

# НОВЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## МОДЕЛЬ АЛКОГОЛЬНОЙ НЕЙРОПАТИИ У КРЫС

В. А. Кашкин<sup>1, 2</sup>, Е. В. Шекунова<sup>1, 2</sup>, А. А. Мужикян<sup>1</sup>,  
М. Н. Макарова<sup>1</sup>, В. Г. Макаров<sup>1</sup>

Изучены поведенческие и гистопатоморфологические признаки развития нейропатии на модели алкогольной нейропатии у самцов крыс линии Вистар. Показано, что к 8 неделе при хроническом потреблении крысами этанола в нарастающих концентрациях развивается нейропатия. Поведенческим маркером нейропатии является аллодиния, которая достигала значимого уровня к 8 неделе потребления алкоголя и сохранялась на протяжении исследования. Габапентин снижал выраженность аллодинии. Гистологическое изучение препаратов седалищного нерва, полученных от животных, умерщвленных в различные сроки алкоголизации (5, 10, 15 недель) показало, что гистопатоморфологическая картина различается по мере увеличения срока хронического потребления алкоголя. На начальных этапах морфологической основой наблюдаемых поведенческих проявлений нейропатии может служить избыточное отложение липидов в эпи- и периневрии. По мере увеличения сроков потребления этанола (от 10 до 15 недель) прогрессирует процесс распада миелиновых оболочек нервов и сопутствующее воспаление нервной ткани. Данный метод на различных этапах формирования патологии позволяет изучать анальгетические и нейропротекторные свойства препаратов, которые потенциально могут быть использованы для лечения нейропатий.

**Ключевые слова:** алкоголь; нейропатия; тактильная аллодиния; крысы.

## ВВЕДЕНИЕ

Алкогольная нейропатия — поражение периферического отдела нервной системы, являющееся наиболее частым осложнением острой и хронической алкогольной интоксикации. Предполагалось, что основной причиной нейропатии на фоне алкоголизма является дефицит тиамина в результате недостаточного поступления полного спектра питательных веществ в организм [13]. К такому заключению привела схожесть неврологической симптоматики больных алкоголизмом и страдающих болезнью бери-бери, развивающейся при недостатке тиамина. Однако при более детальном изучении был выявлен ряд особенностей, которые отличают развитие и течение алкогольной нейропатии. Например, дегенерация тонких нервных волокон и их демиелинизация за счет увеличения перехватов Ранвье наблюдались чаще при развитии алкогольной нейропатии, чем при нейропатии, вызванной дефицитом тиамина [7]. Кроме того, в клинических исследованиях показано, что симптомы алкогольной нейропатии не устраняются тиамином [11].

Вероятно, что в развитии алкогольной нейропатии основное значение имеет прямой нейротоксический

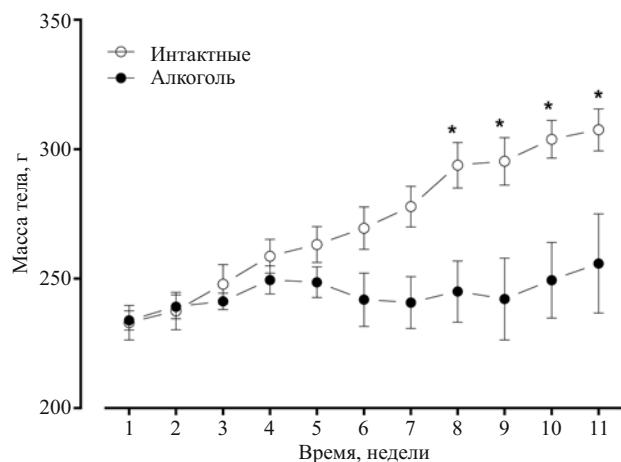
эффект этанола и его метаболитов [7]. Однако данные, полученные в последние годы, показали, что в развитии патологии может иметь значение такой индуцирующий нейродегенеративные процессы фактор как оксидативный стресс [3, 10]. На фоне хронического потребления алкоголя при окислительном стрессе происходит высвобождение цитокинов — медиаторов воспаления — и активация протеинкиназы С [4]. В развитии алкогольной нейропатии показана роль активации глутаматных mGlu5 рецепторов спинного мозга [9], опиоидергической системы и гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы [6, 12].

При развитии алкогольной нейропатии изменяются физиологические и морфологические характеристики периферических нервов. Выраженность гистопатоморфологических изменений зависит от сроков заболевания. На начальных стадиях наблюдается преимущественно поражение аксонов тонких волокон, поздние стадии характеризуются процессами регенерации тонких волокон. Может наблюдаться субпериневральный отек, который менее выражен, чем при нейропатии, обусловленной дефицитом тиамина, а также снижение диаметра нервных волокон и развитие связанной с денервацией миопатии [10].

В настоящее время для лечения этого вида нейропатий применяют симптоматическое лечение (анальгетики, антидепрессанты, противосудорожные средства), дающее лишь временное облегчение. Учитывая изменяющуюся в зависимости от сроков развития заболевания патоморфологическую картину, наблюдаемую в

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский институт фармации, Россия, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г. п. Кузьмоловский, д. б/н, корп. 245.

<sup>2</sup> Институт фармакологии им. А. В. Валдьмана, ПСПГМУ им. акад. И. П. Павлова, Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6 – 8.



**Рис. 1.** Динамика массы тела крыс на фоне форсированного потребления этанола в сравнении с контрольной группой.

Данные представлены в виде средних значений массы тела ( $M \pm m$ ). Измерения проводили еженедельно.

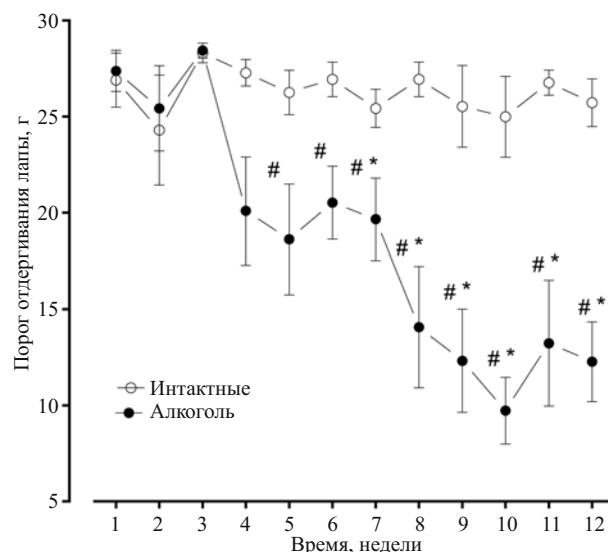
\*  $p < 0,05$ , значимые отличия между контрольной и опытной группами (тест Бонферрони).

клинике, для поиска оптимальных средств терапии необходимо детальное представление о динамике развития патоморфологических изменений в эксперименте. В данном исследовании предпринята попытка адаптации одной из существующих экспериментальных моделей развития алкогольной нейропатии с изучением динамики гистопатоморфологических изменений. Полученные результаты могут служить основой для исследований лекарственных препаратов с нейропротекторными и анальгетическими свойствами.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на самцах крыс линии Вистар массой 200 – 250 г (питомник “Рапполово”, Россия). Животных содержали в стандартных условиях при свободном доступе к воде и стандартному корму. За неделю до начала эксперимента животные были рассажены в клетки индивидуального содержания.

**Индукция алкогольной нейропатии.** Животных подвергали процедуре форсированного потребления алкоголя. Еженедельно процентная концентрация этанола повышалась в следующем порядке: 7,47, 12,68, 17,03, 21,6, 26,2 %. Далее до окончания эксперимента животные получали этанол в концентрации 26,2 %. Ежедневно животные получали доступ к питьевой воде на 1 ч. Доступ к корму не ограничивали. Еженедельно взвешивали животных и регистрировали количество потребленного алкоголя. Животные контрольной группы ( $n = 6$ ) получали корм и воду *ad libitum*. В первой серии экспериментов оценивали динамику развития нейропатии (поведенческая оценка) в течение 12 недель и влияние габапентина. Во второй – также оценивали динамику развития нейропатии (поведенческая оценка) и проводили забор гистологического ма-



**Рис. 2.** Развитие аллодинии на фоне форсированного потребления этанола в сравнении с контрольной группой.

Развитие аллодинии оценивали с помощью калиброванных микрофиламентов фон Фрея. Данные представлены в виде средних значений порога отдергивания задних лап ( $M \pm m$ ). Измерения проводили еженедельно.

\*  $p < 0,05$ , значимые отличия от показателей, полученных в первую неделю эксперимента у животных, потребляющих этанол (тест Бонферрони).

#  $p < 0,05$ , значимые различия между контрольной и опытной группой (тест Бонферрони).

териала в различные сроки развития патологии (5, 10, 15 недель).

**Поведенческая оценка развития алкогольной нейропатии.** Еженедельно оценивали развитие тактильной аллодинии с использованием калиброванных микрофиламентов фон Фрея (Stoelting, США) по методике “up-down method” [2]. Психофизиологический среднеэффективный порог тактильной реактивности рассчитывали по методу, описанному ранее [5].

**Гистологическое исследование.** Во второй серии экспериментов животных выводили из эксперимента в различные сроки от начала алкоголизации (5, 10, 15 недель), выделяли фрагменты ткани средней части седалищного нерва, которые фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. Далее материал проходил стандартную обработку. Для выявления миелиновых волокон и продуктов распада миелина поперечные и продольные срезы нервов, полученные на замораживающем микротоме, окрашивали суданом черным [1]. Ядра докрашивали гематоксилином Майера. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили при помощи светооптического микроскопа Carl Zeiss при увеличении 100, 200, 400.

Полуколичественно были оценены обнаруженные изменения: наличие суданофильных гранул; избыточное отложение липидов в эпи- и периневрии; мононуклеарная инфильтрация поврежденных волокон; наличие воспалительной инфильтрации эпиневирия.

Выраженность изменений оценивали по шкале в баллах: 0 — нет изменений; 1 — патологические изменения слабо выражены; 2 — патологические изменения умеренно выражены; 3 — патологические изменения значительно выражены.

Для оценки данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с повторными измерениями. При обнаружении достоверного влияния исследуемого фактора последующие межгрупповые сравнения проводили с использованием критерия Бонферрони. Различия были определены при уровне значимости  $p < 0,05$ . Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения SPSSv16 (IBM Corp., USA).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Масса тела животных и потребление этанола.** Взвешивание проводили еженедельно. Дисперсионный анализ с повторными измерениями показал, что потребление этанола в течение 12 недель привело к более медленному набору массы животными подопытной группы ( $F_{1,12} = 5,75, p < 0,05$ ) (рис. 1). Несмотря на снижение динамики набора массы у самцов, потребляющих этанол, каких-либо внешних признаков дистрофии или ухудшения общего состояния не отмечалось. Потребление алкоголя в максимальной концентрации в среднем составило  $(8,14 \pm 0,52)$  г/кг/день.

**Развитие аллодинии.** На рис. 2 представлены данные о развитии аллодинии у животных основной и контрольной групп на протяжении 12 недель потребления этанола. Дисперсионный анализ с повторными измерениями показал значимость фактора “потребление этанола” ( $F_{1,12} = 26,25, p < 0,01$ ). Различия в порогах между контрольной и подопытной группами наблюдались, начиная с 5-й недели эксперимента. Отличия от показателя, полученного в первую неделю, у животных, потребляющих этанол, были статистически значимыми к 7 неделе эксперимента.

**Влияние габапентина.** Для оценки возможности использования данной модели с целью изучения препаратов, обладающих обезболивающим свойством, изучено влияние габапентина (внутрибрюшинно). Одним из показаний к его применению является нейропатическая боль [8]. Однократное введение габапентина в дозе 50 мг/кг привело к выраженному снижению ал-

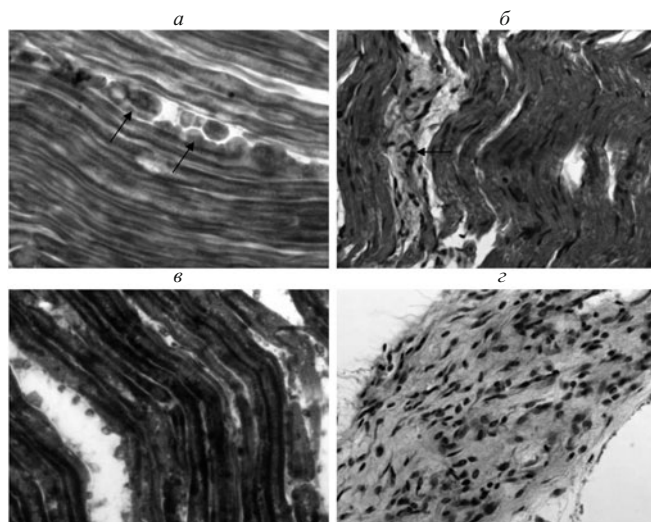


Рис. 3. Гистологический срез седалищного нерва крысы.

*а* – 10 неделя. Избыточное отложение липидов в перинеральной и эпинеуральной ткани. Окраска суданом черным.  $\times 400$ .

*б* – 15 неделя. Очаговая смешанноклеточная инфильтрация поврежденных нервных волокон. Отек межклеточной ткани. Окраска гематоксилин – эозин.  $\times 200$ .

*в* – 15 неделя. Между сохранившимися волокнами обнаруживается большое количество мелких гранул и капель, представляющих продукты распада миелина. Окраска суданом черным.  $\times 200$ .

*г* – 15 неделя. Смешанноклеточная инфильтрация ткани эпинеурия с преобладанием полиморфноядерных лейкоцитов. Окраска гематоксилин – эозином.  $\times 200$ .

лодинии ( $p < 0,05$ , тест Стьюдента) по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор  $(2,46 \pm 0,38)$  г и  $(13,5 \pm 3,02)$  г, соответственно через 1 ч после инъекции.

**Гистологический анализ.** В следующей серии экспериментов первая группа животных, получавших этанол, была выведена из эксперимента через 5 недель его потребления, вторая — через 10 недель, третья — через 15 недель от начала потребления этанола. Контрольные животные, получавшие воду, были умерщвлены на 15 неделе эксперимента.

Изучение поведенческих проявлений нейропатии показало, что у животных, умерщвленных на 10 или 15 неделе от начала потребления алкоголя, выраженность аллодинии была сопоставима, пороги реакции  $(4,32 \pm 1,31)$  г на 10 неделе и  $(6,46 \pm 2,13)$  г на 15 неделе,  $p > 0,05$  (критерий Стьюдента).

Степень выраженности гистологических изменений в седалищном нерве крыс. Результаты представлены как сумма баллов по группе,  $n = 4$

Группа (срок алкоголизации)	Признак					Сумма баллов по всем признакам в группе
	избыточное накопление липидов в эпинеурии	моноклеточная инфильтрация поврежденных волокон	периваскулярная инфильтрация в эндо- и перинеурии	наличие воспалительной инфильтрации эпинеурия	наличие суданофильных гранул	
5 недель	5	0	0	0	0	5
10 недель	5	0	0	0	0	5
15 недель	8	4	1	4	8	25

Гистологический анализ показал, что в микропрепаратах седалищного нерва имеются дегенеративные изменения, прогрессирующие по мере увеличения сроков алкоголизации (таблица). На начальных этапах развития нейропатии дегенеративные изменения проявлялись в избыточном накоплении липидов в эпиневрии (рис. 3, а). К 15 неделе добавлялось разрастание эндоневральной соединительной ткани, деформация и набухание миелиновых оболочек, отек межклеточной ткани (рис. 3, б).

На 15 неделе хронического потребления алкоголя в очагах демиелинизации встречались скопления мелких суданофильных гранул, свидетельствующих о распаде миелина (рис. 3, в). Отмечались грубые повреждения нервных стволов и волокон, проявляющиеся в виде выраженной полиморфноядерной инфильтрации периневрия и эпиневрия (рис. 3, г), очаговой дегенерации миелиновых оболочек, появлении большого количества продуктов распада миелина в виде суданофильных гранул. В поврежденных волокнах отмечалась умеренная и выраженная круглоклеточная инфильтрация. В наиболее тяжелых случаях определялись выраженные периваскулярные и очаговые инфильтраты.

На начальных этапах формирования нейропатии наблюдалось только избыточное отложение липидов в эпиневрии, которое характеризует вызванное алкоголем нарушение метаболических процессов, затрагивающее нервную ткань. По мере продолжения алкоголизации, помимо увеличения выраженности избыточного отложения липидов, наблюдалась мононуклеарная инфильтрация поврежденных волокон и наличие воспалительной инфильтрации эпиневрия, что свидетельствует о воспалении и развитии подострого неврита. Наряду с развитием воспаления происходил процесс распада миелиновых оболочек.

На основании полученных результатов можно говорить о разработке относительно простого протокола, который позволяет моделировать развитие алкогольной нейропатии у крыс в течение 2 – 3 мес.

В течение алкоголизации крысы потребляли около 8 г/кг этанола в день. По литературным данным аллодиния и гипералгезия фиксируются на 8 неделе от начала потребления алкоголя [13]. Этанол в исследовании [3] вводили в желудок дважды в день (10 г/кг/день), что является трудозатратным методом. В данном исследовании признаки алкогольной нейропатии (аллодиния) фиксировали уже на 7 неделе потребления алкоголя и продолжали регистрировать до 15 недель наблюдения.

В данном исследовании в качестве стандартного объекта для валидации методики был выбран габапентин, эффективный в клинике при лечении нейропатической боли различного генеза [8]. Уже при однократном введении габапентин заметно снижает выраженность аллодинии у экспериментальных животных [14]. Таким образом, модель позволяет оценивать эффективность анальгетических препаратов.

В качестве одного из наиболее надежных критериев степени развития патологического процесса возможно использование анализа гистологических микропрепаратов. Формирование аллодинии было сопряжено с развитием патологического нейродегенеративного процесса в седалищном нерве. Однако, несмотря на сопоставимую выраженность поведенческих проявлений нейропатии (аллодиния не прогрессировала по мере увеличения сроков эксперимента), гистопатоморфологическая картина усугублялась с увеличением сроков алкоголизации. Ранние этапы характеризовались нарушением обменных процессов в нервной ткани, что отражалось в избыточном отложении липидов в эпиневрии. По мере увеличения длительности потребления этанола увеличивалась и выраженность нарушений обмена веществ, наблюдалось присоединение признаков распада миелиновых оболочек и воспаления нервной ткани. Однако не все экспериментальные подходы в полной мере воспроизводят ключевые патоморфологические признаки, наблюдаемые в клинике. Например, после 8 недель хронического потребления алкоголя патологические изменения включали дистрофию мышечных волокон, снижение диаметра нервных волокон, увеличение аксональной регенерации, однако выраженной демиелинизации не наблюдали [10]. Очевидно, выявленные нами изменения являются результатом длительного потребления алкоголя и, в большей степени, отражают картину, которая имеет место в клинике.

Установленные ключевые сроки развития патологического процесса позволяют предположить, что при изучении эффектов препаратов, которые потенциально могли бы быть использованы в лечении болевого синдрома при нейропатиях, экспериментальное исследование можно начинать на ранних этапах развития патологии (от 8 недель хронической алкоголизации). В то же время предложенный подход дает возможности для изучения нейропротекторного потенциала веществ. Для эффективного изучения данного механизма действия исследование должно включать как минимум, 15-недельный период хронической алкоголизации. Таким образом, разработанная модель развития алкогольной нейропатии представляет определенный интерес для исследований лекарственных препаратов с нейропротекторным и анальгетическим свойствами.

## ВЫВОДЫ

1. При хроническом потреблении крысами этанола в нарастающих концентрациях к 8 неделе развивается алкогольная нейропатия, которая характеризуется тактильной аллодинией и сопряжена с развитием патологического нейродегенеративного процесса в седалищном нерве.

2. На начальных этапах развития патологии её гистологической основой служит избыточное отложение липидов в эпиневрии. Через 10 – 15 недель



прогрессирует процесс распада миелиновых оболочек нервов и сопутствующее воспаление нервной ткани.

3. Для изучения нейропротекторного или обезболивающего действия исследуемых препаратов исследование должно включать, как минимум, 15-недельный период хронической алкоголизации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. И. Чумасов, *Методические разработки по диагностике демиелизирующих заболеваний человека и животных*, Санкт-Петербург (1993), сс. 1 – 16.
2. S. R. Chaplan, F. W. Bach, J. W. Pogrel, et al., *J. Neurosci. Methods*, **53**, 55 – 63 (1994).
3. S. M. De la Monte, L. Longato, M. Tong, et al., *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **6**, 2055 – 2075 (2009).
4. O. A. Dina, R. W. Gear, R. O. Messing, J. D. Levine, *Neuroscience*, **145**, 350 – 356 (2007).
5. W. J. Dixon, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **20**, 441 – 462 (1980).
6. C. Gianoulakis, X. Dai, T. Brown, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **27**, 410 – 423 (2003).
7. H. Koike, M. Iijima, M. Sugiura и др., *Ann. Neurol.*, **54**(1), 19 – 29 (2003).
8. A. Mack, *J. Manag. Care Pharm.*, **9**, 559 – 568 (2003).
9. K. Miyoshi, M. Narita, M. Takatsu, T. Suzuki, *Eur. J. Pharmacol.*, **562**, 208 – 211 (2007).
10. V. A. Nguyen, T. Le, M. Tong, et al., *Nutrients*, **4**, 1042 – 1057 (2012).
11. T. J. Peters, J. Kotowicz, W. Nyka, et al., *Alcohol Alcohol.*, **41**, 636 – 642 (2006).
12. J. F. Thayer, M. Hall, J. J. Sollers, J. E. Fischer, *Int. J. Psychophysiol.*, **59**, 244 – 250 (2006).
13. V. Tiwari, A. Kuhad, K. Chopra, *Pain*, **145**, 129 – 135 (2009).
14. J. Wallin, J. G. Cui, V. Yakhnitsa, et al., *Eur. J. Pain*, **6**(4), 261 – 272 (2002).

Поступила 29.02.16

## EXPERIMENTAL MODELS OF ALCOHOLIC NEUROPATHY IN RATS

V. A. Kashkin<sup>1, 2</sup>, E. V. Shekunova<sup>1, 2</sup>, A. A. Muzhikyan<sup>1</sup>, M. N. Makarova<sup>1</sup>, and V. G. Makarov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> St.-Petersburg Institute of Pharmacy, Kuzmolovo, Vsevolozhskii District, Leningrad oblast, 188663 Russia;

<sup>2</sup> A.V. Valdman Institute of Pharmacology, I.P. Pavlov First State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6 – 8, St. Petersburg, 197022 Russia

The aim of this work was to study the behavioral and histopathomorphological signs of peripheral neuropathy development in male Wistar rats on the model of alcoholic neuropathy. Chronic consumption of ethanol solution with concentration increasing from 7.47 to 26.2% (w/w) resulted in neuropathy (allodynia) development after 8 weeks of chronic alcohol administration. The behavioral signs of allodynia became significant on the 8th week and were retained up to the end of experiment (15 weeks of ethanol administration). The reference drug gabapentin effectively reduced the manifestation of allodynia. Histological examination of sciatic nerve preparations from animals killed after ethanol consumption for 5, 10 and 15 weeks revealed the development of histopathomorphological pattern with increasing duration of chronic alcoholization. At the initial stage, the morphological basis of observed behavioral manifestations was provided by excess lipid deposition in peri/epineurium of nerve specimens). The further increase in treatment duration (up to 10 and 15 weeks) was associated with demyelination and development of inflammation of the sciatic nerve. This experimental model allows one to investigate the efficacy of new neuroprotective and analgesic substances – potential drugs for both prevention and management of neuropathy.

**Keywords:** alcohol; neuropathy; tactile allodynia; rats.