

# НАРУШЕНИЕ МОРФОГЕНЕЗА КОРКОВЫХ И ПОДКОРКОВЫХ СТРУКТУР ДВИГАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС НА РАННИХ ЭТАПАХ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ПОСЛЕ ИНТОКСИКАЦИИ ТОЛУОЛОМ И КОРРЕКЦИЯ ЭТИХ НАРУШЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ АНТИОКСИДАНТА

Д.П.Мусеридзе, д.биол.н., И.К.Сванидзе, профессор, Е.В.Дидимова к.биол.н., Л.Г.Гегенава, к.биол.н., Н.Н.Гвинадзе

Институт физиологии им.И.С.Бериташвили, Тбилиси, Грузия

**РЕЗЮМЕ.** Досліджували вплив толуолу (500 ppm) і корекцію викликаних змін за допомогою антиоксиданту мірадолу на кількість нейронів у корі і підкоркових утвореннях рухової системи і проліферацію гранулярних клітин мозочка на ранніх етапах постнатального розвитку білих щурів, а також міграційну активність гліальних клітин *in vitro*. Було виявлено, що мірадол знижує кількість загинувших нейронів, частково відновлює проліферативну активність гранулярних клітин мозочка і міграційну здатність культивованих гліальних клітин.  
Ключові слова: інтоксикація, толуол, превенція, мірадол, нейрони, глія.

**РЕЗЮМЕ.** Исследовали влияние толуола (500 ppm) и коррекцию вызванных изменений с помощью антиоксиданта мирадола на количество нейронов в коре и подкорковых образованиях двигательной системы и пролиферацию гранулярных клеток мозжечка на ранних этапах постнатального развития белых крыс, а также миграционную активность глиальных клеток *in vitro*. Было обнаружено, что мирадол снижает число гибнущих нейронов, частично восстанавливает пролиферативную активность гранулярных клеток мозжечка и миграционную способность культивируемых глиальных клеток.  
Ключевые слова: интоксикация, толуол, превенция, мирадол, нейроны, глия.

**SUMMARY.** Influence of toluene (500 ppm) and correction of induced changes by antioxidant Mirradol on the number of neurons in the cortical and subcortical structures of the motor system and proliferative activity of the cerebellar granular cells at early stages of postnatal development of the albino rats and migration activity of glial cells *in vitro* were investigated. Our data have shown that Mirradol decreases number of perished neurons in the cortex and subcortex and particularly restored the cerebellar granular cells proliferative activity and migration properties of the glial cells *in vitro*.  
Key words: intoxication, toluene, prevention, Mirradol, neuron, glial cells.

Токсическое влияние толуола на организм — одна из важных экологических проблем. Толуол используется в производстве красок, каучука, резины, в печатном и кожевенном производстве. Большое количество толуола находится в выхлопных газах и табачном дыме. Как галлюциногенное вещество, его потребляют токсикоманы, что негативно влияет на структуру и функцию ЦНС (1, 2).

Вдыхание паров толуола беременными женщинами вызывает серьезные деструктивные изменения у потомства (3). Формируется плодный толуольный синдром (FSS), характеризующийся признаками аналогичными плодному алкогольному синдрому (FAS). Так, увеличиваются случаи преждевременных родов, уменьшается вес плода, задерживается рост, а также появляется микроцефалия, эпилепсия, атрофия мозга и т.д. Среди хронических потребителей толуола наблюдается дефицит памяти, нарушение поведенческих реакций (1, 4).

Мембраны нервных клеток в большом количестве содержат жирные кислоты, которые являются мишенью для свободных радикалов, образующихся после интоксикации толуолом. Воздействие свободных радикалов вызывает нарушение клеточных мембран, белков, хроматина, нарушается стабильность специфических ионных каналов и рецепторов (4, 5).

По данным литературы в процессе развития головной мозг характеризуется особой чувствительностью к толуолу. Пренатальная интоксикация толуолом в сенсомоторной коре крыс на ранних этапах постнатального развития может влиять на пролиферацию и миграцию клеток предшественников (3, 1). Согласно полученным нами данным воздействие толуола вызывает гибель нервных клеток и ингибирование пролиферативной активности гранулярных клеток мозжечка (6). Цитотоксическое воздействие толуола ведет к дегенерации нейронов, их гибели путем некроза или апоп-

тоза и структурным изменениям в первичных культурах астроцитов и нейронов (7, 1).

Дистрофические изменения, вызванные органическими растворителями, сильнее выражены у молодых животных, поэтому их кратковременное воздействие или малые дозы могут вызвать длительное нарушение структуры формирующихся синаптических контактов, что в дальнейшем проявляется нарушением поведенческих реакций (4).

С целью превенции токсического эффекта были использованы различные антиоксиданты, подавляющие активность реактивных оксигенов, в частности, витамин Е, мелатонин, ебселен, *Nigella sativa* и Thimoquinone, имеющие нейропротекторные, противовоспалительные и антиоксидантные свойства (8, 2, 9).

Проведенные нами ранее исследования доказали, что длительное воздействие толуола на 2-3 месячных крыс вызывает гибель нейронов в корковых и подкорковых структурах двигательной системы,

добавление же в пищевой рацион плаферона-ЛБ ослабляло цитотоксический эффект толуола (10).

Цель настоящей работы — в изучение влияния толуола на количество нейронов, принимающих участие в структуризации коры и образовании подкорковых структур, а также на пролиферацию гранулярных клеток мозжечка и процессы миграции, являющиеся важным этапом нейрогенеза и коррекции вызванных изменений с помощью антиоксиданта мирадола. В состав мирадола входит антиоксидант нового поколения эпофен. Обладая выраженной способностью обезвреживать токсины, эпофен осуществляет блокирование образования свободных радикалов, способствует оптимальному потреблению кислорода клетками и тканями, увеличивая устойчивость организма в случае дефицита кислорода. Кроме эпофена мирадол содержит автолизат дрожжей, а также аминокислоты, макро- и микроэлементы, полисахариды, витамины групп В, РР и Н, а также витамин Е.

#### Материал и методы

Опыты проводились на 3-х группах беспородных белых крыс на ранних этапах постнатального развития (P3, P7, P15, P21). I — контрольная (интактная) группа животных. II экспериментальная группа — животные ежедневно (в неделю 5 дней) путем ингаляции в течение 15 мин вдыхали пары толуола (500ppm). III — экспериментальная группа — животные в период лактации, параллельно с толуолом, получали мирадол с молоком матери, мирадол (0.7г в день) добавляли в рацион кормящих самок. Животных умерщвляли под эфирным наркозом, согласно правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. Мозг фиксировали в жидкости Карнуа, серийные парафиновые срезы (10мкм) окрашивались крезил-виолетом. Плотность (количество) нервных клеток определялась в каждом третьем срезе в 10 полях зрения (0.0256мм<sup>2</sup>) с помощью окулярной сетки (увеличение ок.10, об.40) в световом микроскопе (Amplival, Zeiss). Определяли число нейронов у контрольных и экспериментальных животных в корковых и подкорковых структурах двигательной системы (моторная кора, вентролатеральное ядро таламуса, хвостатое ядро,

бледный шар) и мозжечке. Для выяснения пролиферативной активности гранулярных клеток мозжечка определяли митотический индекс в промилях. Полученные цифровые показатели обрабатывались статистически с применением t критерия Фишера-Стьюдента.

Влияние толуола и мирадола на миграционную способность клеток исследовали в органотипических культурах коры головного мозга новорожденных белых крыс. Объектом исследования служили эксплантаты коры головного мозга 32-х новорожденных белых крыс на ранних этапах культивирования (48ч, 3 и 5 суток). Были исследованы 4 серии культур по 100-120 эксплантатов в каждой серии. Эксплантаты культивировали в камерах Максимова, методом висячей капли при 37°C на коллагеновом субстрате. В I серии культур эксплантаты культивировались в стандартной питательной среде, содержащей 80% DME F-12 HAM (Sigma) и 20% бычьей сыворотки (Fetal Bovine Serum — F 1051). II экспериментальная серия — в стандартную питательную среду вводили толуол (100μM). III — экспериментальная серия — в питательную среду вместе с толуолом добавляли мирадол (10<sup>-5</sup> M). Интенсивность миграции глиальных клеток и роста аксонов в зону роста исследовали с помощью фазово-контрастного микроскопа (Enaval, Zeiss), интерференционного контраста по Номарскому (MPI-5, Польша) и фиксированных и крезил-виолетом окрашенных препаратов в световом микроскопе (Amplival, Zeiss).

#### Результаты и обсуждение

Определение плотности пирамидных нейронов в моторной коре интактных животных показало, что в процессе развития, в связи с ростом нейропиля этот показатель на P7, P15, P21 падает на 10%, 56% и 75% соответственно. В мозжечке плотность расположения клеток Пуркинье у интактных животных уменьшалась на 10%, 35% и 54% соответственно. Такая же закономерность наблюдалась при определении количества клеток в хвостатом ядре — количество клеток уменьшалось на 28%, 50% и 30% и бледном шаре — 33%, 58% и 50% клеток.

Ингаляция 500ppm толуола оказала влияние на число пирамидных нейронов моторной коры, клеток

мозжечка и нейронов подкорковых ядер. Гибель нейронов была выражена среди клеток Пуркинье, гранулярных клеток мозжечка и клеток вентролатерального ядра таламуса (таблица 1).

Введение мирадола в рацион кормящих самок ослабило действие ксенобиотика. Превентивная способность мирадола была отмечена на P7, P15, P21 и особенно проявилась в вентролатеральном ядре таламуса на всех изученных нами этапах. Аналогичное явление отмечено и в хвостатом ядре, но менее интенсивно выраженное. Снижение числа нейронов в корковых и подкорковых структурах после воздействия толуола могло быть вызвано задержкой миграции клеток на раннем этапе онтогенеза. Влияние толуола на миграционную способность клеток было обнаружено на культурах коры головного мозга. Изучение контрольной серии культур на ранних этапах культивирования (24ч, 48ч. и 3 сут.) обнаружило активность глиальных клеток на 3 сутки культивирования. Отмечалось интенсивное выселение глиальных клеток из эксплантатов коры головного мозга в зону роста с образованием субстрата для последующего роста аксонов. Контактируя между собой глиальные клетки, в основном плазматические астроциты, образовывали глиальные мембраны, покрывающие относительно большую площадь субстрата (рис.1а). Характерно, что такие мембраны непостоянны, и клетки, теряя связь, вновь превращались в изолированные астроциты. В зоне роста встречались также фиброзные астроциты с многочисленными отростками.

Добавление в питательную среду культур толуола оказало тормозящее действие на развитие зоны роста. Наблюдалось нарушение межклеточных контактов, значительное снижение числа выселившихся из эксплантатов глиальных клеток и снижение интенсивности роста аксонов (рис.1б). В зоне роста отмечалось обилие фибробластов и макрофагов, а также присутствие отдельных микроглиальных клеток. Наблюдалась дегенеративные изменения клеток в виде атрофии клеточных тел, сморщивания ядер и кариорексиса. С целью превенции наблюдаемых нами изменений, вызванных введением в питательную среду

Количество нейронов в корковых и подкорковых структурах двигательной системы крыс после интоксикации толуолом и коррекции мирадалом

Объект исследования	Количество нейронов на ранних этапах постнатального развития											
	3 день			7 день			15 день			21 день		
	I группа	II группа	III группа	I группа	II группа	III группа	I группа	II группа	III группа	I группа	II группа	III группа
Моторная кора	87±1.1	74±2.6*	68±1.1*	79±1.3	59±1.6*	64±1.1*	39±1.1	36±1.2	36±0.3**	23±0.5	19±0.2*	22±0.5
Вентро-латеральное ядро таламуса	64±2.1	39±1.5*	64±1.2	91±2.5	48±1.9*	73±1.9*	85±2.0	63±2.7*	73±1.6*	91±3.4	52±2.2*	67±1.5*
Хвостатое ядро	620±2.1	435±4*	505±1.4*	445±4.3	375±5.3*	392±2.7*	312±8.0	272±5.8*	279±1.7*	193±2.3	158±2.2*	156±1.4*
Бледный шар	258±5.7	202±2.9*	209±2.2*	199±3.0	176±7.2*	181±2.0*	151±3.3	113±1.9*	118±1.3*	129±0.6	70±2.7*	77±1.1*
Гранулярные клетки мозжечка	495±3.1	123±2.3*	120±2.1*	1010±29	140±4.1*	150±3.2*						
Клетки Пуркинье	20±0.6	11±1.4*	17±0.2*	17±0.5	12±0.5*	20±0.6*	13±0.6	7±0.2*	11±0.7*	9±1.2	8±1.1*	11±0.3*

Примечание: I группа — интактные животные, II экспериментальная группа — интоксикации толуолом, III экспериментальная группа — толуол одновременно с мирадалом. Цифровые показатели по II и III группам сравнивали с показателями I группы. \* P<0.01, \*\* P<0.05

толуола, одновременно с ним в питательную среду вводили мирадол. В этих сериях культур рост нейритов был слабо выражен, преимущественно отмечалось активное выселение глиальных клеток в зону роста эксплантатов (рис. 1в).

Определение митотического индекса гранулярных клеток мозжечка показало, что толуол оказывает ингибирующее влияние на пролиферативную активность. Известно, что формирование мозжечка продолжается после рождения в течении месяца, в этот период происходит активная пролиферация гранулярных клеток, благодаря чему формируется внутренний гранулярный слой. Сопоставление митотического индекса гранулярных клеток 3 и 7 дневных интактных животных показывает, что к 7 дню постнатального развития пролиферативная ак-

Таблица 2  
Митотический индекс гранулярных клеток мозжечка крыс после интоксикации толуолом и коррекции мирадалом

Этапы постнатального развития					
3-й день			7-й день		
I группа	II группа	III группа	I группа	II группа	III группа
3.7±0.2	2.8±0.4**	3.4±0.2	9±0.8	2.3±0.1*	5.6±0.1*

Примечание: обозначения те же, что на таблице 1.

\* P<0.001, \*\* P<0.005

тивность клеток резко возрастает, что ведет к удвоению количества гранулярных клеток. Цитотоксический эффект, вызванный толуолом у этих животных проявляется в ингибировании пролиферативной активности, особенно на 7 день развития. После воздействия мирадола пролиферативная активность клеток на 7 день частично восстанавливалась (таблица 2).

Анализ полученных данных показал, что интоксикация толуолом в

низких дозах (500ppm) вызывает цитотоксический эффект в корковых и подкорковых структурах двигательной системы и мозжечке. Ранние этапы постнатального развития высоко чувствительны по отношению к воздействию алкоголя и различных ксенобиотиков. Нейрогенез головного мозга включает стратификацию коры, формирование подкорковых структур и зернистого слоя мозжечка. Продолжающаяся

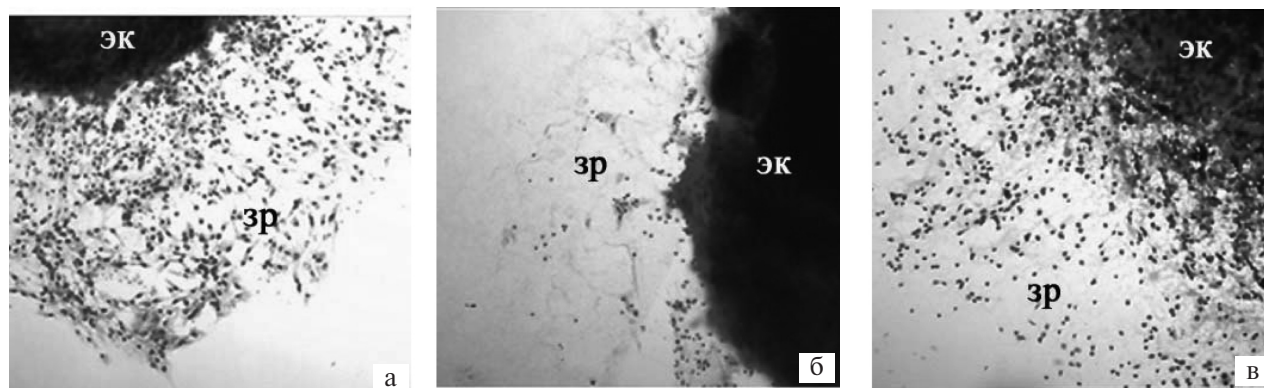


Рис.1. Эксплантаты коры головного мозга новорожденных крыс через 3 суток культивирования. Активная миграция глиальных клеток в зоне роста (ЗР) эксплантата (ЭК) в стандартной питательной среде (а), зона роста эксплантата в среде, содержащей толуол (б), зона роста эксплантата после добавления в питательную среду, одновременно с толуолом, антиоксиданта мирадола (в). Окраска крезил-виолетом. ув.220

пролиферация гранулярных клеток и миграция нейронов идут одновременно с миелинизацией, синаптогенезом, апоптозом и развитием нейрона. Потребление толуола в период лактации нарушает течение процессов пролиферации и миграции, лежащих в основе нейрогенеза. Уменьшение количества нейронов в корковых и подкорковых структурах двигательной системы, а также в мозжечке на ранних этапах постнатального развития белых крыс после интоксикации толуолом вызвано также гибелью нейронов, ведущей к

нарушению стратификации моторной коры, формирования подкорковых ядер, целостности афферентных и эфферентных путей, в том числе внутримозжечковых связей, что может оказать влияние на поведенческую активность животных.

Одновременное воздействие толуола и мирадола, с целью ослабления повреждающего влияния толуола на развивающийся мозг, снижало число погибнувших нейронов в корковых и подкорковых структурах и мозжечке, частично восстанавливало пролиферативную активность

гранулярных клеток мозжечка и миграционную способность глиальных клеток. Наблюдаемые нарушения нейрогенеза могут быть следствием генерации реактивных оксигенов, вызванной воздействием толуола и, следовательно, формированием оксидативного стресса, поскольку существует тесная зависимость между генерацией свободных радикалов и влиянием толуола (8, 2, 5). Ослабление цитотоксического влияния толуола с помощью мирадола связано с антиоксидантными свойствами препарата.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Burry M. Developmental neurotoxicity of toluene: in vivo and in vitro effects on astroglial cells / M. Burry, M. Guizzetti, J. Oberdoerster, I.G. Costa // *Dev. Neurosci.*, 2003, Jan-Feb. 25(1): 14-9
2. Со́кун И. Ебселен защищает against oxidative and morphological effects of high concentration chronic toluene exposure on rat sciatic nerves / ?. Со́кун, М. Ю́рчак, М. Кантер, С. Ву́кча // *Eur J Gen Med* 2006;3(2):64-72.
3. Gospe SM Jr. Prenatal exposure to toluene results in abnormal neurogenesis and migration in rat somatosensory cortex / S.M. Gospe, S.S. Zhou // *Pediatr Res* 2000 Mar;47(3):362-68.
4. Liu Ch.L. Effects of toluene exposure during Brain Growth Spurt on GABAA receptor-mediated function in juvenile rats / Ch.L. Liu, Y.R. Lin, M.H. Chan, H.H. Chen // *Toxicological Sciences* 2007;95(2):443-51.
5. Mattia C.J. Toluene-induced oxidative stress in several brain regions and other organs / C.J. Mattia, S.F. Ali, S.C. Bondy // *Molecular and Chemical Neuropathology*, August 2009, 18(3):313-328.
6. Влияние толуола на постнатальное развитие структур двигательной системы белых крыс / Д.П. Мусеридзе, Е.И. Дидимова, И.А. Брегвадзе [и др.] // *Изв. АН Грузии, серия биологическая*, 2004;30(4):541-46.
7. Hansson E. Toluene induces changes in the morphology of astroglia and neurons in striatal primary cell cultures / E. Hansson, G. von Euler, K. Fuxe, T. Hansson // *Toxicology*, 1988;49:155-63.
8. Baydas G. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis / G. Baydas, R.J. Reiter, V.S. Nedzvetskii [et al] // *Toxicol. Lett.*, 2003 Feb. 137(3):169-74.7.
9. Kanter M. Nigella sativa and derived Thimoquinone prevention hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats / M. Kanter // *Neurochem Res* 2008 March;33(3):579-88.
10. Сванидзе И.К. Коррекция изменений, вызванных толуолом в корковых и подкорковых структурах головного мозга белых крыс / И.К. Сванидзе, Д.П. Мусеридзе, Е.В. Дидимова [и др.] // *Известия РАН, серия биологическая*, 2007, 3:325-28.

Надійшла до редакції 06.04.2010