

**А. В. Смирнов^{1,3}, И. Н. Тюренков², А. А. Замлелов¹,
А. В. Синельщикова¹, В. В. Багметова², Н. С. Ганзикова², И. В. Малюженко²**

¹ Кафедра патологической анатомии ВолгГМУ,

² кафедра фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ;

³ Волгоградский медицинский научный центр

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЗОНАХ СА1 И СА3 ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ ПРИНУДИТЕЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ СОЕДИНЕНИЯМИ СУКЦИКАРД И ЦИТРОКАРД

УДК 616-091.8

Проведен количественный анализ патоморфологических изменений в пирамидном слое зон СА1 и СА3 гиппокампа крыс при принудительной хронической алкоголизации и фармакологической коррекции соединениями сукцикард и цитрокард. У животных, получающих исследуемые соединения, были выявлены признаки обратного развития компенсаторно-приспособительных и нейродегенеративных процессов в пирамидном слое зон СА1 и СА3 гиппокампа, отмечен выраженный нейропротективный эффект с разной степенью выраженности соединений и преобладанием эффективности цитрокарда, по данным морфометрического исследования, что, в свою очередь, подчеркивает значимость исследования препаратов естественных метаболитов нервной системы и их аналогов.

Ключевые слова: алкоголь, крыса, гиппокамп, повреждение, реактивность, алкогольная интоксикация, сукцикард, цитрокард.

**A. V. Smirnov, I. N. Tyurenkov, A. A. Zamlelov,
A. V. Sinelshchikova, V. V. Bagmetova, N. S. Ganzikova, I. V. Malyuschenko**

MORPHOLOGICAL CHANGES IN AREAS CA1 AND CA3 OF THE HIPPOCAMPUS OF RATS DURING THE FORCED CHRONIC ALCOHOL ABUSE AND PHARMACOLOGICAL CORRECTION COMPOUNDS SUCCICARD AND CYTROCARD

Conducted quantitative analysis of pathological changes in the pyramidal layer of area CA1 and CA3 of the hippocampus of rats during the forced chronic alcohol abuse and pharmacological correction compounds Succicard and Cytrocard. In animals receiving test compound showed signs of reverse development of compensatory-adaptive and neurodegenerative processes in the pyramidal layer of the CA1 and CA3 areas of the hippocampus, there was marked neuroprotective effect with different degree of connections and the predominance of efficiency Cytrocard according to morphometric studies, which in turn stresses the significance of the study of drugs of natural metabolites of the nervous system and their analogs.

Key words: alcohol, rat, hippocampus, damage, reactivity, alcohol intoxication, succicard, cytrocard.

Изучение клеточных и молекулярных механизмов алкоголь-индуцированного повреждения головного мозга имеет значительный интерес с позиции понимания сущности нейродегенеративных изменений [5]. Известно, что алкогольная интоксикация вызывает активацию компенсаторно-приспособительных процессов в головном мозге с преобладанием атрофии [10]. Патогенез алкогольного поражения включает в себя основные механизмы повреждения головного мозга, такие как эксцитотоксичность, оксидативный стресс, нейровоспаление, активация апоптоза [1, 7, 11]. Таким образом, особенности метаболических нарушений в головном мозге при алкогольной интоксикации влекут за собой сосредоточенное внимание ученых с

целью разработки препаратов, направленных на коррекцию последствий алкоголизации [9]. Среди патогенетических средств, направленных на коррекцию нейродегенеративных изменений, особое внимание привлекают естественные метаболиты нервной системы и их аналоги [2, 3, 12], к таким представителям относятся соединения сукцикард [6] и цитрокард [4]

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

С помощью морфометрических методик исследовать структурные изменения в зонах СА1 и СА3 пирамидного слоя гиппокампа крыс при моделировании экспериментальной хронической алкоголизации и фармакологической коррекции соединениями сукцикард и цитрокард.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на белых лабораторных крысах самцах 6-месячного возраста исходной массы 220–240 г, группы контроля ($n = 10$) и экспериментальной группы ($n = 10$). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», были учтены требования комиссии Российского национального комитета по биоэтике при Российской академии наук. Хронический алкоголизм моделировался на крысах путем замены питьевой воды 5%-м этиловым спиртом, подслащенным сахарозой (5 г сахара на 100 мл 5%-го раствора этанола) в течение 20 недель. По истечении 20-недельного срока крысы выводились из эксперимента. Декапитацию проводили гильотинным методом, фиксировали образцы головного мозга в 10 %-м забуференном формалине. По стандартной методике изготавливали парафиновые блоки и срезы толщиной 5–7 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, толуидиновым синим по методу Ниссля. Проводили качественный и количественный анализ пирамидного слоя гиппокампа. Исследование микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа «Axio Lab. A1», фотодокументирование осуществляли камерой «AxioCam 105 color». Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ Excell и Statistica 6,0. Данные представляли в виде медианы с указанием интерквартильного интервала. Различия между группами оценивали по критерию Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса и считали статистически

значимыми при $p < 0,05$. Для проведения количественного анализа гистологических препаратов использовались морфометрические методы, с помощью которых были описаны планиметрические свойства нейронов и их структур. Среди планиметрических свойств нейронов определялись абсолютные показатели нейронов, такие как площадь перикарионов, площадь ядер нейронов, площадь цитоплазмы нейронов выполнены измерения толщины пирамидного слоя гиппокампа. На основании полученных абсолютных показателей нейронов рассчитан относительный показатель – медиана относительной плотности нейропиля в пирамидном слое и определены медианы ядерно-цитоплазматического отношения нейронов гиппокампа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При морфометрической оценке абсолютных показателей пирамидного слоя в зоне CA1 выявлено (табл. 1), что площадь перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» меньше по сравнению с группой «Цитрокард» на 22,98 %. В группе «Сукцикард» площадь перикарионов составила Me 88,38 [77,96; 102,28] мкм², данное значение на 18,3 % больше, чем в группе алкоголя, и на 7,57 % меньше, чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» площадь перикарионов составила Me 114,76 [102,73; 126,27] мкм², данное значение на 37,14 % больше, чем в группе алкоголя, и на 16,67 % больше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

Таблица 1

Изменения морфометрических показателей гиппокампа в зоне CA1

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Итоги измерения и вычисления морфометрических показателей			
		Интактная группа	Алкоголизируванная группа	Группа «Сукцикард»	Группа «Цитрокард»
CA1	Медиана площади перикарионов, мкм ²	Kruskal-Wallis test: $H(3, N = 848) = 341,3013$ $p = 0,000$			
		95,62 [72,81; 110,19]	72,13 *** [61,61; 82,86]	88,38 [77,96; 102,28]	114,76 [102,73; 126,27]
	Медиана площади ядер, мкм ²	Kruskal-Wallis test: $H(3, N = 848) = 397,4102$ $p = 0,000$			
		67,59 [50,43; 79,01]	46,72 *** [40,44; 55,05]	65,44 [57,32; 77,18]	86,6 [78,62; 96,19]
	Медиана площади цитоплазмы перикарионов, мкм ²	Kruskal-Wallis test: $H(3, N = 947) = 72,62015$ $p = 0,000$			
		28,91 [22,65; 36,16]	25,01 ** [21,69; 30,95]	22,87 [18,80; 27,22]	26,94 [21,19; 32,66]
	Медиана ядерно-цитоплазматического отношения нейронов гиппокампа, число	Kruskal-Wallis test: $H(3, N = 947) = 390,0475$ $p = 0,000$			
	2,45 [2,01; 2,87]	1,79 *** [1,53; 2,09]	2,9 [2,53; 3,44]	3,2 [2,65; 3,93]	
Медиана толщины пирамидного слоя, мкм	Kruskal-Wallis test: $H(3, N = 2112) = 235,5526$ $p = 0,000$				
	32,3 [27,9; 38,3]	22,9 *** [19,4; 28,8]	26,64 [21,25; 32,33]	31,61 [25,48; 38,14]	
Медиана относительной плотности нейропиля, %	Kruskal-Wallis test: $H(3, N = 126) = 18,05835$ $p = 0,004$				
	29,87 [25; 32,62]	38,89 ** [30,37; 46,8]	27,94 [23,29; 31,64]	30,69 [26,3; 36,94]	

* Различия между группами (интакт – алкоголь) статистически значимы (критерий Манна–Уитни).

Площадь ядер нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» меньше по сравнению с группой «Цитрокард» на 24,4 %. В группе «Сукцикард» площадь ядер нейронов составила $Me\ 65,44$ [57,32; 77,18] μm^2 , данное значение на 28,6 % больше, чем в группе алкоголя, и на 3,18 % меньше, чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» площадь перикарионов составила $Me\ 86,6$ [78,62; 69,19] μm^2 , данное значение на 46,05 % больше, чем в группе алкоголя, и на 21,95 % больше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

Площадь цитоплазмы нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» меньше по сравнению с группой «Цитрокард» на 15,1 %. В группе «Сукцикард» площадь перикарионов составила $Me\ 22,87$ [18,80; 27,22] μm^2 , данное значение на 8,55 % меньше, чем в группе алкоголя, и на 20,89 % меньше, чем в группе интакта, в группе «Цитрокард» площадь перикарионов составила $Me\ 26,94$ [21,19; 32,66] μm^2 , данное значение на 7,16 % больше, чем в группе алкоголя, и на 6,81 % меньше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» меньше по сравнению с группой «Цитрокард» на 9,37 %. В группе «Сукцикард» ЯЦО нейронов составила $Me\ 2,9$ [2,53; 3,44] μm^2 , данное значение на 38,27 % больше, чем в группе алкоголя, и на 15,51 % больше,

чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» ЯЦО нейронов составила $Me\ 3,2$ [2,65; 3,93] μm^2 , данное значение на 44,06 % больше, чем в группе алкоголя, и на 23,4 % больше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

Толщина пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» меньше по сравнению с группой «Цитрокард» на 15,72 %. В группе «Сукцикард» толщина пирамидного слоя составила $Me\ 26,64$ [21,25; 32,33] μm^2 , данное значение на 14,03 % больше, чем в группе алкоголя, и на 17,52 % меньше, чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» толщина пирамидного слоя составила $Me\ 31,61$ [25,48; 38,14] μm^2 , данное значение на 27,55 % больше, чем в группе алкоголя, и на 2,13 % меньше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

Относительная плотность нейропилия пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» меньше по сравнению с группой «Цитрокард» на 8,96 %. В группе «Сукцикард» плотность нейропилия составила $Me\ 27,94$ [23,29; 31,64] μm^2 , данное значение на 28,15 % меньше, чем в группе алкоголя, и на 6,46 % меньше, чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» плотность нейропилия составила $Me\ 30,69$ [26,3; 36,94] μm^2 , данное значение на 21,08 % меньше, чем в группе алкоголя, и на 2,67 % больше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

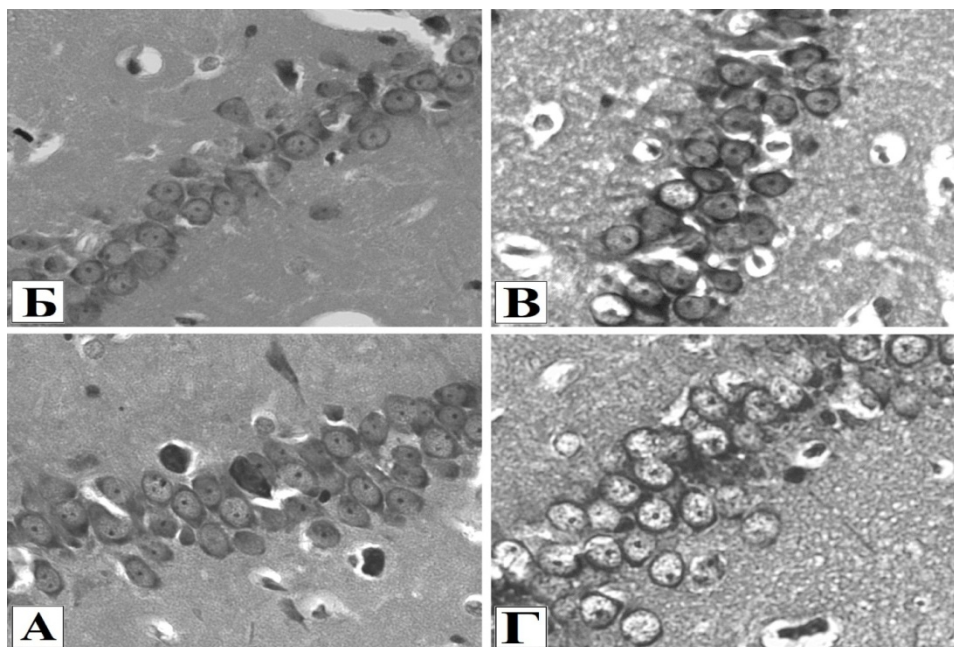


Рис. 1. Ув. $\times 40$. Гистологическое строение гиппокампа (зона CA1) у интактных животных (А), гиперхромность ядер и цитоплазмы нейронов более выражена в сравнении с интактной группой, уменьшение размеров перикарионов нейронов, уменьшение толщины пирамидного слоя до 1–2 нейронов в зоне CA1 у алкоголизованных животных (Б), увеличение толщины пирамидного слоя до 3–4 нейронов, определяется многоклеточность пирамидного слоя, увеличение размеров перикарионов и ядер нейронов, увеличение количества светлых ядер, наиболее выраженная васкуляризация краевого и радиального слоев гиппокампа у группы «Сукцикард» (В) и «Цитрокард» (Г)

При морфометрической оценке абсолютных показателей пирамидного слоя в зоне СА3 выявлено, что площадь перикарионов нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» больше по сравнению с группой «Цитрокард» на 3,26 % (табл. 2). В группе «Сукцикард» площадь перикарионов составила Me 132,77 [122,15; 145,59] μm^2 , данное значение на

23,53 % больше, чем в группе алкоголя, и на 20,17 % больше, чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» площадь перикарионов составила Me 128,44 [115,86; 147,69] μm^2 , данное значение на 20,95 % больше, чем в группе алкоголя, и на 20,2 % больше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

Таблица 2

Изменения морфометрических показателей гиппокампа в зоне СА3

Зона гиппокампа	Морфометрические показатели	Итоги измерения и вычисления морфометрических показателей			
		Интактная группа	Алкоголизирующая группа	Группа «Сукцикард»	Группа «Цитрокард»
СА3	Медиана площади перикарионов, μm^2	Kruskal-Wallis test: $H(3, N=389) = 93,86345$ $p = 0,000$			
		102,49 [95,47; 112,52]	101,52 [88,05; 120,87]	132,77 [122,15; 145,59]	128,44 [115,86; 147,69]
	Медиана площади ядер, μm^2	Kruskal-Wallis test: $H(3, N=452) = 171,2730$ $p = 0,000$			
		67,23 [62,09; 76,31]	63,39* [54,48; 76,29]	93 [81,90; 103,51]	94,81 [85,06; 106,75]
	Медиана площади цитоплазмы перикарионов, μm^2	Kruskal-Wallis test: $H(3, N=544) = 84,06739$ $p = 0,000$			
		30,31 [26,14; 37,03]	42,16*** [33,83; 51,35]	39,11 [34,37; 45,64]	32,6 [27; 43,57]
	Медиана ядерно-цитоплазматического отношения нейронов гиппокампа, число	Kruskal-Wallis test: $H(3, N=544) = 216,0157$ $p = 0,000$			
	2,14 [1,77; 2,52]	1,6*** [1,33; 1,91]	2,32 [1,95; 2,66]	2,82 [2,34; 3,41]	
Медиана толщины пирамидного слоя, μm	Kruskal-Wallis test: $H(3, N=1012) = 133,4284$ $p = 0,000$				
	37,3 [32,3; 42,4]	31,4*** [26,3; 36,9]	25,36 [19,1; 32,32]	27,62 [19,12; 35,12]	
Медиана относительной плотности нейропиля, %	Kruskal-Wallis test: $H(3, N=93) = 10,76171$ $p = 0,131$				
	33,12 [26,9; 38,44]	36,09 [63,68; 31,21]	31,64 [23,7; 45,42]	41,16 [36,43; 46,15]	

* Различия между группами (интакт – алкоголь) статистически значимы (критерий Манна–Уитни).

Площадь ядер нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» меньше по сравнению с группой «Цитрокард» на 1,9 %. В группе «Сукцикард» площадь ядер нейронов составила Me 93 [81,90; 103,51] μm^2 , данное значение на 31,83 % больше, чем в группе алкоголя, и на 27,7 % больше, чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» площадь ядер нейронов составила Me 94,81 [85,06; 106,75] μm^2 , данное значение на 33,13 % больше, чем в группе алкоголя, и на 29,08 % больше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

Площадь цитоплазмы нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» больше по сравнению с группой «Цитрокард» на 16,64 %. В группе «Сукцикард» площадь цитоплазмы перикарионов составила Me 39,11 [34,37; 45,64] μm^2 , данное значение на 7,23 % меньше, чем в группе алкоголя, и на 22,5 %

больше, чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» площадь цитоплазмы перикарионов составила Me 32,6 [27; 43,57] μm^2 , данное значение на 22,67 % меньше, чем в группе алкоголя, и на 7,02 % больше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) нейронов пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» меньше по сравнению с группой «Цитрокард» на 17,73 %. В группе «Сукцикард» ЯЦО нейронов составила Me 2,32 [1,95; 2,66] μm^2 , данное значение на 31,03 % больше, чем в группе алкоголя, и на 7,75 % больше, чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» ЯЦО нейронов составила Me 2,82 [2,34; 3,41] μm^2 , данное значение на 43,26 % больше, чем в группе алкоголя, и на 24,11 % больше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

Толщина пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» меньше по сравнению с группой «Цитрокард» на 8,18 %. В группе «Сукцикард» толщина пирамидного слоя составила $Me\ 25,36$ [19,1; 32,32] μm^2 , данное значение на 19,23 % меньше, чем в группе алкоголя, и на 32,01 % больше, чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» толщина пирамидного слоя составила $Me\ 27,62$ [16,12; 35,12] μm^2 , данное значение на 12,03 % меньше, чем в группе алкоголя, и на 25,95 % меньше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

Относительная плотность нейропиля пирамидного слоя гиппокампа в группе «Сукцикард» меньше по сравнению с группой «Цитрокард» на 23,12 %. В группе «Сукцикард» относительная плотность нейропиля составила $Me\ 31,64$ [23,7; 45,42] μm^2 , данное значение на 12,25 % меньше, чем в группе алкоголя, и на 4,46 % меньше, чем в группе интакта. В группе «Цитрокард» относительная плотность нейропиля составила $Me\ 41,16$ [36,43; 46,15] μm^2 , данное значение на 12,31 % больше, чем в группе алкоголя, и на 19,53 % больше, чем в группе интакта [8], сравнение всех групп методом Kruskal-Wallis: $p = 0,000$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных ранее данных, следует вывод о том, что количественное морфологическое исследование гиппокампа зон CA1 и CA3 алкоголизованных животных демонстрирует развитие процессов повреждения и активации компенсаторно-приспособительных процессов с преобладанием атрофии [8], однако количественные данные, полученные при исследовании гиппокампа зон CA1 и CA3 экспериментальных групп животных, получавших соединения сукцикард и цитрокард, демонстрируют обратное развитие процессов повреждения с атрофией нейронов пирамидного слоя гиппокампа и характеризуются развитием гипертрофии. По данным количественного морфометрического анализа, можно сделать вывод о том, что у животных, получавших соединения Цитрокард, в гиппокампе в зонах CA1 и CA2 отмечен наиболее выраженный нейропротективный эффект, в свою очередь, менее выраженные нейропротективные изменения определялись в группе животных, получавших соединения сукцикард. Приведенные нами объективные морфометрические данные могут свидетельствовать об эффективности рассматриваемых соединений, с позиции снижения степени выраженности нейронального повреждения и, в свою очередь, подтверждают, что разработка

лекарственных средств на основе естественных метаболитов нервной системы и их аналогов является актуальной [4, 6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдурасулова, И. Н. Роль иммунных и глиальных клеток в процессах нейродегенерации / И. Н. Абдурасулова, В. М. Клименко // Медицинский академический журнал. – 2011. – Т. 11, №1. – С. 12–29.
2. Алкогольное поражение нервной системы: систематика, патогенез, подходы к лечению / Ю. П. Сиволап [и др.] // Наркология. – 2014. – Т. 13, № 2 (146). – С. 52–57.
3. Ахмадеев, А. В. Гамкергическая система базолатерального ядра миндалевидного комплекса мозга при формировании алкогольной зависимости // А. В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2017. – Т. 103, № 9. – С. 978–986.
4. Багметова В. В. Психотропные свойства и аспекты механизмов действия новых производных гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот: дис. ... д-ра мед. наук / В. В. Багметова. – Волгоград, 2013. – С. 34–36.
5. Зиматкин, С. М. Клеточные и молекулярные механизмы повреждающего действия алкоголя на развитие мозга / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Вестні Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2013. – № 2. – С. 109–117.
6. Изменения ионных токов нейронов моллюсков под влиянием Сукцикарда // А. И. Вислобоков [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2012. – № 4 (44). – С. 27–30.
7. Коррекция препаратами лития нейродегенеративных изменений при алкоголизме: клеточно-молекулярные механизмы. / А. А. Котлярова [и др.] // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2015. – Т. 13, № 2. – С. 56–66.
8. Морфологические изменения в гиппокампе крыс при моделировании хронического алкоголизма / А. В. Смирнов [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2018. – № 2. – С. 10–14.
9. Разводовский Ю. Е. Аминокислоты в патогенезе и лечении алкоголизма // Наркология. – 2010. – Т. 9, № 6 (102). – С. 88–97.
10. Структурные изменения в головном мозге крыс при моделировании хронического алкоголизма / А. А. Замлелов [и др.] // Материалы V съезда российского общества патологоанатомов. – 2017. – С. 111–112.
11. Granato, A. Alcohol and the Developing Brain: Why Neurons Die and How Survivors Change / A. Granato, B. Dering // Int J Mol Sci. – 2018. – № 19 (10). – P. E2992. doi: 10.3390
12. Proteomics Reveals Profound Metabolic Changes in the Alcohol Use Disorder Brain / C. Enculescu [et al.] // ACS Chem Neurosci. – 2019. – № 15; 10 (5). – P. 2364–2373. doi: 10.1021.