животных происходит снижение активности СДГ – митохондриального фермента аэробного распада углеводов в цикле Кребса, НАДН-ДГ – митохондриального фермента, участвующего в переносе электронов и являющегося важным связующим звеном между конечными продуктами распада углеродного скелета и дыхательной цепью, а также НАДФН-ДГ – фермента, отражающего интенсивность протекания внемитохондриальных энергетических процессов. При этом происходит компенсаторное возрастание активности ЛДГ – показателя интенсивности анаэробного гликолиза. Активация КФ – маркерного фермента лизосом – отражает усиление процессов аутофагии, направленных на удаление поврежденных мембран и органелл в гистаминергических нейронах в условиях субхронического воздействия алкоголя, и напряжённое функционирование нейронов в процессе адаптации к этому токсическому агенту. Активность MAO Б и Г-6-Ф-ДГ в гистаминергических нейронах мозга после семидневного введения алкоголя существенно не отличается от контроля (табл. 4).

Можно полагать, что выявленные структурные и гистохимические изменения гистаминергических нейронов мозга являются проявлением защитной реакции организма и отражают адаптационные перестройки исследуемой нейронной системы мозга, необходимые для поддержания гомеостаза в создавшихся условиях токсического воздействия алкоголя. С другой стороны, данные изменения могут отражать участие гистаминергических нейронов мозга в механизмах формирования устойчивости к наркотическому действию этанола.

Таблица 4 – Активность ферментов в цитоплазме гистаминергических нейронов ядра E2 гипоталамуса крыс в норме и через сутки после семикратного введения алкоголя в дозе 4 г/кг (Me ± IQR)

Фермент	Контроль	Алкоголь
Г-6-Ф-ДГ	0,29876±0,022	0,28551±0,027
КФ	0,41548±0,034	0,54322±0,053 * ^
ЛДГ	0,40431±0,044	0,49811±0,024 * ^
МАО Б	0,66211±0,053	0,65589±0,066
НАДН-ДГ	0,59231±0,032	0,55348±0,029 * v
НАДФН-ДГ	0,39532±0,044	0,33218±0,056 * v
СДГ	0,30499±0,036	0,26331±0,051 * v

^ – статистически значимое увеличение изучаемого параметра;

v – статистически значимое снижение изучаемого параметра;

* – p<0,05;

** – p<0,01 при сравнении с контролем.

Заключение

Исходя из полученных в ходе исследования результатов, можно сформулировать следующие **выводы**:

1. После семидневной алкогольной интоксикации у крыс происходит уменьшение размеров тел гистаминергических нейронов и увеличение их сферичности. При этом ядра данных нейронов уменьшаются в размерах, но несколько вытягиваются.

2. Субхроническое введение животным наркотической дозы этанола приводит к перестройке энергетического метаболизма гистаминергических нейронов: снижению активности дегидрогеназ НАДН, НАДФН и сукцината и увеличению активности лактатдегидрогеназы и кислой фосфатазы. Это может быть связано с адаптационным возрастанием поведенческой устойчивости животных к этанолу.

Список использованной литературы

1. Анищик, О.В. Центральная гистаминергическая система в норме и при некоторых патологических состояниях / О.В. Анищик, С.М. Зиматкин // Весці НАН Беларусі. – 2002. – № 2. – С. 94-102.

2. Батин, Н.В. Компьютерный статистический анализ данных: учеб.-метод. пособие / Н.В. Батин. – Мн.: Ин-т подгот. науч. кадров Нац. акад. наук Беларуси, 2008. – 160 с.

3. Буров, Ю.В. Нейрохимия и фармакология алкоголизма / Ю.В. Буров, Н.Н. Ведерникова. – М.: Медицина, 1985. – 240 с.

4. Зиматкин, С.М. Гистаминергическая система мозга: монография / С.М. Зиматкин. – Гродно: ГрГМУ, 2007. – 264 с.

5. Зиматкин С.М. Гистаминергическая система мозга и алкоголь. / С.М. Зиматкин, Е.И. Бонь // Журнал ГрГМУ. – 2009. – № 1. – С. 27-30.

6. Зиматкин, С.М. Пространственная организация и морфометрическая характеристика гистаминергических нейронов мозга крысы / С.М. Зиматкин, В.Б. Кузнецова, О.Н. Стрик // Морфология. – 2005. – Т. 127, № 2. – С. 27-30.

7. Зиматкин, С.М. Ацетатзависимые механизмы толерантности к этанолу: монография / С.М. Зиматкин, Н.А. Оганесян, Ю.В. Киселевский. – Гродно: ГрГМУ, 2010. – 252 с.

8. Зиматкин, С.М. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге / С.М. Зиматкин, В.Ф. Цыдик // Морфология. – 1994. – № 4. – С. 157-161.

9. Пирс, Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс. – М.: Издательство иностранной литературы, 1962. – 962 с.

10. Brabant, C. Involvement of the brain histaminergic system in addiction and addiction-related behaviors: A comprehensive review with emphasis on the potential therapeutic use of histaminergic compounds in drug dependence. / C. Brabant [et al.] // Progress in Neurobiology. – 2010. – Vol. 92. – P. 421-441.

11. Panula, P., Hapola, O., Airaksinen, M.S. et al. Carbodibmide as a tissue fixative in histamine immunohistochemistry and its application in developmental neurobiology / P. Panula [et al.] // J. Histochem. Cytochem. – 1988. – Vol. 36. – P. 259-269.

12. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. 6th ed. – London: Academic Press, 2007. – 448 p.

13. Thomson, A.D. Alcohol-Related Brain Damage: Report from a Medical Council on Alcohol Symposium, June 2010 / A.D. Thomson [et al.] // Alcohol and Alcoholism. – 2012. – Vol. 47. – P. 1-8.

14. Зиматкин, С.М. Алкоголь-гистаминергические взаимодействия / С.М. Зиматкин, О.В. Анищик // Alcohol and Alcoholism. – 1999. – Vol. 34, № 2. – P. 141-147.

THE INFLUENCE OF SEVEN-DAYS ALCOHOL INTOXICATION ON HISTAMINERGIC NEURONS OF RAT BRAIN

S.M. Zimatkin, E.M. Fedina

Educational Establishment «Grodno State Medical University»

The aim of the study was to estimate alcohol influence on rat brain histaminergic neurons after seven-day's alcohol intoxication with 20 % ethanol solution in a dose of 4 g/kg/day. The samples from 18 male albino rats were evaluated using histological, histochemical and morphometric methods. It was found that the cytoplasm in histaminergic neurons of experimental animals showed the increased activity of lactate dehydrogenase and acid phosphatase, and the decrease in NADH, NADPH and succinate dehydrogenases activity as well. The histaminergic neurons perikarya decreased in size and became more spherical. Nuclei also showed slight decrease and appeared more elongated.

Key words: brain, histaminergic neurons, structure, metabolism, alcohol.

Поступила 29.08.2012