

УДК 612.44.018:616.893-053.8-092.9

Динамическое морфогистохимическое исследование нервных структур миндалевидного тела крыс при воздействии различных доз этанола

**А. А. Саваян¹, М.А. Даниелян¹, Н.Н. Мелконян¹,
О.А. Назарян¹, И.К. Саакян², Н.В. Тумасян², С.С. Абрамян²**

¹*Институт физиологии им. Л.А.Орбели НАН РА*

²*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА
0028, Ереван, ул.Бр.Орбели, 22*

Ключевые слова: этанольная интоксикация, гистохимия, миндалевидное тело

Алкоголь – токсическое и вызывающее зависимость вещество, злоупотребление которым является актуальной проблемой современного общества. Благодаря работам многих исследователей, проведенных на животных и людях, был обнаружен широкий диапазон влияния алкоголя на организм [7,12]. Он может вызывать поражение большинства органов, приводя к развитию более 60 различных болезней, в том числе и алкоголизма, повысив смертность населения [1]. В настоящее время потребление спиртных напитков является третьей ведущей причиной нарушения здоровья в Европе [13]. Известно, что мозг особо чувствителен к токсическому действию алкоголя, который оказывает значительное влияние на строение, метаболизм и функции ЦНС [13]. Исследования показали, что отдельные структуры мозга, в частности холинергические ядра переднего мозга, мезокортиколимбическая дофаминергическая система, голубое пятно и *raphe nuclei*, обладают избирательной чувствительностью к хронической этанольной интоксикации [3,5]. Однако современное представление морфологии нейронов, являющееся ключевым для выяснения механизма и морфологических признаков алкогольной аддикции, затруднено тем, что не решен ряд задач: остаются неразрешенными вопросы степени повреждения и пределы возможной обратимости изменений ряда мозговых структур в этих условиях.

Целью настоящего исследования является изучение морфогистохимических изменений нейронов миндалевидного тела у крыс в динамике при интоксикации различными дозами этанола.

Материал и методы

Белые половозрелые крысы-самки Альбино ($n=12$) массой 250 ± 50 г составили 3 группы, которые в качестве единственного источника жидкости получали 5%, 10% и 15% растворы этанола. Животные были подразделены на подгруппы в зависимости от срока приема алкоголя – от 3 дней до 6 месяцев.

С целью морфогистохимических исследований нервных структур миндалевидного тела нами был применен метод выявления активности Ca^{+2} -зависимой кислой фосфатазы [2], разработанный на базе метода Гомори. Данный методический подход основан на выявлении внутриклеточных фосфорсодержащих соединений, занимающих ключевые позиции в обменных энергетических процессах, направленных на сохранение и самовоспроизведение витальных систем.

Результаты и обсуждение

Миндалевидное тело (*amygdala*) – подкорковая структура лимбической системы, расположенная в глубине височной доли мозга (рис. 1 а). Нейроны миндалин разнообразны по форме, функциям и нейрохимическим процессам в них. На основании цитологических особенностей миндалевидное тело можно разделить на несколько ядер, среди которых ключевыми являются базально-латеральный комплекс, центральные и корково-медиальные ядра. Центральное ядро подразделяют на медиальную (крупноклеточную) и латеральную (микроклеточную) области. Наибольшей активностью фермента обладают крупные нейроны базального ядра. Форма клеток круглая овальная полигональная с маленькими ядрами, содержащими одно ядрышко. Часть цитоплазмы заполнена гранулами осадка другая часть окрашена гомогенно и выглядит светлее (рис. 1 А). Встречаются нейроны с низкой активностью кислой фосфатазы (КФ). В целом в миндалинах не наблюдается однотипного окрашивания нейронов. Предполагается, что темные и светлые нейроны представляют собой две различные функциональные стадии жизнедеятельности нейросекреторных клеток амигдалы. Темные нейросекреторные клетки отражают период создания (путем активизации процессов транскрипции и трансляции) и «упаковки» секрета, светлые – его транспортировку и дальнейшую эвакуацию из клетки. Исходя из этого, темные и светлые клетки миндалевидного тела мозга можно рассматривать как нейросекреторные клетки, которые могут быть частью гипоталамо-гипофизарной системы.

Воздействие 5% раствора этанола в ранние сроки привело к гипертрофии нейронов миндалевидного тела (рис. 1 Б). Отростки настолько утолщены, что порой невозможно определить границу сомы и отростков. Увеличенные ядра нейронов интенсивно окрашены (рис. 1 Б). Ядерная

локализация КФ предполагает динамическую реорганизацию, однако ферментативная активность цитоплазмы несколько снижена. Отмечается большое количество синапсов на мембранной поверхности тел и отростков нейронов, что, возможно, указывает на повышение деятельности клеток миндалевидного тела (рис. 1 Б).

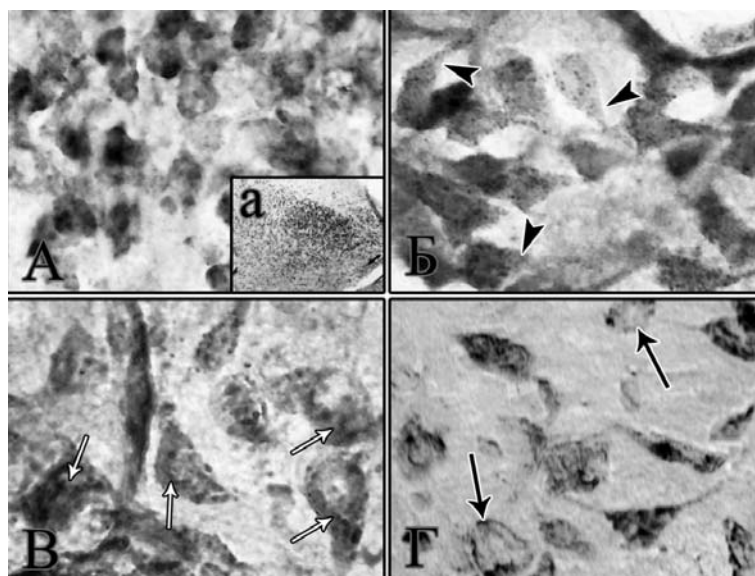


Рис. 1. Микрофотографии нейронов миндалевидного тела крыс при хронической алкоголизации 5% раствором этанола: А, а – норма; Б, В, Г – под воздействием 5% этанола; Б – ранние сроки алкоголизации; В – средние сроки алкоголизации; Г – поздние сроки алкоголизации; белые стрелки – эктопированные ядра; черные стрелки – клетки “тени”; головка стрелки – утолщенные аксоны.

Увеличение: 100 (а); 1000 (А-Г)

Под влиянием малых доз этанола в течение 6-9 недель кроме вышеописанных изменений начинаются процессы центрального хроматолиза (рис. 1 В). В цитоплазме нейронов амигдалы выявляется мелкая грануляция. Набухшие ядра постепенно эктопируются. Клеточная мембрана богато усеяна гранулами, которые в отростках расположены в один ряд.

Шестимесячное употребление 5% раствора этанола привело к глубоким дегенеративным процессам в нейронах миндалевидного тела. Основными признаками изменения большинства нервных клеток амигдалы являются сильное набухание клеток, тотальный лизис гранул с гомогенизацией и просветлением цитоплазмы, а нередко и сморщивание ядра (рис. 1 Г). Часть клеток подвергается кариоцитолиту и находится в состоянии тяжелых изменений. Отдельные нейроны сморщиваются, уменьшаясь в размере и приобретая вытянутую форму. Отростки истончаются, укорачиваются. Верхушечный и боковые дендриты у многих нейронов исчезают.

Таким образом, динамическое морфогистохимическое наблюдение

нейронов миндалевидного тела при увеличении срока воздействия 5% раствора этанола показало прогрессирование дегенеративных изменений в клетках, вплоть до кариоцитолита.

Трехдневное использование 10% раствора этанола привело к резкому уменьшению плотности расположения нейронов амигдалы (рис. 2 А). Форма и размеры клеток варьируют, а их контуры незначительно расплывчатые. Активность КФ сохранена в отростках, повышена в ядрах, выражена умеренно в цитоплазме (рис. 2 А).

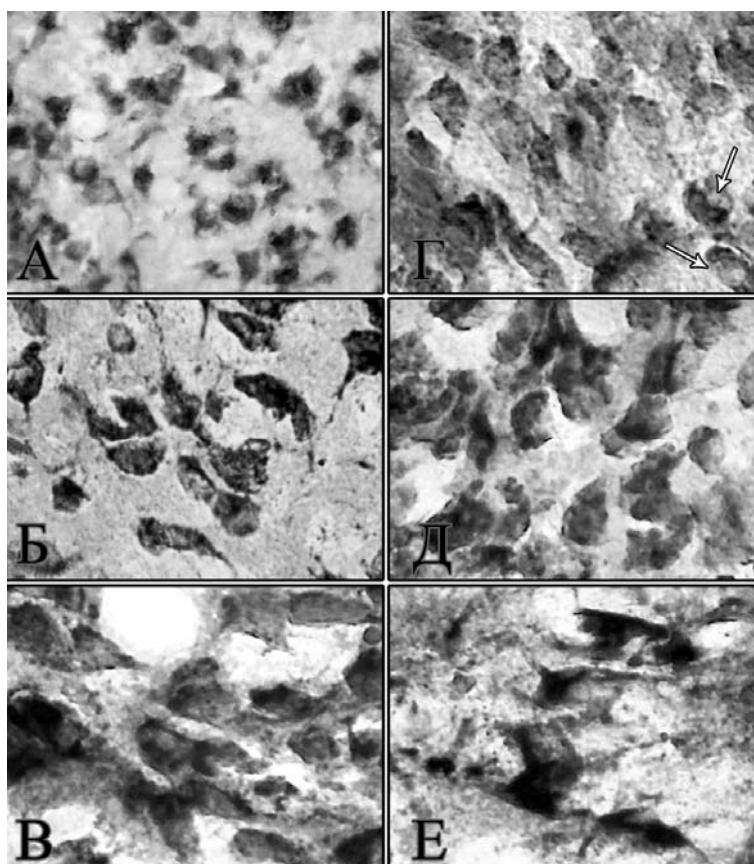


Рис. 2. Микрофотографии нейронов миндалевидного тела крыс при хронической алкоголизации 10% и 15% растворами этанола. А Б, В – под воздействием 10% этанола; Г, Д, Е – под воздействием 15% этанола; А, Г – ранние сроки алкоголизации; Б, Д – средние сроки алкоголизации; В, Е – поздние сроки алкоголизации; белые стрелки – эктопированные ядра. Увеличение: 400 (А); 1000 (Б-Е)

При средних сроках (от 3 до 6 недель) воздействия 10% раствора этанола клеточная оболочка нейронов амигдалы вытянутой формы обладает интенсивно окрашенными контурами. Ферментная активность повышена в перикарионе, ядра большинства нейронов набухшие и эктопированы.

Хорошо прослеживается ход отростков, в которых видны точечные грануляции (рис. 2 Б).

Применение 10% раствора этанола в течение пяти месяцев приводит к гипертрофии клеточного тела нейронов, а также к преимущественному набуханию верхушечного отростка. Наблюдается тенденция к слиянию клеток с нарушением целостности контуров. Ядра нейронов продолжают оставаться набухшими. Четко отличаются ядрышки внутри более светлого ядра. Фосфатазная активность резко усилена в сгруппировавшихся клетках (рис. 2 В).

Таким образом, этанольная интоксикация 10% раствором вызывает неспецифические изменения в нейронах миндалевидного тела в виде острого набухания, что является обратимым клеточным изменением.

Изменения нейронов амигдалы в ранние сроки алкоголизации 15% раствором этанола по сравнению с нормой проявляются в незначительном набухании и округлении клеточного тела. Морфологическая картина характеризуется постепенным растворением гранул, начиная с центральных участков клетки, что придает цитоплазме более светлую окраску (рис. 2 Г). Фосфатазная активность ядер умеренно снижена. Они имеют преимущественно периферическое расположение. Ядрышко также нередко принимает эксцентричное положение. Обычно такие явления характерны для первичного раздражения нервных клеток.

Под воздействием 15% раствора этанола в течение двух месяцев в нейронах миндалевидного тела наблюдается резкое усиление активности КФ как в цитоплазме, так и в ядрах (рис. 2 Д). У всех нейронов четко выступает увеличенное темное ядрышко. Отростки не реагируют, в some отмечается разреженный гранулярный осадок, более плотно расположенный по периферии нейрона. Отмечается факт тесного сближения нейронов, причем часто наблюдается картина как бы слившихся клеток (рис. 2 Д).

Применение в течение четырех месяцев вышеотмеченной дозы этанола вызвало грубые нарушения амигдалы, затронувшие основные элементы нервных клеток. Контуров нейронов стали неправильными, нечеткими. Цитоплазма трудно прослеживается, так как подвергается постепенному расплавлению. Деформированные ядра неправильной формы становятся почти или совершенно неразличимыми от ядрышек (рис. 2 Е). Фосфатазная активность резко усиливается, что указывает на активацию процессов ядерного метаболизма, видимо в целях сохранения жизнедеятельности клетки.

Таким образом, анализ полученных данных дает основание предположить, что длительное воздействие 15% раствора этанола приводит к тяжелым изменениям нервных клеток миндалевидного тела, что характерно также для гипоксических состояний и острых интоксикаций.

По литературным данным, алкогольдегидрогеназа неравномерно распределена в ЦНС. В большинстве регионов мозга она отсутствует.

Однако в гиппокампе, мозжечке и коре мозга показано ее существование, что является причиной местной аккумуляции ацетальдегида после употребления алкоголя [9].

Такие области мозга, как прилежащее ядро, дорзальное полосатое тело и префронтальная кора, находящиеся под влиянием мезокортиколимбической допаминергической системы, представляют особый интерес для изучения нейрорадаптивных изменений на начальных этапах употребления алкоголя и пьянства. Эта система вовлечена в зарождение алкогольной и наркотической зависимости [4, 6, 10] и является важнейшим компонентом в данном процессе [11]. Большинство наркотиков, включая алкоголь, повышают активность вышеотмеченной системы, приводя к усилению высвобождения допамина в терминальных отделах [14]. По результатам исследований Lebedev A. et al. [8], анализ морфофункциональных изменений структур мезокортиколимбической системы у крыс, находящихся под длительным воздействием этаноловой интоксикации (5 мес.), показал, что алкоголизация снижает объем и специфическую плотность нейронов черной субстанции и вентральной области покрышки.

В наших исследованиях в вышеотмеченные сроки алкогольного отравления были обнаружены грубые нарушения структуры основных элементов клеток миндалевидного тела как при низких, так и при высоких дозах этанола.

Поступила 26.02.14

Առնետների ուղեղի նշան համալիրի նեյրոնների դինամիկ մորֆոհիստոքիմիական ուսումնասիրությունը էթանոլի տարբեր չափաբաժինների ազդեցության պայմաններում

**Ա.Ա. Սավայան, Մ.Ա. Դանիելյան, Ն.Ն. Մելքոնյան, Օ.Հ. Նազարյան,
Ի.Կ. Սահակյան, Ն.Վ. Թումասյան, Ս.Ս. Աբրահամյան**

Ուսումնասիրվել են առնետների նշան համալիրի նեյրոնների մորֆոհիստոքիմիական փոփոխությունները դինամիկայում՝ էթանոլի տարբեր չափաբաժիններով թունավորման պայմաններում:

Նշան համալիրի նեյրոնների մորֆոհիստոքիմիական ուսումնասիրությունները վկայում են, որ 5% էթանոլի ազդեցության ժամկետների ավելացման պայմաններում բջիջներում զարգանում են դեգեներատիվ փոփոխություններ՝ ընդհուպ մինչև կարիոցիտոլիզ:

10% էթանոլի լուծույթի ազդեցության արդյունքում նշան համալիրի նեյրոններում առաջանում են ոչ սպեցիֆիկ փոփոխու-

թյուններ սուր այտուցի ձևով, որը համարվում է դարձելի բջջային փոփոխություն: 15% էթանոլի լուծույթի երկարատև կիրառումը հանգեցնում է նեյրոնների ծանր փոփոխությունների, ինչը նաև բնորոշ է թթվաճնային քաղցի վիճակներին և սուր թունավորմանը:

Dynamic morphohistochemical study of the amygdaloid neuronal structures in the rats exposed to various doses of ethanol

**A. A. Savayan, M.A. Danielyan, N.N. Melkonyan, O.H. Nazaryan,
I.K. Sahakyan, N.V. Tumasyan, S.S. Abrahamyan**

The aim of the present research was to study the dynamic morphohistochemical changes of the neuronal structures of the amygdaloid complex in rats under intoxication with various concentrations of ethanol.

Morphohistochemical study of the neuronal structures of the amygdaloid complex has demonstrated that the degenerative changes grow progressively in the neurons, up to the karyolysis, when the exposure period to 5% ethanol solution is increased.

Ethanol intoxication with 10% solution causes nonspecific changes in neurons in the form of acute hypertrophy, which is considered a reversible cellular change. Prolonged exposure of rats to the 15% ethanol solution leads to severe changes in neurons, which is also typical to hypoxic states and to acute intoxication.

Литература

1. Зиматкин С. М., Оганесян Н. А., Киселевский Ю. В. Ацетатзависимые механизмы толерантности к этанолу. Гродн. гос. мед. ун-т, 2010.
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. Chen J.C., Lin C.C., Ng C.C., Chiu T.F., Shyr M.H. Uneven distribution of ethanol in rat brain following acute administration, with the highest level in the striatum. J Stud Alcohol Drugs, 2007, Vol.68, 5, p.649-653.
4. Di Chiara G., Bassareo V., Fenu S., De Luca M.A., et al. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. Neuropharmacology, 2004, Vol.47, Suppl 1, p.227-241.
5. 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, Vol.1139, p.307-317.
6. Droblenkov A.V., Karelina N.P., Shabanov P.D. Diagnostics of alcoholic intoxication from micromorphological changes in neurons and neuroglia of the mesoaccumbocingular dopaminergic system in experiment. Sud. Med. Ekspert, 2009, Vol.52, 6, p.25-28.
7. Kinoshita H., Nishiguchi M., Kasuda S., An autopsy case of poisoning with ethanol and psychotropic drugs. Soud. Lek., 2008, Vol.53, 2, p.16-17.
8. Lebedev A.A., Droblenkov A.V., Shabanov P.D. Structural changes in mesocorticolimbic dopaminergic system of the brain during long-term alcoholization in rats. Bull. Exp. Biol. Med., 2008, Vol.146, 6, p.816-819.

9. *Martínez S.E., Vaglenova J., Sabrià J., Martínez M.C., Farrés J., Parés X.* Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 2001, Vol.268, 19, p.5045-5056.
10. *Perra S., Pillolla G., Luchicchi A., Pistis M.* Alcohol inhibits spontaneous activity of basolateral amygdala projection neurons in the rat: involvement of the endocannabinoid system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2008, Vol.32, 3, p.443-449.
11. *Pierce R.C., Kumaresan V.* The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2006, Vol.30, 2, p.215-238.
12. *Sullivan E.V., Pfefferbaum A.* Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, Vol.180, 4, p.583-594.
13. *Thomson A.D., Guerrini I., Bell D., Drummond C.* Alcohol-related brain damage: report from a Medical Council on Alcohol Symposium. *Alcohol*, 2012, Vol.47, 2, p. 84-91.
14. *Yim H.J., Gonzales R.A.* Ethanol-induced increases in dopamine extracellular concentration in rat nucleus accumbens are accounted for by increased release and not uptake inhibition. *Alcohol*, 2000, Vol.22, 2, p.107-115.