

Вахнин В.А., Брюхин Г.В.

Когнитивные расстройства и повышенная свободнорадикальная активность мозга потомства крыс-самок с экспериментальной хронической алкогольной патологией печени

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
Южно-Уральский государственный медицинский университет, 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64

Установлено, что хроническое алкогольное поражение гепатобилиарной системы ведет к нарушению когнитивных функций у потомства. У данной группы животных выявлено нарушение памяти и способности к ориентации в пространстве в условиях водного лабиринта Морриса, угнетено исследовательское поведение. Кроме того, животные, рожденные от матерей с хронической алкогольной патологией гепатобилиарной системы имеют повышенную свободнорадикальную активность, которая играет немаловажную роль в обеспечении адаптивных возможностей мозга.

Ключевые слова: патология печени, алкоголь, перекисное окисление липидов, водный лабиринт Морриса

Vakhnin V.A., Brukhin G.V.

The cognitive disorders and raised free-radical activity of a brain of posterity of rats-females with experimental chronic alcoholic pathology of a liver

South-Ural State medical university, 454092, Chelyabinsk, Russian Federation

It is established, that chronic alcoholic defeat of hepatobiliarity systems leads to infringement of cognitive functions at posterity. At the given group of animals revealed distress of memory and ability to orientation in space in the conditions of Morris water maze is, the research behavior is oppressed. Besides, the animals, born from mothers with chronic alcoholic defeat of hepatobiliarity systems have raised free-radical activity, which plays an important role in maintenance of adaptive possibilities of a brain.

Key words: liver disease, alcohol, degradation of lipids, Morris water maze

Проблема сохранения здоровья матери является приоритетной задачей нашего государства. Известно, что у матерей с хроническими поражениями гепатобилиарной системы рождается потомство с нарушением развития органов и функциональных систем, том числе и нервной системы [1, 2]. Хроническое употребление этанола особенно во время беременности проявляется серьезными тератогенными эффектами у потомства, что позволяет считать алкоголь одной из ведущих причин задержки умственного развития и врожденных уродств.

Цель исследования — анализ особенностей когнитивных функций у потомства самок крыс с экспериментальным алкогольным поражением печени.

Для корреспонденции: Вахнин Вячеслав Андреевич (Vakhnin Viacheslav Andreevich) — аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия Минздрава Российской Федерации, e-mail: nash088@mail.ru

Методика

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах-самках, у которых моделировалось хроническое алкогольное поражение печени с помощью 15% раствора этилового спирта, предлагаемого им для питья в течение трех месяцев [3]. По истечении этого времени к самкам подсаживали интактных самцов. С этого момента и в течение всей беременности животные алкоголь не получали. Повреждения печени у половозрелых самок крыс верифицировали на основании морфологических (некротические изменения дисккомплексация гепатоцитов, изменение соотношения строма—паренхима, гиперплазия печеночных макрофагов, расширение синусоидных капилляров, массивная лимфогистиоцитарная периваскулярная инфильтрация портальных трактов), иммунологических (высокий титр печеночных антител (1:320 и 1:640), биохимических (гипергаммаглобулинемия, увеличение АЛТ и АСТ, увеличение билирубина) исследований. Объектом исследования были 60-дневное потомство самок крыс с экспериментальным алко-

льным поражением печени (А-группа). Эту группу составили 10 крысят из 10 пометов интактных самок-крыс. Контрольную группу составили 10 крысят, взятых из 10 пометов (К-группа). Для оценки памяти и способности животных к ориентации в пространстве был использован водный лабиринт Морриса [4—6]. Водный лабиринт Морриса представлял собой бассейн диаметром 1,8 м и высотой стенок 60 см. Вода замутнялась водно-дисперсионной краской белого цвета. Для поддержания оптимальных условий тестирования животных температура воды в бассейне была относительно постоянной ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Это достигалось системой термостатирования воды AQUAEL «Comfort Zone» (150 Вт). Вся поверхность лабиринта условно разделялась двумя взаимоперпендикулярными линиями на 4 сектора. Для облегчения ориентации животных внутри лабиринта каждый сектор маркировался отдельной геометрической фигурой.

Тестирование животных проводилось в течение 5 сут. В первые 4 сут. животных обучали нахождению скрытой подводной платформы. На 5-е сут. проводили контрольный тест без платформы. Каждому животному ежедневно предоставлялось по 4 попытки для нахождения скрытой платформы (по одной из каждого сектора). Время одной попытки составляло 90 с. Если животное за отведенное время не находило искомую платформу, то его принудительно сажали на нее и давали некоторое время для запоминания и ориентации внутри лабиринта (30 с), после чего снова начинали попытку до тех пор пока животное не найдет платформу. При этом местоположение скрытой под водой платформы диаметром 10 см оставалось постоянным (северный сектор), а последовательность секторов менялась для каждого дня. После каждой успешной попытки с какого-либо сектора лабиринта животным давали 1 мин отдыха на платформе, после чего продолжали процедуру тестирования. На 5-е сут. платформу убрали из воды, и фиксировали время пребывания животного в секторе, где ранее была платформа (в процентах от времени одной полной попытки — 90 с). Тем самым оценивали, насколько животное хорошо запомнило месторасположение платформы.

Передвижение животных в водном лабиринте регистрировали с помощью системы видеорегистрации Logitech HD Webcam C510 с последующим вычислением в программе WinTrack 32 следующих параметров: времени нахождения животным платформы (с), индекса извилистости маршрута при поиске платформы ($^\circ/\text{м}$), доли времени нахождения в секторе с платформой и в остальных секторах лабиринта ($\%$), доли времени нахождения животных в центральном секторе лабиринта ($\%$), а также среднего количества попыток, необходимых для нахождения искомой платформы. Полученные цифровые данные обрабатывали на компьютере с использованием про-

граммы SPSS Statistics v.17.0. Значимость полученных результатов определялась при помощи непараметрического критерия Манна—Уитни.

Поскольку нервные клетки нуждаются в потреблении большого количества кислорода, то для этой системы отмечена наиболее высокая уязвимость к свободнорадикальной атаке, ведущей к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [7]. Нами проведено определение уровня ПОЛ в головном мозге лабораторных животных. Для изучения содержания продуктов ПОЛ в головном мозге был избран экстракционно-спектрофотометрический метод с отдельной регистрацией продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, поскольку данный метод позволяет оценить стабильность и «глубину» свободнорадикальной деструкции молекул, лежащих в основе нейрональных мембран [7].

Кроме того, нами производилось дополнительное определение конечных продуктов ПОЛ, в основе которых лежат шиффовые основания [8]. Измерения экстинкций проб проводили на спектрофотометре СФ-46 ЛОМО (СССР, 1988). Животных выводили из эксперимента путем декапитации, после чего готовили гомогенаты на 0,1% растворе ЭДТА в 0,9%-ном водном растворе NaCl из расчета 1,5 г сырой массы нервной ткани на 2,4 мл буфера [7].

Результаты и обсуждение

Установлено, что животные группы А характеризуются слабой исследовательской активностью, что подтверждается меньшим временем пребывания в центральном секторе лабиринта (рис. 1). Однако для животных этой группы характерна более высокая посещаемость данной области, что, скорее всего, отражает спонтанную тревожность, ведущую к большей двигательной активности и соответственно посещаемости всего лабиринта, нежели чем сосредоточенный поиск платформы.

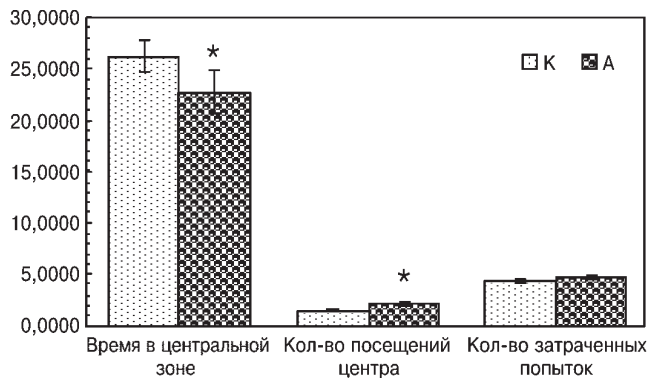


Рис. 1. Показатели исследовательской активности у животных экспериментальных групп на протяжении всего периода обучения; * — $p < 0,05$

Исследование извилистости пути движения лабораторных животных показало, что «алкогольным» животным свойственен меньший индекс извилистости маршрута, что указывает на низкую активность поиска платформы в лабиринте и может являться следствием нарушения памяти. Так, индекс извилистости пути у этих животных составил: 1-е сут. — $137,34 \pm 8,58$ °/м, 2-е сут. — $142,30 \pm 11,37$ °/м, 3- и 4-е сут. соответственно — $128,61 \pm 9,58$ и $137,75 \pm 9,82$ °/м. В контроле данный индекс составил: 1-е сут. — $138,99 \pm 8,16$ °/м, 2-е сут. — $136,93 \pm 9,58$ °/м, 3- и 4-е сут. — $144,08 \pm 8,87$ и $155,13 \pm 8,03$ °/м соответственно.

Другим важным критерием успешности обучения животных является время нахождения скрытой платформы (рис. 2). Установлено, что «алкогольные» животные тратили больше времени на поиск скрытой платформы на протяжении всех 4 сут. обучения в лабиринте. Кроме того, «алкогольные» животные характеризуются не только большим временем, тратящимся на обнаружение платформы, но и меньшим временем пребывания в ее секторе (рис. 3). Это сви-

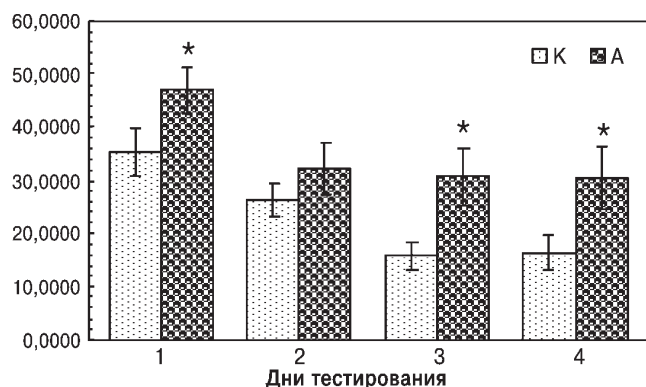


Рис. 2. Время нахождения экспериментальными животными скрытой платформы в водном лабиринте Морриса; * — $p < 0,05$

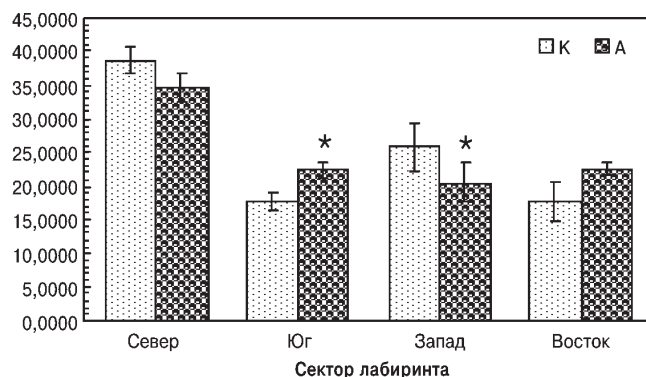


Рис. 3. Процент времени присутствия экспериментальных животных в секторе с платформой и других секторах лабиринта; * — $p < 0,05$

детельствует о нарушении памяти и ориентации в водном пространстве алкогольных животных [9]. Также на нарушение памяти у животных «алкогольной» группы указывает увеличение среднего количества попыток, необходимых для успешного поиска платформы (рис. 1).

Исследование экспериментальных животных в тесте Морриса на 5-е сут. обучения (тест без платформы) показало, что интактные животные быстрееплыли и исследовали область расположения платформы, не находя ее в условленном месте, они пытались найти ее в другом секторе лабиринта после чего, возвращались в тот сектор, где она ранее располагалась. «Алкогольные» животные дольше ($42,62 \pm 4,38\%$) находились в той области, где была платформа, чем контрольные ($36,94 \pm 1,93\%$). По-видимому, это связано с временем, которое интактные животные тратили на поиск платформы в других секторах лабиринта. Таким образом, исследование поведения «алкогольных» животных в водном лабиринте Морриса позволило выявить у них нарушения исследовательской активности, снижение памяти и ориентации в водном пространстве.

Результаты исследования ПОЛ в головном мозге экспериментальных животных представлены в таблице. Как видно из таблицы, животные алкогольной группы характеризуются более низкими индексами первичных (E232/E220) и вторичных (E278/E220) продуктов окисления водно-спиртовой (изопропиловой) фазы липидного экстракта. Известно, что эта фаза отражает уровень окисления структурных липидов (фосфолипидов) клеточных мембран [7]. Это может свидетельствовать о формировании у «алкогольных» животных общего адаптационного синдрома [7]. Низкие индексы первичных и вторичных продуктов окисления указывают на повышенное содержание общих полиеновых продуктов окисления (E220) животных опытной группы. Это может указывать на нарушение функции антиоксидантных систем, обеспечивающих защиту организма от повреждающего действия гидроперекисей [10].

Исследование гептановой фазы показало, что «алкогольные» животные характеризуются более высокими индексами первичных (E232/E220), вторичных (E278/E220) и конечных (E400/E220) продуктов окисления (таблица). Известно, что данная фаза отражает уровень окисления резервных липидов клетки (триацилглицеридов) [7]. Повышение индексов окисления гептановой фазы свидетельствует об ослаблении регенераторных процессов в нейрональных мембранах в ходе повреждения свободными радикалами. Понижение индексов окисления первичных и вторичных продуктов изопропиловой фазы у «алкогольных» животных, скорее всего, говорит о развитии

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в головном мозге экспериментальных животных

Группа	Гептановая фаза			Изопропиловая фаза		
	E232/E220	E278/E220	E400/E220	E232/E220	E278/E220	E400/E220
К	0,550 ± 0,023	0,212 ± 0,019	0,026 ± 0,008	0,708 ± 0,020	0,367 ± 0,001	0,080 ± 0,019
А	0,645 ± 0,026*	0,249 ± 0,026	0,032 ± 0,005	0,687 ± 0,013*	0,348 ± 0,011*	0,089 ± 0,017

Примечание. * — $p < 0,05$

общего адаптационного синдрома [7], поскольку индекс окисления конечных продуктов был выше, чем в контроле. Главным патогенетическим механизмом является повышенная продукция активных форм кислорода, а также низкая антиоксидантная активность нервных клеток. По-видимому, у «алкогольных» животных отмечается недостаток выработки ферментов антиоксидантной защиты, что позволяет свободным радикалам проявлять выраженное цитоповреждающее действие.

Таким образом, результаты исследования в головном мозге экспериментальных животных показывают, что «алкогольные» животные более подвержены окислительному стрессу (индексы окисления продуктов гептановой фазы, индекс окисления конечных продуктов изопропиловой фазы) и появлению общего адаптационного синдрома (индексы окисления первичных и вторичных продуктов изопропиловой фазы). Эти данные согласуются с результатами, полученными в тесте Морриса: снижение у «алкогольных» животных исследовательской активности (время в центральной части бассейна), снижение памяти и ориентации в пространстве (время нахождения платформы, время в секторе с платформой, среднее количество попыток, необходимых для нахождения платформы). Полученные результаты позволяют сделать заключение, что у животных с хроническим алкогольным поражением гепатобилиарной системы рождается потомство с нарушением когнитивных функций, протекающим на фоне увеличения свободнорадикальной активности мозга.

В целом, проведенные исследования позволяют теоретически обосновать необходимость выделения детей от матерей с хронической патологией гепатобилиарной системы в группы риска по умственному и психическому развитию.

Список литературы

1. Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л. Роль экспериментального поражения печени матери в развитии физиологической незрелости потомства. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2012; 154 (11): 544–547.
2. Кузнецова А.Б., Брюхин Г.В. Влияние хронического алкогольного поражения самок крыс на структур-

но-функциональное становление нейросекреторных клеток супраоптического ядра потомства. *Вестник ЮрГУ.* 2008; 104 (4): 29–30.

3. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н., Игнатов В.Я., Иваненко Т.И. Изменение гонадотропной функции гипофиза крыс при развитии экспериментального алкоголизма. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 1986; 12 (6): 675–6.

4. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Хожай Л.И., Самойлов М.О., Отеллин В.А. Обучение в водном лабиринте Морриса самок и самцов крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2005; 41 (6): 530–3.

5. Плескачева М.Г., Зорина З.А., Николенко Д.Л., Вольфер Д.П., Костына З.А., Липп Х.П. Поведение в водном тесте Морриса крыс линии Крушинского—Молодкиной, селектированных на повышенную судорожную готовность. *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова.* 2002; 52 (3): 356–65.

6. Buccafusco J. *Methods of behavior analysis in neuroscience.* Theoretical and practical considerations for the evaluation of learning and memory in mice. Washington; 2001.

7. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма.* Челябинск; 2000.

8. Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е., Лифшиц Р.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов. *Вопр. мед. химии.* 1991; 37 (4): 92–3.

9. Вахнин В.А., Брюхин Г.В. Особенности формирования пространственной ориентации у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени в водном лабиринте Морриса. *Рос. физиол. журн.* 2013; 99 (4): 464–70.

10. Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. *Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС.* М.; 1995.

References

1. Brukhin G.V., Sizonenko M.L. Role of experimental injury of a liver of mother in development of physiological immaturity of posterity. 2012; 154 (11): 544–7. (in Russian)
2. Kuznetsova A.B., Brukhin G.V. Influence of chronic alcoholic injury of females of rats on structurally-functional formation of neurosecretory cells of supranucleus of posterity. *Bulletin of South-Ural State University.* 2008; 104 (4): 29–30. (in Russian)
3. Burov U.V., Vedernikova N.N., Ignatov V.Y., Ivanenko T.I. Change of gonadotrophic function of a hypophysis of rats at development of an experimental

alcoholism. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1986; 12 (6): 675—6. (in Russian)

4. Vataeva L.A., Tyul'kova E.I., Khozhai L.I., Samoilov M.O., Otellin V.A. Training in the Morris water maze of female and male rats exposed to hypoxia at various periods of prenatal development. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2005; 41 (6): 530—3. (in Russian)

5. Pleskacheva M.G., Zorina Z.A., Nikolenko D.L., Volfer D.P., Kostyna Z.A., Lipp H.P. Behaviour of Krushinsky—Molodkina rats in Morris water maze, selected on the raised convulsive readiness. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2002; 52 (3): 356—65. (in Russian)

6. Buccafusco J. *Methods of behavior analysis in neuroscience*. Theoretical and practical considerations for the evaluation of learning and memory in mice. Washington; 2001.

7. Volchegorsky I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Tseylikman V.E. Experimental modelling and laboratory es-

timation of adaptive reactions of an organism. Chelyabinsk; 2000. (in Russian)

8. Lvovskaya E.I., Volchegorsky I.A., Shemyakov S.E., Lifshits R.I. Spectrophotometric definition of end-products of oxidative degradation of lipids. *Vopr. Med. Khim.* 1991; 37 (4): 92—3. (in Russian)

9. Vakhnin V.A., Brukhin G.V. Features of spatial orientation formation in posterity of female of rats with liver experimental injury in Morris water maze. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2013; 99 (4): 464—70. (in Russian)

10. Dumaev K.M., Voronina T.A., Smirnov L.D. *Antioxidants in preventive maintenance and therapy of pathologies of CNS*. Moscow; 1995.

Поступила 12.07.13

Received 12.07.13

Сведения об авторах:

Брюхин Геннадий Васильевич (Brukhin Gennady Vasil'evich) — д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ГБОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия Минздрава Российской Федерации, e-mail: kanc@chelsma.ru