

НАРУШЕНИЯ СИНАПТОГЕНЕЗА В КОРЕ МОЗГА КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ АНТЕНАТАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ АЛКОГОЛЯ

Бонь Е. И. (kudyan@tut.by), Зиматкин С. М. (zimatkin@grsmu.by)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Введение. Потребление алкоголя во время беременности приводит к развитию ряда специфических нарушений в организме потомства, объединяемых в понятие «фетальный алкогольный синдром» (ФАС), входящий в «спектр нарушений плода, вызванных алкоголем» (fetal alcohol spectrum disorders, FASD).

Цель работы: оценка влияния антенатальной алкоголизации на синаптогенез во внутреннем пирамидном слое фронтальной коры головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе.

Материал и методы: эксперименты выполнены на 12 самках беспородных белых крыс и родившемся от них потомстве, использовались иммуногистохимические и электронно-микроскопические методы.

Результаты: антенатальная алкоголизация приводит к уменьшению экспрессии маркера синаптических пузырьков, синаптофизина, нарушению ультраструктуры синапсов и уменьшению числа синаптических пузырьков.

Выводы: антенатальная алкоголизация вызывает нарушение синаптогенеза во внутреннем пирамидном слое фронтальной коры головного мозга крыс.

Ключевые слова: антенатальная алкоголизация, кора головного мозга, синаптофизин.

Введение

Потребление алкоголя во время беременности приводит к развитию ряда специфических нарушений в организме потомства, объединяемых в понятие «фетальный алкогольный синдром» (ФАС), входящий в «спектр нарушений плода, вызванных алкоголем» (fetal alcohol spectrum disorders, FASD) [1]. Согласно данным литературы, кора головного мозга особенно чувствительна к пренатальному воздействию этанола [2], которое уменьшает в ней число и размеры нейронов у животных, снижает в клетках содержание белка, вызывает апоптоз. При этом в сенсомоторной коре крысят наблюдаются морфологические признаки задержки развития нейронов, деструктивные и дистрофические изменения в них (кариоцитоллиз, хроматолиз, появление «клеток-теней»), значительные ультраструктурные нарушения [3, 4, 5]. В наших предыдущих исследованиях установлено, что потребление алкоголя крысами во время беременности индуцирует у потомства гибель части нейронов коры мозга, а в постнатальный период – набухание, затем сморщивание и прекращение роста нейронов [6]. Вместе с тем оценка динамики синаптогенеза в коре мозга после антенатальной алкоголизации с помощью молекулярных маркеров не проводилась.

Синаптофизин (СФ) – это трансмембранный гликопротеин мелких синаптических пузырьков нейронов. С помощью ультраструктурной иммуноцитохимии СФ выявлен во всех малых (не содержащих пептиды) синаптических пузырьках в нервной системе, независимо от того, какой медиатор они содержат, но не был обнаружен в мембранах крупных пептид-содержащих пузырьков. Основные функции СФ связывают с формированием синаптических пузырьков, выделением из них нейромедиаторов и синаптогенезом. Известно, что мембрана синаптических пузырьков обогащена холестерином в сравнении с другими мембранами нейронов. Было по-

казано, что одним из основных холестерин-связывающих белков пузырьков является СФ. На этом факте основывается мнение, что он является одним из ключевых белков, необходимых для биогенеза синаптических пузырьков [7, 8].

Цель исследования – морфологическая оценка влияния антенатальной алкоголизации на синаптогенез во внутреннем пирамидном слое фронтальной коры головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 12 самках беспородных белых крыс с исходной массой 230 ± 20 г и родившемся от них потомстве (48 крыс). Все опыты проведены с учетом «правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» [9]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 11.03.2014). Животные находились на стандартном рационе вивария. Крысы опытной группы на протяжении всей беременности (со дня обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках до родов) получали 15% раствор этанола в качестве единственного источника питья, а животные контрольной группы – эквивалентное количество воды (среднее количество выпиваемой жидкости – 6 мл). Среднее потребление алкоголя беременными самками составляло $3,6 \pm 2$ г/кг/сутки. От каждой самки брали по одному крысенку по достижении ими возраста 5, 10, 20 и 45 суток и декапитировали. Для получения сопоставимых результатов от всех животных образцы фронтальной коры головного мозга обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Для иммуногистохимического исследования их фиксировали в цинк-формалине при $+4^\circ\text{C}$ (на ночь), а затем после обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации и ксилолов заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы (LeicaRM 2125

RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Для иммуногистохимического выявления СФ применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Novex (в разведении 1:400, при +4°C, 20 часов, во влажной камере). Связавшиеся первичные антитела детектировали с помощью набора EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit novex. Соседние срезы окрашивали 0,1% раствором тионина по методу Ниссля. Расположение фронтальной коры в гистологических препаратах мозга крыс устанавливали по стереотаксическому атласу [10]. В иммуногистохимических препаратах изучали иммунореактивность СФ в пятом слое фронтальной коры (качественно и количественно) путем измерения оптической плотности осадка хромогена. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование и цитофотометрию проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США).

Для электронно-микроскопического исследования у потомства опытных и контрольных животных на 5, 20 и 45 сутки после рождения вырезали нужные участки коры и помещали их в 1% осмиевый фиксатор на буфере Миллонига (рН = 7,4) на 2 ч при температуре +4° С. Далее их промывали в смеси буфера Миллонига (20 мл) и сахарозы (900 мг), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, смеси спирта и ацетона и ацетоне, проводили через смесь смол (аралдит М + аралдит Н + дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона, затем заключали в эту заливочную смесь смол. Полутонкие срезы (толщиной около 0,35 мкм) изготавливали на ультрамикротоме MT-7000 (RMC, США), окрашивали метиленовым синим и вырезали лезвием необходимые для изучения участки внутреннего пирамидного слоя. Ультратонкие срезы (толщиной около 35 нм) изготавливали на том же ультрамикротоме, собирали на опорные сеточки, контрастировали ацетатом урана и цитратом свинца. Для этого сеточки со срезами опускали в каплю уранилацетата и выдерживали 20 мин. в темноте при комнатной температуре, затем промывали в трех порциях бидистиллированной воды по 5 сек. и контрастировали цитратом свинца в течение 8 мин., промывали в трех порциях бидистиллированной воды по 5 секунд. Полученные препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) и фотографировали цифровой камерой Olympus MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия).

Полученные средние цифровые данные от каждого животного анализировали методами непараметрической статистики посредством программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me), границы процентилей (от 25 до 75) и интерквартильного диапазона (IQR). Количественные результаты представлены в виде Me – медиана, LQ – верхняя граница нижнего квартиля; UQ –

нижняя граница верхнего квартиля. Достоверными считали различия между контрольной и опытной группами при значениях $p < 0,05$ (Mann-Whitney U-test) [11]. Цифровые показатели представлены в виде графика (рис. 2).

Результаты и обсуждение

Установлено, что в постнатальном онтогенезе во фронтальной коре как у контрольных, так и у опытных животных наблюдалось прогрессивное нарастание экспрессии СФ, что связано с увеличением количества синаптических пузырьков в синапсах нейропилы. Уже на 5-е сутки после рождения иммунореактивность СФ в нейропиле внутреннего пирамидного слоя у антенатально алкоголизованных животных заметно уступала таковой в контроле. На 10-е сутки постнатального развития достоверных различий не наблюдалось. На 20-е и 45-е сутки после рождения в нейропиле внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры мозга антенатально алкоголизованных крыс экспрессия СФ была значительно ниже, чем в контроле, и на 45-е сутки носила очаговый характер (рис. 1, 2). Это указывает на нарушение синаптогенеза. Причем в светлых участках синапсы почти отсутствовали, а в темных они содержали меньше СФ (рис. 1, 2). Это может быть связано с гибелью части внутренних пирамидных нейронов после антенатальной алкоголизации еще в эмбриогенезе и продолжающимся их повреждением в постнатальном периоде.

Как было указано нами ранее, после 20-х суток постнатального развития потомства крыс, получавших алкоголь во время беременности, происходят остановка роста и сморщивание нейронов внутреннего пирамидного слоя коры мозга [6], а также значительные ультраструктурные нарушения нейронов [12].

На электронно-микроскопическом уровне во внутреннем пирамидном слое после антенатальной алкоголизации наблюдалось снижение плотности расположения синапсов, в них содержалось меньшее количество синаптических пузырьков, в основном не связанных с пресинаптической мембраной, что характерно для незрелых синапсов (рис. 3, 4). На снижение плотности расположения синапсов и меньшее количество синаптических пузырьков указывает и меньшая экспрессия синаптофизина (рис. 2).

Выводы

Таким образом, установлено, что содержание СФ в нейропиле нейронов пятого слоя фронтальной коры головного мозга крыс с 5-х по 45-е сутки постнатального развития постепенно закономерно нарастает, что связано с прогрессивным синаптогенезом, особенно в период с 10-х по 20-е сутки постнатального развития. Во фронтальной коре мозга антенатально алкоголизованных крыс экспрессия СФ заметно снижена, что указывает на нарушение формирования синаптических пузырьков и синаптогенеза в целом. Полученные результаты в целом соответствуют литературным данным, согласно

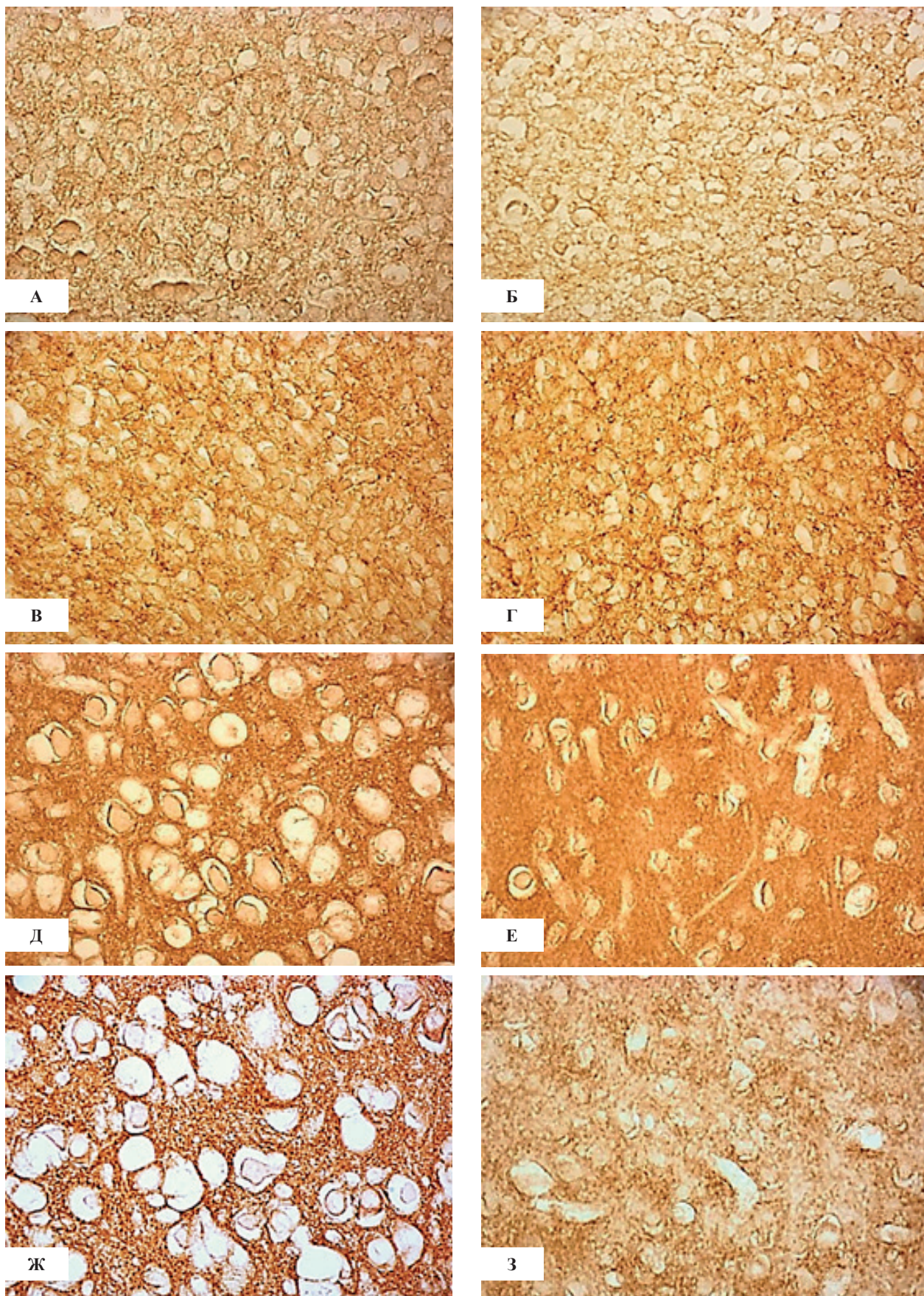


Рисунок 1. – Экспрессия СФ в нейрониле 5-го слоя фронтальной коры контрольных крысят (А, В, Д, Ж) и снижение её у пренатально алкоголизированных крыс (Б, Г, Е, З) на 5 (А, Б), 10 (В, Г), 20 (Д, Е) и 45-е (Ж, З) сутки после рождения. Экспрессия СФ. Цифровая микрофотография. Ув. 400

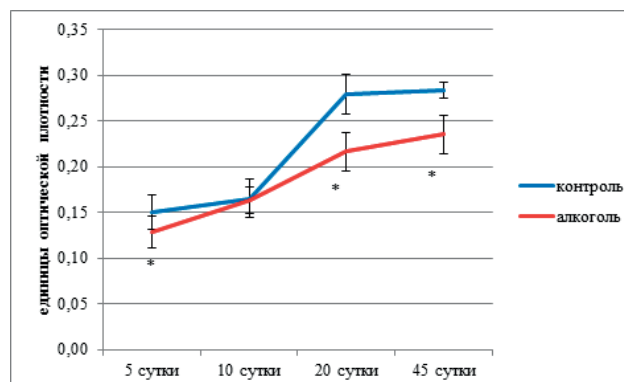


Рисунок 2. – Изменение экспрессии СФ в пятом слое фронтальной коры мозга крыс в разные сроки после рождения, * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

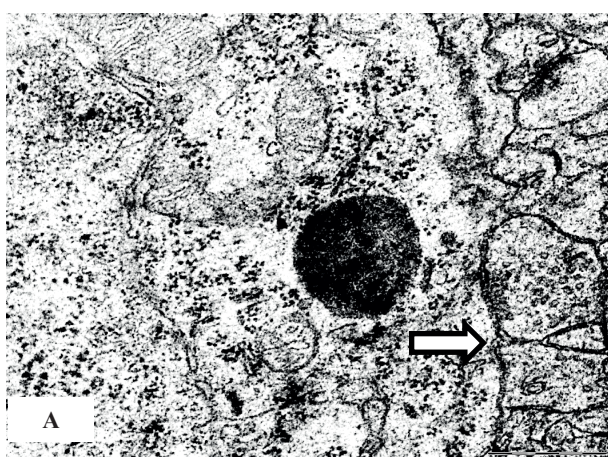
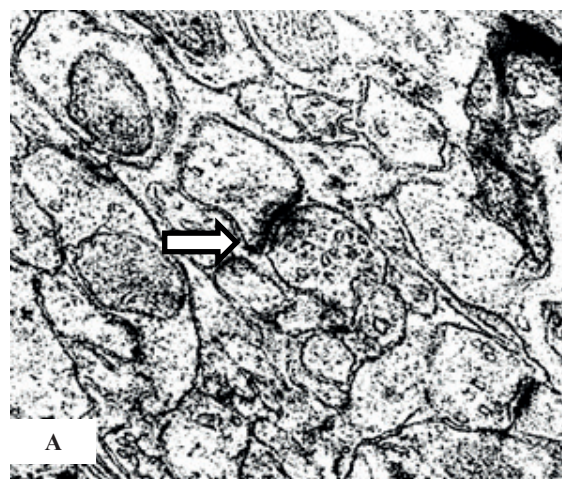


Рисунок 3. – Аксосоматические синапсы на внутренних пирамидных нейронах фронтальной коры 45-суточных крыс. А – контроль. Б – антенатальное воздействие алкоголя (набухшая пресинаптическая часть, низкая плотность расположения синаптических пузырьков на гиперхромном сморщенном нейроне). Синапсы показаны стрелками. Увеличение: 50000.

Электроннограммы

которым пренатальная алкоголизация вызывает снижение уровня экспрессии пресинаптических белков complexin I и II в префронтальной коре [7, 8].

Рисунок 4. – Аксодендритические синапсы в нейроне внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры 45-суточных крыс. А – контроль.

Б – антенатальное воздействие алкоголя (уменьшено количество синаптических пузырьков). Синапсы показаны стрелками. Увеличение: 50000.

Электроннограммы.

Выявленные нарушения синапсов коры головного мозга могут лежать в основе известных неврологических и поведенческих нарушений (слуховой дисфункции, неспособности к обобщению и обучению, когнитивных, сенсомоторных и эмоциональных расстройств), обнаруживаемых у потомства животных, потреблявших алкоголь во время беременности [13].

Заключение

Таким образом, антенатальная алкоголизация приводит к нарушению синаптогенеза во внутреннем пирамидном слое фронтальной коры головного мозга крыс, что проявляется в уменьшении экспрессии маркера синаптических пузырьков, синаптофизина, нарушении ультраструктуры синапсов и уменьшении числа синаптических пузырьков. Выявленные изменения носят долгосрочный характер и сохраняются на 45-е сутки постнатального развития.

Литература

1. Riley, E. P. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview / E. P. Riley, M. A. Infante, K. R. Warren // *Neuropsychology Review*. – 2011. – Vol. 21 (2). – P. 73-80. – doi: 10.1007/s11065-011-9166-x.
2. Зиматкин, С. М. Влияние алкоголя на развивающийся мозг / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // *Морфология*. – 2014. – Т. 145, № 2. – С. 79-88.
3. Smith, D. W. Fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects / D. W. Smith // *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. – 1981. – Vol. 3. – P. 127.
4. Зиматкин, С. М. Алкогольный синдром плода : монография / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь. – Минск : Новое знание, 2014. – 207 с.
5. Poskitt, E. M. Fetal alcohol syndrome / E. M. Poskitt // *Alcohol and Alcoholism*. – 1984. – Vol. 19. – P. 159-165.
6. Zimatkin, S. M. Dynamics of histological changes in the frontal cortex of the brain in rats subjected to antenatal exposure to alcohol / S. M. Zimatkin, E. I. Bon // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2017. – Vol. 47, iss. 3. – P. 370-374. – doi: 10.1007/s11055-017-0407-1.
7. Eastwood, S. L. Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons / S. L. Eastwood, P. J. Harrison // *Schizophrenia Research*. – 2005. – Vol. 73, iss. 2/3. – P. 159-172. – doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2004.05.010>.
8. Prenatal ethanol exposure in rats decreases levels of complexin proteins in the frontal cortex / A. M. Barr [et al.] // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2005. – Vol. 29 (11). – P. 1915-1920. doi: 10.1097/01.alc.0000187806.68957.0a.
9. Копаладзе, Р. А. Биоэтика : Эксперименты на животных – история, состояние, перспективы : монография / Р. А. Копаладзе. – Москва : Компания Спутник+, 2003. – 65 с.
10. Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – 6th ed. – London : Academic Press, 2007. – 448 p.
11. Батин, Н. В. Компьютерный статистический анализ данных : учебно-методическое пособие / Н. В. Батин. – Минск : Институт подготовки научных кадров НАН Беларуси, 2008. – 160 с.
12. Бонь, Е. И. Особенности органеллогенеза в нейронах коры мозга крыс после пренатальной алкоголизации / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. – 2017. – № 1. – С. 123-128.
13. Зиматкин, С. М. Психические и поведенческие нарушения после антенатальной алкоголизации / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь, О. С. Зиматкина // *Новости медико-биологических наук*. – 2016. – Т. 13, № 2. – С. 159-165.

References

1. Riley EP, Infante MA, Warren KR. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychology Review*. 2011;21(2):73-80. doi: 10.1007/s11065-011-9166-x.
2. Zimatkin SM, Bon EI. Vliyanie alkogolja na razvivajushhij mozg [The effect of alcohol on the developing brain]. *Morfologija* [Morphology]. 2014;145(2):79-88. (Russian).
3. Smith DW. Fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 1981;3:127.
4. Zimatkin SM, Bon EI. Alkogolnyj sindrom ploda [Fetal alcohol syndrome]. Minsk: Novoe znanie; 2014. 207 p. (Russian).
5. Poskitt EM. Fetal alcohol syndrome. *Alcohol and Alcoholism*. 1984;19:159-165.
6. Zimatkin SM, Bon EI. Dynamics of histological changes in the frontal cortex of the brain in rats subjected to antenatal exposure to alcohol. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2017;47(3):370-374. doi: 10.1007/s11055-017-0407-1.
7. Eastwood SL, Harrison PJ. Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons. *Schizophrenia Research*. 2005;73(2/3):159-172. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2004.05.010>.
8. Barr AM, Hofmann CE, Phillips AG, Weinberg J, Honer WG. Prenatal ethanol exposure in rats decreases levels of complexin proteins in the frontal cortex. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2005;29(11):1915-1920. doi: 10.1097/01.alc.0000187806.68957.0a.
9. Kopaladze RA. Biojetika : Jeksperimenty na zhivotnyh – istorija, sostojanie, perspektivy [Bioethics: Experiments on animals – history, condition, prospects]. Moscow: Kompanija Sputnik; 2003. 65 p. (Russian).
10. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. London: Academic Press; 2007. 448 p.
11. Batin NV. Kompjuternyj statisticheskij analiz dannyh [Computer statistical analysis of data: the teaching method]. Minsk: Graduate School of the National Academy of Sciences of Belarus; 2008. 160 p. (Russian).
12. Bon EI. Osobennosti organellogeneza v nejronah kory mozga krysa posle prenatal'noj alkogolizacii [Organellogenesis features in the neurons of the cerebral cortex of rats after prenatal alcoholization]. *Izvestija Nacionalnoj akademii nauk Belarusi. Serija medicinskih nauk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series]. 2017;1:123-128. (Russian).
13. Zimatkin SM, Bon EI, Zimatkina OS. Psihicheskie i povedencheskie narushenija posle antenatalnoj alkogolizacii [Mental and behavioral disorders after antenatal alcoholization]. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of medical and biological sciences]. 2016;13(2):159-165. (Russian).

DISRUPTION OF SYNAPTOGENESIS IN THE RATS BRAIN CORTEX AFTER ANTENATAL ALCOHOLISATION

Bon L. I., Zimatkin S. M.

Educational Institution "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

Background. Alcohol consumption during pregnancy induces the development of a number of specific disorders in offspring that are combined under the term Fetal Alcohol Syndrome (FAS), which is a part of Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD).

The aim of this study was to assess the effect of antenatal alcoholisation on synaptogenesis in the inner pyramidal layer of the frontal cerebral cortex of rats in postnatal ontogenesis.

Material and methods: experiments were performed on 12 female white rats and their offspring, using immunohistochemistry and electron microscopy methods.

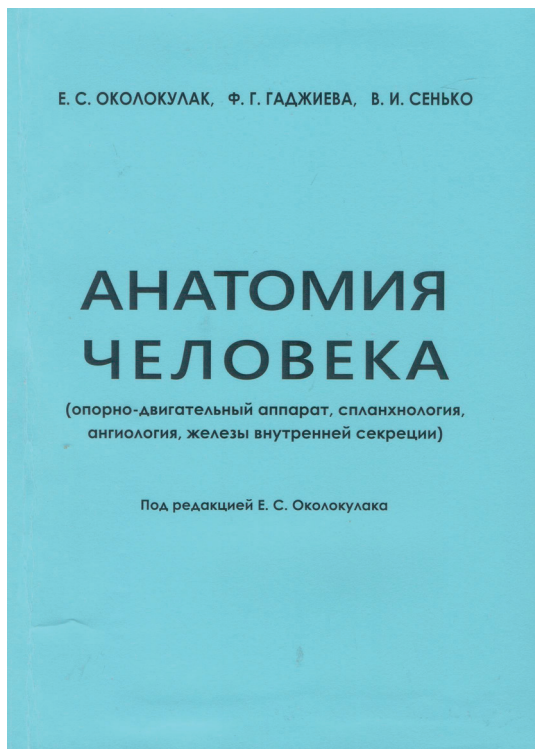
Results: antenatal alcoholisation leads to decrease in the expression of the marker of synaptic vesicles, synaptophysin, disruption of the synapse ultrastructure, and a decrease in the number of synaptic vesicles.

Conclusions: antenatal alcoholisation leads to disruption of synaptogenesis in the inner pyramidal layer of the frontal cerebral cortex of the rat.

Keywords: antenatal alcoholisation, cerebral cortex, synaptophysin.

Поступила: 11.04.2017

Отрецензирована: 20.06.2017



Околоулак, Евгений Станиславович.

Анатомия человека : (опорно-двигательный аппарат, спланхиология, ангиология, железы внутренней секреции) : пособие для студентов лечебного (специальность 1-79 01 01 "Лечебное дело"), педиатрического (специальность 1-79 01 02 "Педиатрия", медико-психологического (специальность 1-79 01 05 "Медико-психологическое дело") факультетов / Е. С. Околоулак, Ф. Г. Гаджиева, В. И. Сенько ; под ред. Е. С. Околоулака ; Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет", Кафедра нормальной анатомии. – Гродно : ГрГМУ, 2017. – 411 с. – ISBN 978-985-558-827-7.

Пособие «Анатомия человека» подготовлено в соответствии с типовой учебной программой по дисциплине «Анатомия человека» для высших учебных заведений по специальности «лечебное дело», «педиатрия», «медико-психологическое дело».

Данное пособие содержит сведения о строении, функции, развитии и пороках развития организма человека.

Термины даны в соответствии с Международной анатомической номенклатурой (2003).

Пособие предназначено для студентов лечебного, педиатрического и медико-психологического факультетов медицинских университетов.