

Захаров Г.А., Петров В.М.

ВЛИЯНИЕ АЛКОГОЛЯ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС И МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ИХ КОРРЕКЦИЯ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГОРЬЯ

*ГОУ ВПО Кыргызско-Российский Славянский университет, медицинский факультет, Кафедра нормальной и патологической физиологии
Киргизия, г. Бишкек*

По данным ВОЗ, алкоголизм занимает третье место по частоте причин смерти, уступая сердечно-сосудистым заболеваниям и злокачественным новообразованиям. При этом основной её причиной являются различные соматические и неврологические расстройства. Ежегодно в мире регистрируется примерно 80 тыс. острых смертельных отравлений этиловым спиртом и его суррогатами [1].

Сложность патогенеза и многообразие симптоматики алкоголизма обуславливают использование разнообразных препаратов и методов его терапии. Актуальной задачей его фармакотерапии остается поиск препаратов, подавляющих влечение к этанолу [2].

В настоящее время в фармакологическом реестре зарегистрировано около сотни препаратов для лечения алкоголизма. Из современных средств с широким спектром действия наше внимание привлек милдронат. Препарат обратимо ограничивает скорость биосинтеза карнитина из его предшественника – гамма-бутиробетана, а так как именно с помощью карнитина осуществляется транспорт длинноцепочечных жирных кислот через мембраны митохондрий, то приток жирных кислот и, следовательно, их накопление в митохондриях уменьшается, что никак не сказывается на метаболизме короткоцепочечных жирных кислот. Было выявлено и подтверждено влияние милдроната на процессы окисления жирных кислот в клетках. А ограничение потока жирных кислот через мембраны митохондрий защищает клетку от гибели в условиях кислородного голодания [3].

Ранее нами получены данные о положительном влиянии милдроната на функцию ЦНС после принудительной алкоголизации крыс в условиях низкогогорья, о чем свидетельствовали

показатели поведенческих реакций и физической работоспособности [4].

В доступной нам литературе мы не встретили сведений о том, как влияет пребывание в высокогорье на развитие алкоголизации, поведенческие реакции и какое влияние на эти процессы оказывает милдронат. Это и явилось целью настоящего исследования.

Материалы и методы

Исследования выполнены на высокогорной базе Института горной физиологии НАН КР, которая находится в горах Тянь-Шаня (перевал Туя-Ашу, 3200 м над ур. м.), в июле – августе. В качестве экспериментальных животных были использованы белые крысы, которые были разделены на 4 группы:

I группа интактные животные (n=6), находившиеся низкогорье в г. Бишкек, 760 м над ур. моря;

II группа животные (n=6), адаптирующиеся в течение 60 дней в высокогорье (3200 м над ур. м.);

III группа животные (n=8) с принудительной алкоголизацией в течение 60 дней пребывания в условиях высокогорья;

IV группа животные (n=8) с принудительной алкоголизацией в течение 60 дней в условиях высокогорья и фармакоррекцией милдронатом (1 раз в сутки в дозе 15 мг/кг веса внутривнутрибрюшинно) в течение последних 20 дней эксперимента.

Опыты проводились в соответствии с Европейской конвенцией о защите животных, используемых в экспериментальных целях (директива 86/609 ЕЕС).

Крысы содержались в условиях сбалансированного питания. Принудительную алкоголизацию проводили раствором этанола, который

был единственным источником жидкости [5]. Использовали возрастающие концентрации (10 дней – 5% раствор этанола, 10 – 10%, 20 дней – 15% и в дальнейшем до 60 дня – 20%). Эта методика является оптимальной для создания хронического алкоголизма и позволяет добиться потребления животными максимально больших доз алкоголя, при которых он оказывает токсическое действие на организм.

Содержание этанола в крови определяли алкилнитритным газохроматографическим методом перед забоем [6]. Количественное определение этанола в 2 пробах проводили по программе «Аналитик». Для каждого объекта вычисляли среднее значение.

О влиянии алкоголя и препарата на функциональное состояние животных судили по показателям поведения крыс в тесте «открытое поле» (на 10, 20, 40 и 60-е дни опыта), который является наиболее распространенным и информативным тестом в определении эмоционального состояния и двигательной активности животных [7]. Для этой цели крыс помещали в квадратную камеру размером 0,5 x 0,5 м. Пол камеры был разделен на 25 равных квадратов с круглыми отверстиями диаметром 3 см. Животных помещали в угол камеры, после чего в течение 5 минут исследовалась локомоторная, ориентировочно-исследовательская активность и груминг (по количеству выполненных движений), подсчитывалось количество дефекаций и мочеиспусканий [8].

Забой животных проводился путем декапитации, после предварительной дачи эфирного наркоза.

Для гистоморфологического исследования ткани брали кусочки размерами 1,5x2x1 см.

фиксировали в 10% р-ре формалина на фосфатном буфере рН 7,4 02М. После промывания в проточной воде объекты обезжизивались в спиртах восходящей концентрации и заливались в парафин-воск. С помощью санного микротомы из парафиновых блоков готовились срезы. Препараты окрашивались гематоксилин-эозином [9].

Статистическая обработка материала выполнена методом вариационной статистики с помощью компьютерных программных пакетов Statlab и Microsoft Excel. Вычислялось среднее значение (M), ошибка средней величины (m). Разницу средних величин оценивали по t-критерию Стьюдента и вероятности P [10], которую признавали статистически значимой при P < 0,05.

Результаты исследования

Определение алкоголя в крови показало (рис. 1), что у животных I и II группы, не употреблявших алкоголь, его не обнаружено.

В III группе после приема алкоголя в течение 60 дней его уровень составил $0,42 \pm 0,013\%$. У крыс, которым с 40-го по 60-й день алкоголизации вводили милдронат, его концентрация в крови была снижена до $0,33 \pm 0,014\%$, (P < 0,05).

Результаты исследования поведенческих реакций представлены в таблице. Исследование пробежек по наружным квадратам у животных, адаптирующихся в условиях высокогорья (3200 м над ур. моря), показало, что идет их постепенное снижение, число которых к 60-му дню снизилось на 50% (с 38 ± 4 до $19,2 \pm 6$, P < 0,05). Принудительная алкоголизация так

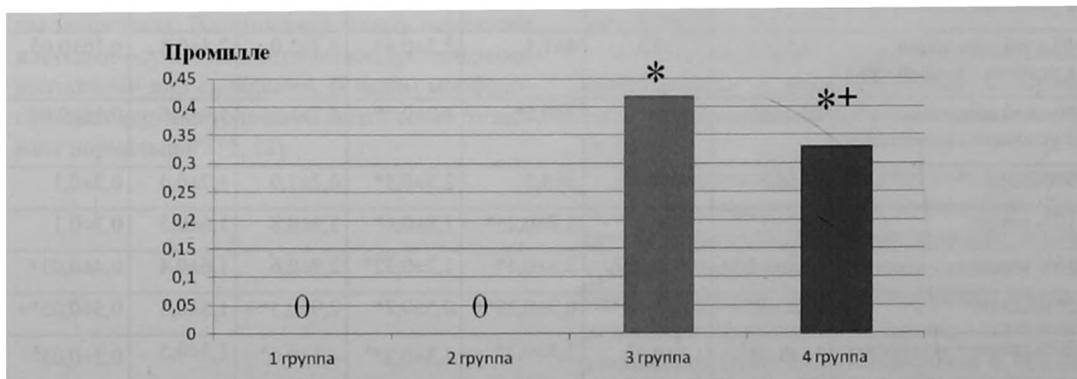


Рис. 1. Концентрация алкоголя в крови

Примечание: * – изменения достоверные по отношению к I группе;

+ – изменения достоверны, по отношению к III группе, P < 0,05.

же значительно снижала локомоторную активность (на 20-й день с 38 ± 4 до $20,2 \pm 5,7$, на 40-й – до $13,2 \pm 3,6$ и на 60-й день до $7,4 \pm 1,9$ пробежек, $P < 0,05$). Причем крысы проявляли активность только на первых минутах, а в последующем сидели в углу и не двигались. В IV группе животных при фармакоррекции милдронатом двигательная активность возросла на 49% (с $7,4 \pm 1,9$ до $14 \pm 3,8$, $P < 0,05$). Сравнение данных у крыс II и III групп показало, что употребление алкоголя снижало двигательную активность более интенсивно. На 20-й день разница составила в среднем 10,2, на 40 – 12,3, а на 60-й – 11,8 пробежек по наружным квадратам ($P < 0,05$).

Анализируя данные по количеству пересеченных «внутренних квадратов», можно отметить, что у крыс II группы наблюдалась незначительная тенденция к их снижению на протяжении 40 дней адаптации. У III группы крыс уже после употребления 10% алкоголя наблюдалась тенденция к снижению активности, которая к 40-му дню уменьшилась на 80% (с $2 \pm 0,4$ до $0,6 \pm 0,25$, $P < 0,05$). Дальнейшее употребление алкоголя привело к ещё большему уменьшению двигательной активности (на 85%). Введение милдроната повысило двига-

тельную активность почти в четыре раза (до $1,1 \pm 0,3$ пробежек, $P < 0,05$).

Исследование «норкового рефлекса» показало его снижение с 7 ± 1 до $3 \pm 0,9$ к 60-му дню пребывания в условиях высокогорья. Употребление этилового спирта также привело к его постепенному снижению: на 20-й день до $3,2 \pm 0,25$, к 40-му – до $2,3 \pm 0,4$, а к концу опыта – до $0,9 \pm 0,25$ количества заглядываний в норки ($P < 0,05$). В IV группе (с применением милдроната) этот показатель имел тенденцию к повышению. В поведенческих реакциях между II и III группами достоверные отличия наблюдалось лишь к 60-му дню пребывания и к такому же сроку употребления алкоголя (разница составила 60%).

Вертикальная двигательная активность выражалась в виде количества «стоек». Адаптации к условиям высокогорья характеризовалась достоверным их уменьшением и концу пребывания снизилась до $2,2 \pm 0,7$ (на 48%, $P < 0,05$). При употреблении алкоголя к 60-му дню активность стала минимальной в группе без коррекции ($0,5 \pm 0,2$) и была достоверно выше в IV-й группе ($1,3 \pm 0,2$ стоек, $P < 0,05$). Между II и III группами они были достоверно ниже в группе с употреблением алкоголя на 60-й день.

Таблица

Поведенческие реакции у животных с принудительной алкоголизацией в условиях высокогорья

	Нар. кв.	Внут. кв.	Норки	Стойки	Груминг	Дефекац.	Мочейсп.
Исходные низкогорные животные	$38 \pm 4,0$	$2 \pm 0,4$	$7 \pm 1,0$	$4,2 \pm 0,4$	$5 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,1$
10 дней адаптации в условиях высокогорья	$33 \pm 4,7$	$1,85 \pm 0,4$	$6,5 \pm 1,2$	$3,6 \pm 0,45^*$	$4,8 \pm 1,2$	$1,7 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,15$
20 дней адаптации в условиях высокогорья	$30 \pm 5,1$	$1,8 \pm 0,4$	$6 \pm 1,3$	$2,4 \pm 0,5^*$	$4,8 \pm 1,1$	$2 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0,1$
40 дней адаптации в условиях высокогорья	$25,5 \pm 4,8$	$1,7 \pm 0,3$	$4 \pm 1,1$	$2,3 \pm 0,6^*$	$4,7 \pm 1,0$	$2,1 \pm 0,4$	$0,16 \pm 0,05$
60 дней адаптации в условиях высокогорья	$19,2 \pm 6^*$	$2 \pm 0,5$	$3 \pm 0,9^*$	$2,2 \pm 0,7^*$	$4,7 \pm 1,1$	$1,9 \pm 0,6$	$0,15 \pm 0,05$
5% спирт	$30 \pm 6,2$	$2 \pm 0,3$	$5 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,5^*$	$4,7 \pm 1,0$	$1,7 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,1$
10% спирт	$20,2 \pm 5,7^*$	$1,3 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,25^*$	$1,8 \pm 0,4^*$	$3,5 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,1$
15% спирт	$13,2 \pm 3,6^{*+}$	$0,6 \pm 0,25^*$	$2,3 \pm 0,4^*$	$1,2 \pm 0,32^*$	$2,9 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,05^+$
20% спирт	$7,4 \pm 1,9^{*+}$	$0,3 \pm 0,18^{*+}$	$0,9 \pm 0,25^{*+}$	$0,5 \pm 0,2^*$	$2,0 \pm 0,5^{*+}$	$1,5 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,05^{*+}$
20% спирт + милдронат	$14 \pm 3,8^{*x}$	$1,1 \pm 0,3^x$	$1,5 \pm 0,3^*$	$1,3 \pm 0,2^{*x}$	$4,1 \pm 0,4^x$	$1,5 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0,05^x$

Примечание: * – изменения достоверны по сравнению с данными низкогорных животных; + – изменения достоверны по сравнению с данными у интактных животных в эти же сроки пребывания в горах; x – изменения достоверны по сравнению с группой без коррекции милдронатом ($P < 0,05$).

Косметическое ухаживание за своим телом (грумминг) существенно не изменялось на всем протяжении адаптации. После 60-ти дневной принудительной алкоголизации этот показатель снизился (с $5 \pm 0,6$ до $2,0 \pm 0,5$, $P < 0,05$). Введение же милдроната повысило активность в два раза ($4,1 \pm 0,4$, $P < 0,05$). Статистическое различие между II и III группой животных было только на 60-й день ($2,7$, $P < 0,05$).

Количество дефекаций почти во все сроки исследования, как при принудительной алкоголизации, так и без нее существенно не менялось. Мочиспускание у животных во II-й группе не изменялось, а у группы с алкоголизацией увеличивалось к 60-му дню с $0,2 \pm 0,1$ до $0,5 \pm 0,05$, $P < 0,05$). Применения милдроната достоверно снизило их количество до $0,2 \pm 0,05$, что свидетельствует о снижении стрессорной реакции. При сравнении данных между II и III опытными группами достоверные различия выявлены на 40-е и 60-е дни ($P < 0,05$).

При микроскопическом исследовании обнаруживается, что тело нервных клеток как бы постепенно переходит в дендрит, резкой границы и выраженных различий в ультраструктуре сомы и начального отдела крупного дендрита не наблюдается (рис. 2.а.). Крупные стволы дендритов отдают большие ветви, а также мелкие веточки и шипики. Аксоны, так же как и дендриты, играют важнейшую роль в структурно-функциональной организации мозга и механизмах системной его деятельности. Аксоны покрываются миелиновой оболочкой, образуя миелиновые волокна. Пучки волокон составляют белое вещество мозга, черепные и периферические нервы. Переплетения аксонов, дендритов и отростков глиальных клеток создают сложные, не повторяющиеся картины нейропиля. Взаимосвязи между нервными клетками осуществляются межнейрональными контактами или синапсами. В целом морфологическая картина головного мозга соответствовала нормальной [11, 12].

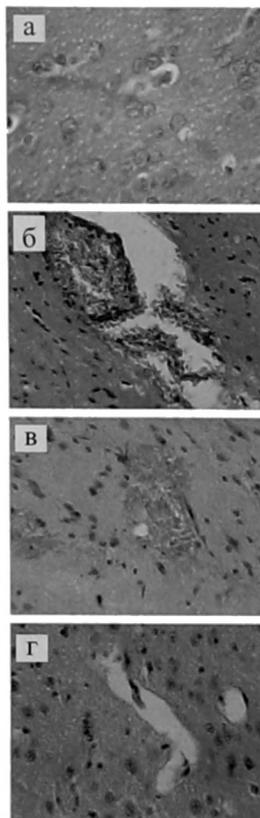


Рис. 2. Морфологическая картина изменений в головном мозге крыс в условиях высокогорья. (Окраска гематоксилином и эозином).

а – контроль. (x 100).

б – Здоровые крысы после 60 суток адаптации. Признаки отека головного мозга и нарушения микроциркуляции (x 400).

в – головной мозг после принудительной алкоголизации. Явления отека менее выражены, но более выражены нарушения микроциркуляции (x 400).

г – головной мозг после принудительной алкоголизации с фармакоррекцией милдронатом. Отсутствие диапедезных кровоизлияний (x 400).

Дача алкоголя (3 группа) привела к неравномерным перичеллюлярным отекам (рис. 2.в.), стазам, диапедезным кровоизлияниям, полнокровию сосудистого сплетения (явления отека менее выражены, но более выражены нарушения микроциркуляции). Введение милдроната уменьшило (рис. 2.г.) полнокровие в сосудистом русле и отсутствовали диапедезные кровоизлияния, что свидетельствует о положительном эффекте.

Выводы

1. Алкоголизация животных в условиях высокогорья (3200 м над ур. моря) сопровождается увеличением уровня алкоголя в крови, а милдронат способствовал его снижению.

2. При адаптации животных к высокогорью их поведенческие реакции затормаживаются, а со стороны головного мозга наблюдаются отек головного мозга и нарушения микроциркуляции. Принудительная алкоголизация в высокогорье сопровождается дальнейшим снижением двигательной активности и склонности к диапедезным кровоизлияниям в мозге.

3. Милдронат способствует восстановлению поведенческих реакций и снижению морфологических проявлений в головном мозге.

Литература

1. Лужников Е.А., Суходолова Г.Н. Клиническая токсикология. – Москва, 2008. – 570 с.

2. Ловать М.Л., Ключникова М.А., Кушнир Е.А., Ашмарин И.П. Влияние комплексного введения 4-метилпиразола, флуоксетина и тетурама на потребление этанола белыми крысами // Вопросы наркологии. – 2005. – № 3. – С. 51-55.

3. Lewandovski E.D. Metabolic mechanisms associated with angina therapy // Circ. Res.. – 2000. – Vol. 86. – P. 487-489.

4. Петров В.М., Захаров А.Г., Замураева Л.В. Изменение некоторых физиологических показателей при длительном употреблении алкоголя и их коррекции милдронатом // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета. – 2011. – Т. 11, № 8. – С. 109-113.

5. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Русановский В.В. и др. Модуляция пептидами самостимуляции латерального гипоталамуса у крыс при хронической алкоголизации // Экспериментальная наркология. – 2006. – № 3. – С. 36-41.

6. Акимов П.А., Орбиданс А.Г., Терхин Г.А. и др. Влияние острой алкогольной интоксикации на содержание гликогена в печени и скелетных мышцах // Пат. физиол. и exper. терапия. – 2010. – № 2. – С. 15-17.

7. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П.Д. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – Москва: Высшая школа, 1991. – 399 с.

8. Захаров Г.А., Короткевич И.Г., Вишневский А.А. Острая церебральная ишемия и её коррекция в высокогорье. – Бишкек: Изд-во КРСУ, 2011. – 138 с.

9. Меркулов Г.А. Курс патологической техники. – Л.: Медицина, 1969. – 380 с.

10. Боровиков В.П., Боровиков И.П. Statistica®. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows®. – Москва, 1998. – 592 с.

11. Описание микропрепаратов по курсу частной гистологии: Учебно-методическое пособие // Под ред. Н.Н. Заречновой. – Бишкек, 2002. – 38 с.

12. Струков А.И., Серов В.В., Саркисов Д.С. Патологическая анатомия: Учебник. – М.: Медицина, 1995. – 668 с.