

УДК 612.82+611.018.82+547.262

Влияние таурина на клеточные структуры черной субстанции крыс, подвергнутых этанольной интоксикации

В.П. Хачатрян

*Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА
0028, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22*

Ключевые слова: черная субстанция, этанольная интоксикация, таурин

Алкогольная энцефалопатия является одной из основных причин деменции и диагностируется у 10-30% пациентов с клиническими признаками слабоумия [9]. Алкоголь и его метаболит – ацетальдегид обладает нейротоксическим действием, прямо воздействуя на нервные клетки [1]. Хроническая алкогольная интоксикация вызывает функциональные и морфологические нарушения практически во всех системах и структурах головного мозга [7]. Функциональные изменения на уровне рецепторов и нейротрансмиттеров предшествуют более тяжелым структурным повреждениям нейронов. Алкогольная интоксикация, длительностью в несколько дней, также может вызывать гибель нейронов в некоторых отделах мозга [5]. Известно, что алкогольная энцефалопатия ассоциируется с повышенным риском производственного и транспортного травматизма, а также с асоциальным поведением. В связи с этим актуальной задачей является исследование патогенеза алкогольного поражения мозга с целью разработки методов профилактики и лечения.

Хроническая интоксикация этанолом приводит к развитию физической зависимости с неудержимым влечением к алкоголю, к развитию абстинентных расстройств после прекращения его систематического приема [4]. Одним из путей уменьшения токсического действия этанола на организм может быть использование веществ, способных прямо взаимодействовать со свободным ацетальдегидом и снижающих его уровень в крови, органах и тканях. К числу таких веществ относится таурин. Злоупотребление алкоголем приводит к дефициту таурина в организме и к тому же нарушает способность организма усваивать его [3]. Как сообщают зарубежные авторы, таурин может быть полезен в качестве средства для пациентов с алкогольной зависимостью [8]. Клинические исследования продемонстрировали, что применение таурина у испытуемых, употреблявших этанол, приводило к снижению содержания ацетальдегида в крови по

сравнению с контрольной группой, не получавшей препарат [10], то есть таурин помогает организму избежать те негативные последствия, которые возникают при изъятии алкоголя. Результаты исследований свидетельствуют о селективности алкогольного поражения мозга. Черная субстанция обладает избирательной чувствительностью к алкоголю [6].

Исходя из этого, целью исследования явилось изучение морфофункционального состояния черной субстанции крыс при алкоголизации 15% раствором этилового спирта и протекторного влияния биологически активного вещества таурина в динамике после этанольной интоксикации.

Материал и методы

Исследования проводили на 40 половозрелых крысах-самках Альбино, массой 200–250 г. Нормой служили интактные животные (n=5). Все экспериментальные животные находились на сухом корме и в качестве единственного источника жидкости получали воду либо 15% раствор этанола. Животные были разделены на контрольную группу (n=5, получавшие в течение 3 месяцев 15% раствор этилового спирта, после чего на 7 дней переведенные на воду, изъятие) и 3 опытные группы в зависимости от сроков приема алкоголя (10 дней, 1 и 3 месяца соответственно, по 5 животных в каждой группе).

Для изучения влияния таурина на клеточные структуры мозга крыс после алкоголизации животные также были подразделены на 3 группы (по 5 крыс в каждой группе), получавшие 15% раствор этилового спирта в течение 10 дней, 1 и 3 месяцев соответственно, после чего переведенные на воду и каждодневные инъекции водного раствора таурина в течение 7 дней (50 мг на 1 кг массы, в/б). Все работы с животными были проведены в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 2010/63/EU) и одобрены Этическим комитетом ЕГМУ им. М. Гераци.

С целью изучения морфофункционального состояния клеточных структур гиппокампа крыс был применён гистохимический метод выявления активности Ca^{2+} -зависимой КФ [2]. Животные были наркотизированы нембуталом (40–45 мг на 1 кг массы, в/б) с последующим изъятием мозга, который фиксировали в 5% растворе нейтрального формалина в течение 48 часов при +4°C. Производили ленточные серийные срезы головного мозга во фронтальной плоскости от лобного полюса полушарий до спинного мозга. Замороженные срезы, толщиной 40–50 мкм, согласно требованиям дальнейшей обработки, переносились в заранее свежеприготовленные соответствующие инкубационные смеси, предназначенные для выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы. Последующие съемки полученных препаратов производились с помощью фотоап-

парата OPTONM-35 и фотонасадки AmScope MU800 через микроскоп OPTON (West Germany).

Результаты и обсуждение

Черная субстанция имеет сложную структуру и обильное кровоснабжение, что говорит о высокой роли ее компонентов в системе координации жизнедеятельности, она ответственна за тонус мышц и бессознательные, автоматические движения и отражает высокий уровень обменных процессов в ядре. Основной частью черной субстанции являются средних размеров нейроны с диффузным распределением хромотофильного вещества цитоплазмы, богатые пигментом нейромеланином. Мелкозернистый и глыбчатый меланин заполняет почти всю цитоплазму нервных клеток черной субстанции (рис. 1 А-В). У интактных животных черная субстанция состоит из клеток весьма разнообразной формы, но в основном из клеток полигональной формы, расположенных в пределах трёх групп. Все клетки содержат длинные аксоны, имеют несколько умеренно или слабо ветвящихся отростков. На телах и отростках клеток, а также вокруг нейронов чётко выделяются синаптические окончания – синаптосомы (рис. 1 Б). Осадок фосфата свинца в виде гранул равномерно локализован в цитоплазме перикариона, окружает со всех сторон светло окрашенное и центрально расположенное ядро и распространяется в довольно длинных отростках нейрона (рис. 1 Б, В). В аксонах полигональных клеток черной субстанции наблюдаются чередующиеся на равном расстоянии светлые и темные участки, что создает впечатление поперечной исчерченности (рис. 1 В). Среди нейронов чёрной субстанции наблюдается реакция ядер глиальных клеток.

Изучение морфофункционального состояния черной субстанции при 15% этанольной интоксикации показало нарушение нейроархитектоники в ранние сроки алкоголизации (рис. 1 Г-Е). Наблюдается уменьшение объема и удельной плотности нейронов. Характерная полигональная форма сменяется на шарообразную из-за набухания тел. Происходит вздутие и округление клеточных тел черной субстанции. Контуров клеток становятся неправильными, нечеткими, появляются участки, где клеточная оболочка неразличима (рис. 1 Д, Е). Встречаются также клетки с центральным хромотолизом. В цитоплазме происходит постепенное растворение хромотофильного вещества, из-за чего она принимает более светлую окраску. Хромотолиз базофильного вещества цитоплазмы наблюдается в разной степени выраженности: сегментарный, перинуклеарный и субтотальный (рис. 1 Д). По мере распада базофильного вещества ядро также уменьшается в размерах, происходит кариолизис. Все нейроны лишены отростков (рис. 1 Д).

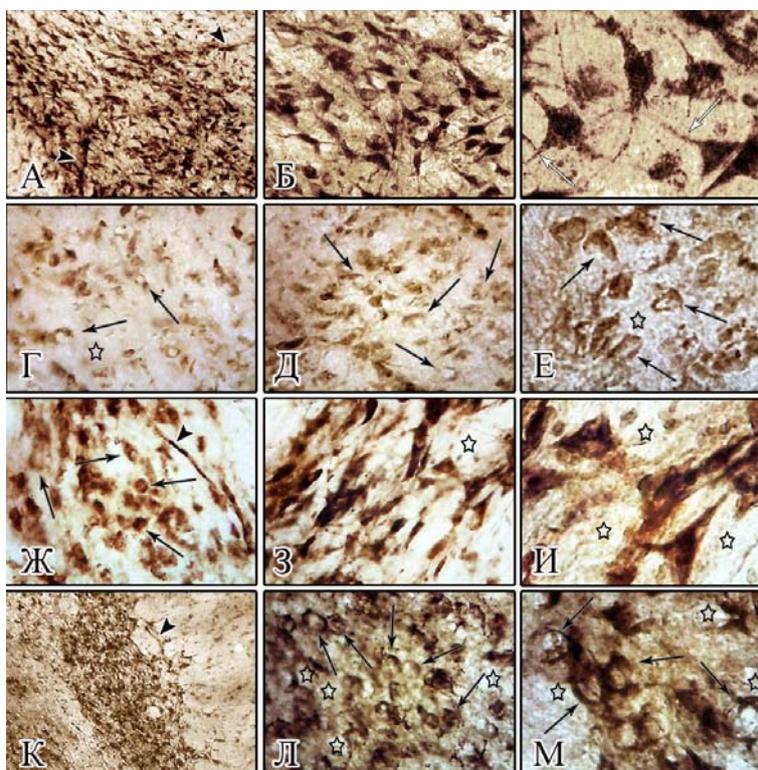


Рис. 1. Микрофотографии нейронов черной субстанции крыс в норме и при алкоголизации 15% раствором этанола в динамике (А-В – норма; Г-Е – алкоголизация в течение 10 дней; Ж-И – в течение 1 месяца и К-М – в течение 3 месяцев. А-В – нейроны полигональной формы, крупных и средних размеров с центрально расположенными ядрами и длинными отростками; белые стрелки – поперечная исчерченность в отростках; черные стрелки – хроматолиз; черная головка стрелки – сосуды; звездочки – околочелочный отек). Г-Е – центральный хроматолиз, изменение формы и размеров клеток. Ж-И – полигональные гипертрофированные дегенерированные клетки с нечеткими контурами, гомогенно окрашенные ядра глиальных клеток, выявляются капилляры. К-М – шарообразные клетки, потерявшие форму и лишённые отростков.

Оптич.увеличение: $\times 100$ (К); $\times 160$ (А); $\times 400$ (Б, Г, Д, Ж, З, Л); $\times 1000$ (В, Е, И, М)

Таким образом, морфогистохимическая картина нейронов черной субстанции в ранние сроки этанольной интоксикации выявляет изменения по типу ретроградной дегенерации (первичного раздражения нервной клетки), значительное снижение плотности, изменение формы и размеров нейронов (уменьшение объема).

На срезах мозга животных, получавших 15% раствор этанола в течение 1 месяца, наблюдается нейродегенерация разной степени тяжести (рис. 1 Ж-И). В некоторых клетках имеется тенденция к округлению клеточного тела с постепенным распылением гранул хроматофильного вещества цитоплазмы, из-за чего последняя принимает более светлую окраску (рис.

1 Ж). Ядра несколько увеличены в размере, у некоторых нейронов занимают эксцентричное положение и становятся гиперхромными. В таких нейронах наблюдаются процессы хроматолиза. Отростки слабо выражены либо полностью отсутствуют (рис. 1 Ж, З). На фоне таких дегенерированных клеток и межклеточного отека выделяются нейроны, у которых прослеживаются отдельные отростки, но ядра их также интенсивно окрашены (рис. 1 И). Нейроны гипертрофируются, принимают веретенообразную форму. Фосфатазная активность цитоплазмы резко усилена, центрально расположенные ядра умеренно набухшие, а контуры нечеткие. В целом, у них выявляются длинные аксоны, но фосфатазная активность в них снижена. Дендриты представлены в виде коротких обрубков, соответствующих месту их отхождения от тела. В некоторых случаях от тел нейронов отходит короткий, утолщенный отросток (рис. 1 З). У таких нейронов крупноглыбчатый осадок фосфата свинца неравномерно распределен в теле клетки, свидетельствуя о возможном полном распаде. Также встречаются нейроны, в телах которых осадок распределен гомогенно. Такие клетки лишены отростков или они утолщены, вытянуты вместе с телами, создавая впечатление толстых неровных обрубков (рис. 1 Ж, З). Повсеместно реагируют ядра глиальных клеток (рис. 1 З, И). Сильно реагируют расширенные сосуды, пронизывающие SN, то есть имеет место очевидное улучшение васкуляризации (рис. 1 Ж).

Длительное использование 15% этанола привело к полному нарушению цитоархитектоники черной субстанции (рис. 1 К-М). Клетки, содержащие меланин, подверглись изменениям в большей степени, чем клетки, свободные от пигмента. Поэтому черная субстанция даже при макроскопическом исследовании выглядит обесцвеченной. Нейроны гипертрофированы, характерная полигональная форма сменяется на шарообразную из-за набухания тел. Начиная с центральных участков клетки происходит лизис гранул хроматофильного вещества цитоплазмы (рис. 1 Л, М). Фосфатазная активность сохраняется лишь по периферии нейрона. Ядра, постепенно перемещаясь к одному из полюсов клетки, принимают эксцентричное положение. На фоне межклеточного отека отростки не выявляются (рис. 1 К-М).

Таким образом, длительная алкоголизация 15% раствором этанола, помимо гибели нейронов черной субстанции и депигментации, приводит к резким морфологическим изменениям внутриклеточных структур, свидетельствующим о грубых метаболических нарушениях.

Для понимания возможного положительного влияния таурина на морфофункциональное состояние черной субстанции крыс при интоксикации 15% раствором этанола были проведены исследования после изъятия хронического воздействия этанола (контроль для таурина). Крысы получали в течение трех месяцев 15% раствор этилового спирта, после чего были переведены на воду (в течение 1 месяца).

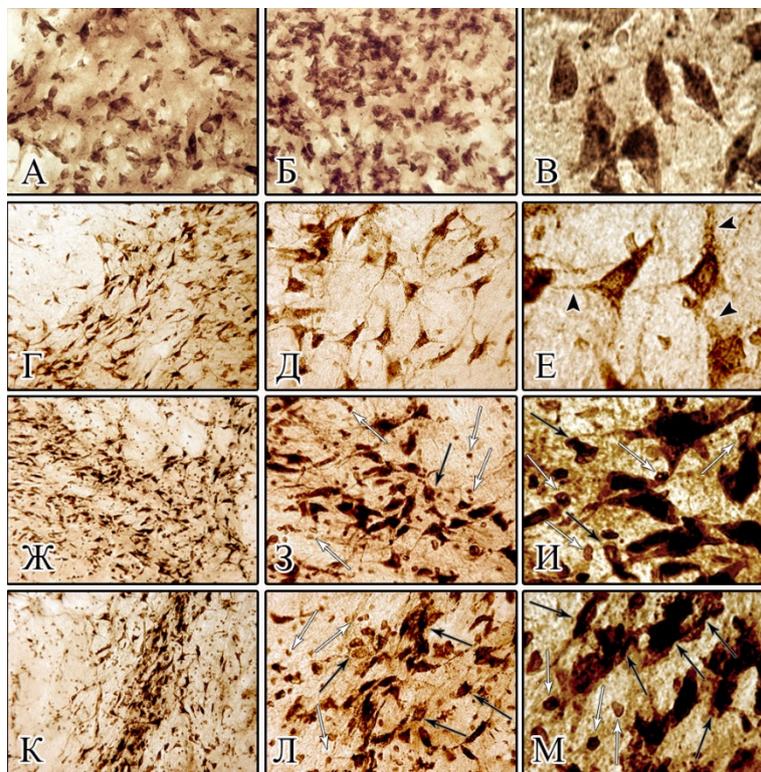


Рис. 2. Микрофотографии нейронов черной субстанции крыс после изъятия и в сочетании с инъекциями таурина после алкогольной интоксикации 15% этанолом в динамике (А-В – изъятие, подавление активности нейронов, укорочение или отсутствие отростков; Г-Е – 10 дней приема этанола с введением таурина; Ж-И – 1 месяц приема этанола с введением таурина; К-М – 3 месяца приема этанола с введением таурина). Г-Е – клетки полигональной формы, чёткие границы, длинные отростки, ядро центрально расположено; Ж-И – гипертрофированные интенсивно окрашенные деформированные клетки, эктопия ядер; К-М – веретенообразные дегенерированные клетки с нечёткими контурами, короткими отростками и овальной формой клетки; Ж-М – гомогенно окрашенные ядра глиальных клеток (черная головка стрелки – поперечная исчерченность в отростках; черные стрелки – центральный хроматолиз; белые стрелки – ядра глиальных клеток).
Оптич. увеличение: $\times 160$ (Г, Ж, К); $\times 400$ (А, Б, Д, З, Л); $\times 1000$ (В, Е, И, М)

Анализ наших данных показал, что после изъятия этанола происходит постепенное восстановление размеров тел нейронов. В основном наблюдается спад фосфатазной активности, уменьшается количество хромотофильного вещества в цитоплазме клеток (рис. 2 А-В). Отростки как боковые, так и аксиальные не выявляются. Исходя из этого, можно предположить, что после изъятия этанола в нейронах черной субстанции изменения проявляются в виде аксональной реакции (или, как иначе называют, ретроградной дегенерацией). Единично встречаются нейроны, бога-

тые пигментом нейромеланином и содержащие короткие аксоны (рис. 2 А). Вышеописанные изменения свидетельствуют о частичном приспособлении, но в основном, о подавлении активности нейронов черной субстанции после изъятия этанола.

По сравнению с травмированными в результате этанольной интоксикации крысами, у животных с введением таурина демонстрируется регенерация клеток. У крыс, получавших таурин в течение 7 дней после кратковременной интоксикации, нейроны черной субстанции полностью восстанавливаются, их форма и размеры приближаются к таковым как у интактных крыс (рис. 2 Г-Е). Увеличивается плотность расположения нейронов и число клеток с сопровождающими волокнами. Среди крупных нейронов начинают реагировать мелкие округлые клетки (рис. 2 Е). Клетки приобретают характерную им полигональную форму, контуры клеток становятся отчетливыми, у них реагируют тонкие длинные отростки, что указывает на частичное восстановление их связей с соседними клетками и другими областями мозга. У большинства из них просматриваются светлоокрашенные центрально расположенные ядра, которые выделяются на фоне гиперхромной цитоплазмы. У некоторых нейронов сильно окрашена перинуклеарная зона, что указывает на повышенный метаболизм, а ближе к отросткам отчетливо различаются отдельные гранулы (рис. 2 Г, Д). Высокая активность Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы обнаруживается в ядрышках клеток. Осадок фосфата свинца в цитоплазме клеток мелкогранулярный, равномерно локализован, интенсивность окрашивания выражена умеренно, отмечается снижение фосфатазной активности в сравнении с нормой (рис. 2 Д, Е). Важно отметить, что ядра в нейронах занимают центральное расположение и резко ограничены от цитоплазмы выраженной мембраной, ядерно-цитоплазматическое соотношение не нарушено.

У животных, получивших таурин после месячного приема этанола, полигональность формы клеток черной субстанции в основном не восстановлена, но есть тенденция к восстановлению характерных размеров (рис. 2 Ж-И). Процесс хроматолиза не выявляется, однако, наряду с клетками, сохранившими форму и отростки, встречаются гипертрофированные дегенерированные нейроны, подвергнутые хроматолизу, с эктопированным ядром (рис. 2 З, И). Повсеместно реагируют ядра глиальных клеток (рис. 2 З, И). Внутрицитоплазматическая грануляция крупноглыбчатая и расположена обильно, вследствие чего нейроны выглядят интенсивно окрашенными (рис. 2 Ж-И). При приеме таурина наблюдается повышение активности КФ (повышение метаболизма) в цитоплазме и ядре клеток, усиление процессов фосфорилирования в черной субстанции, что говорит об активации обменных процессов, направленных на поддержание нарушаемого в результате алкогольной интоксикации гомеостаза организма и, в конечном итоге, служит обеспечению оптимальных условий для процессов клеточного выживания и регенерации.

У крыс, получавших таурин в течение 7 дней после длительной интоксикации, морфологическая картина характеризуется уменьшением объёма и плотности расположения нейронов, вздутием и округлением клеточных тел чёрной субстанции. У клеток нарушена полигональная форма, не наблюдается чёткого разграничения групп клеток (рис. 2 К-М). Контуры клеток неправильные, нечёткие, есть участки, где клеточная оболочка неразличима, не просматривается граница между телом и отростками, а также между ядром и цитоплазмой (рис. 2 Л, М). Местами в цитоплазме происходит растворение хроматофильного вещества, из-за чего она принимает более светлую окраску. У некоторых гипертрофированных шарообразных клеток отсутствуют отростки, наблюдается сильно выраженный хроматолиз. В этих клетках осадок фосфата свинца расположен под клеточной мембраной в виде кольца (рис. 2 Л). Из-за негативной фосфатазной активности ядра клеток не демонстрируются. Встречаются также клетки с центральным хроматолизом с интенсивно окрашенными ядрами, которые перемещаются к периферии. В межклеточном пространстве, на фоне сохранившихся и частично поражённых нейронов чёрной субстанции, обнаруживаются ядра глиальных клеток (рис. 2 Л, М). Как известно, глия играет большую роль в обменных процессах и является некоторым образом посредником между сосудами и нервными клетками, а также является системой специфической поддержки. Имеет место очевидное улучшение васкуляризации, нейроны с интенсивно окрашенными ядрами контактируют с микрососудами (рис. 2 К).

В целом, прием таурина после кратковременной алкоголизации приводит к восстановлению морфологической картины черной субстанции – демонстрируется регенерация клеток, форма и размеры клеток приближаются к норме, проявляются контуры, наблюдается увеличение плотности расположения клеток. При приёме таурина после средней и длительной алкоголизации в черной субстанции также отмечаются положительные изменения структурных свойств клеток по сравнению с поражёнными в результате токсичного влияния этанола нейронами. Однако полной картины восстановления морфологической картины нервных клеток не отмечается. Возможно, это связано с тем, что длительная алкоголизация 15% раствором этанола приводит к гибели нейронов черной субстанции и депигментации, а также к резким морфологическим изменениям внутриклеточных структур, свидетельствующим о грубых метаболических нарушениях. И такое кратковременное применение таурина не приводит к полному восстановлению структурных свойств нейронов черной субстанции, хотя к этому есть предпосылки. Таким образом, проведённые нами исследования по применению таурина после алкоголизации 15% раствором этанола показали, что если учитывать недлительную силу патологического воздействия, то в благоприятных условиях при своевременном и энергичном лечении значительная часть клеточных

изменений в черной субстанции является обратимой в достаточно короткий период времени.

Поступила 11.07.19

Տաուրինի ազդեցությունը էթանոլային թունավորման ենթարկված առնետների և նյութի բջջային կառույցների վրա

Վ.Պ. Խաչատրյան

Հայտնաբերվել է, որ էթանոլի 15 %-անոց լուծույթը հանգեցնում է ևս նյութի բջջային դեպիգմենտացիայի, արտահայտված դեգեներացիայի և մահվան: Վերջինս արագ հանգեցնում է ներբջջային կառույցների մորֆոլոգիական բացասական փոփոխությունների, առաջացնում է արտահայտված ներբջջային մետաբոլիկ բնույթի խանգարումներ: Ստացված կենդանական մոդելներին տաուրինի ներարկումները հանգեցնում են ևս նյութում նյարդաբջջային վերականգնման: Կատարված հետազոտությունները վկայում են նյարդաբջջային ներբջջային կառույցների մորֆոլոգիական ռեգեներացիայի մասին: Բարենպաստ պայմաններում տաուրինի սահմանված չափաքանակներով պարբերական և ժամանակի ներարկումները արագ և արդյունավետ վերականգնում են նյարդաբջջային ներբջջային կառույցները:

The Effect of Taurine on the Cellular Structures of the Substantia Nigra of Rats Subjected to Ethanol Intoxication

V.P. Khachatryan

It has been established that alcoholization with a 15% ethanol solution leads to the death of neurons of the substantia nigra and depigmentation, to drastic morphological changes in intracellular structures indicating gross metabolic disturbances. In animals with the introduction of taurine, cell regeneration is demonstrated, there is a tendency to restore the morphological picture in the substantia nigra. In favourable conditions with timely and complex treatment, a significant part of cellular changes in the substantia nigra is reversible in a relatively short period of time.

Литература

1. *Зиматкин С.М., Пронько С.П., Бубен А.Л., Лиопо А.В.* Мат. международного симпозиума «Современные аспекты изучения алкогольной и наркотической зависимости». Гродно, 2004, с. 48-53.
2. *Меликсетян И.Б.* Выявление активности Ca^{+2} -зависимой кислой фосфатазы в клеточных структурах мозга крыс. Морфология. СПб., 2007, т. 131, 2, с. 77-80.
3. *Нефёдов Л.И.* Таурин (биохимия, фармакология и медицинское применение). НАН Б., Гродно, 1999.
4. *Разводовский Ю.Е.* Медико-социальные аспекты алкоголизма. Гродно, 2005.
5. *Collins M.A., Corso T.D., Neafsey E.J.* Neuronal degeneration in rat cerebrocortical and olfactory regions during subchronic "binge" intoxication with ethanol: possible explanation for olfactory deficits in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* , 1996, v. 20, № 2, p.284-292.
6. *Diana M., Peana A.T., Sirca D., Lintas A., Melis M., Enrico P.* Crucial role of acetaldehyde in alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *Ann N Y Acad Sci.*, 2008, v. 1139, p.307-317.
7. *Fadda F., Rossetti Z.L.* Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 1998, v. 56, №4, p. 385–431.
8. *Grant K.A., Woolfverton W.L.* Reinforcing and discriminantive stimulus effects of Ca-acetyl homotaurine in animals. *Pharmacol. Biochem. and Behav.*, 1989, v.32, p. 607-611.
9. *Schlapfer T.E.* Alcohol and the brain--morphological and functional brain changes. *The Umsch.*, 2000, v. 57, № 4, p. 191-195.
10. *Watanabe A., Hobara N., Nagashima H.* Lowering of liver acetaldehyde but not ethanol concentrations by pretreatment with taurine in ethanol-loaded rats. *Experientia*, 1985, v. 41, № 11, p. 1421-1422.