

УДК 616.89-008.441.13:618.33

*Е. И. БОНЬ, С. М. ЗИМАТКИН*

## **ИНВОЛЮЦИЯ НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОТОМСТВА КРЫС, ПОТРЕБЛЯВШИХ АЛКОГОЛЬ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ**

*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь, e-mail: zimatkin@grsmu.by*

В работе показано, что в коре головного мозга антенатально алкоголизованных крыс происходят глубокие и разнообразные гистологические изменения, которые в постнатальном онтогенезе носят долговременный и прогрессирующий характер. Так, выявлено увеличение (на 2-е и 5-е сутки), а затем уменьшение (на 10-е и 90-е сутки) толщины коры, снижение относительного количества нейронов пятого слоя коры, увеличение числа патологических форм нейронов во все сроки исследования. Особенно следует отметить сморщивание и остановку роста нейронов коры мозга спустя 10 сут постнатального развития.

*Ключевые слова:* кора головного мозга, нейроны, антенатальная алкоголизация.

*E. I. BON, S. M. ZIMATKIN*

## **INVOLUTION OF THE NEURONS IN THE CEREBRAL CORTEX OF THE OFFSPRING RATS CONSUMING ALCOHOL DURING PREGNANCY**

*Grodno State Medical University, Grodno, Belarus, e-mail: zimatkin@grsmu.by*

The article presents deep and diverse histological changes in the cerebral cortex of antenatal alcoholised rats. During postnatal ontogenesis these changes are long-term and progressive in character. So, there were an increase (on the 2<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> days) and then a decrease in the thickness of the brain cortex (on the 10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days), as well as a decrease in the relative number of neurons in the 5<sup>th</sup> layer of the cortex and an increase in the number of pathological forms of neurons in all research terms. Of particular interest are the shrinkage and the stop of the growth of neurons in the cortex after 10 days of the postnatal development.

*Keywords:* fetal alcohol syndrome, cerebral cortex.

**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, 2]. Согласно литературным данным, кора головного мозга особенно чувствительна к пренатальному воздействию этанола [3, 4]. Этанол индуцирует в ней апоптоз, дегенеративные изменения, уменьшение числа и размера нейронов, снижение в них содержания белка и недоразвитие цитоплазмы [5]. При этом в сенсомоторной коре крысят наблюдаются признаки задержки развития нейронов, значительные ультраструктурные нарушения в них [2, 6]. Вместе с тем динамика гистологических изменений в разных отделах коры не оценивалась и систематические морфометрические исследования нейронов в постнатальном онтогенезе у этих животных не проводились.

Цель настоящей работы – сравнительное изучение влияния пренатальной алкоголизации на гистологические характеристики нейронов цингулятной, фронтальной и париетальной коры головного мозга крыс разного возраста.

**Материалы и методы исследования.** Опыты выполнены на 25 самках беспородных белых крыс с начальной массой  $230 \pm 20$  г и их потомстве (175 крысят). Все опыты проведены с учетом правил проведения работ с использованием экспериментальных животных [7]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета.

Животные находились на стандартном рационе вивария. Крысы опытной группы на протяжении всей беременности (от дня обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках до родов) получали 15 %-ный раствор этанола в качестве единственного источника питья, а животные контрольной группы – эквивалентное количество воды. Среднее потребление алкоголя беременными самками составляло  $4 \pm 2$  г/кг/сут. Забой крысят осуществляли на 2, 5, 10, 20, 45 и 90-е сутки после рождения. После декапитации быстро извлекали головной мозг, кусочки переднего отдела коры больших полушарий фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы окрашивали 0,1 %-ным толуидиновым синим по методу Ниссля и на выявление рибонуклеопротеинов (РНП) по Эйнарсону.

Изучение, микрофотографирование, морфометрию гистологических препаратов и денситометрию осадка хромогена в них проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (LeicaDFC 320, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). Расположение цингулятной, фронтальной и париетальной коры в гистологических препаратах мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [8]. У каждого животного оценивали не менее 30, а в каждой экспериментальной группе – 150 нейронов пятого слоя коры, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа.

Полученные по каждому животному средние цифровые данные анализировали методами непараметрической статистики с помощью 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, верхней границы нижнего квартиля (LQ) и нижней границы верхнего квартиля (UQ). Достоверными считали различия между контрольной и опытной группами при значениях  $p < 0,05$  (Mann–Whitney *U*-test) [9].

**Результаты и их обсуждение.** Достоверные различия массы тела, массы мозга и соотношения массы мозга к массе тела у контрольных и опытных крысят не обнаружены.

Установлено, что у контрольных крысят со 2-х по 90-е сутки после рождения происходит прогрессивное утолщение всех изучаемых отделов коры в 2,5–3 раза (рис. 1). У крысят, подвергавшихся антенатальной алкоголизации, на 2-е и 5-е сутки после рождения кора значительно толще. Это может быть связано с отеком коры, что подтверждается картиной периваскулярного отека и набухания нейронов в гистологических препаратах. На 10-е сутки фронтальная и париетальная кора становится значительно тоньше, чем в контроле, возможно, из-за прекращения ее отека. На 20-е и 45-е сутки эти различия в основном исчезают, но на 90-е сутки происходит повторное уменьшение толщины фронтальной и париетальной коры по сравнению с таковой в контроле (рис. 1). Последнее может быть связано со сморщиванием нейронов у антенатально алкоголизованных крыс.

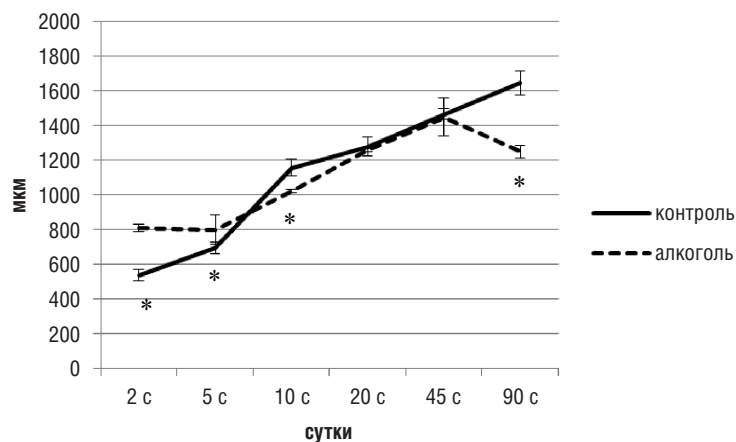


Рис. 1. Изменение толщины фронтальной коры мозга крыс в разные сроки после рождения, мкм; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

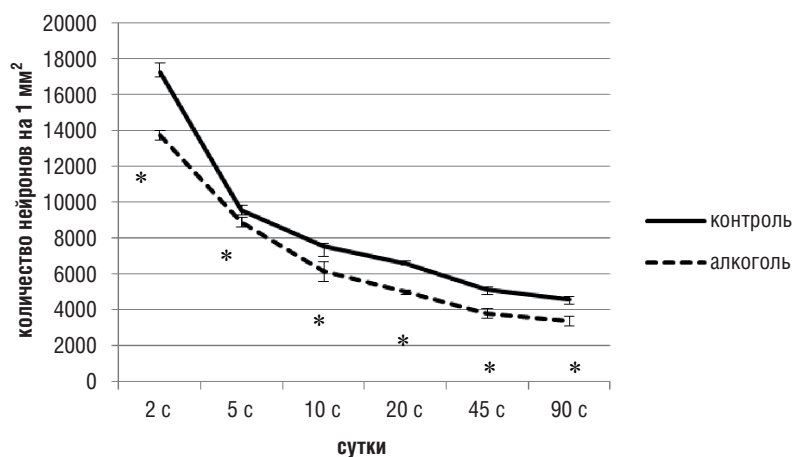


Рис. 2. Плотность расположения нейронов в пятом слое парietальной коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе на площади 1 мм<sup>2</sup>; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

У опытных и контрольных животных со 2-х по 90-е сутки постнатального онтогенеза в коре головного мозга наблюдалось закономерное уменьшение (примерно в 3 раза) плотности расположения тел нейронов, что связано с ростом нейронов (рис. 2). Однако во все сроки исследования и во всех изученных отделах коры мозга алкоголизованных крысят количество нейронов на единицу площади среза было на 10–25 % меньше (рис. 2). Возможно, это связано с гибелью части нейронов под действием алкоголя еще в период эмбриогенеза. Соответственно, этот дефицит нейронов в коре мозга сохраняется на протяжении всего постнатального онтогенеза.

У контрольных животных во все сроки постнатального развития на препаратах, окрашенных по Ниссию, процентное соотношение нейронов по степени хромотофилии цитоплазмы изменялось, однако среди них всегда преобладали нормохромные клетки (60–70 %). У опытных животных в пятом слое коры мозга во все сроки выявлено уменьшение числа нормохромных нейронов и повышение количества патологических форм нейронов (гипер-, гипохромных нейронов и клеток-теней). Наибольшие изменения в изучаемых отделах коры отмечались на 20–90-е сутки постнатального развития. Например, на 45-е сутки во фронтальной коре количество нормохромных нейронов меньше в 2 раза, а число гиперхромных сморщенных, гипохромных клеток и клеток-теней выше, чем в контроле, на 66, 20 и 40 % соответственно (рис. 3, 4). Следует отметить, что гиперхромные сморщенные нейроны у контрольных животных немногочисленны, а на 90-е сутки совсем исчезают, в то время как у крыс, подвергавшихся антенатальной алкоголизации, их количество на 20–90-е сутки резко возрастает (рис. 5).

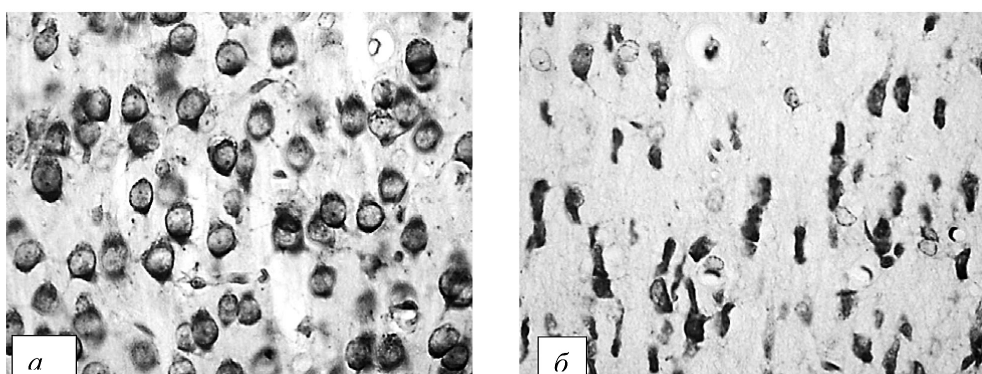


Рис. 3. Нейроны пятого слоя цингулятной коры (цифровая микрофотография) 45-суточных крысят: *а* – контроль (преобладают нормохромные нейроны); *б* – антенатальная алкоголизация (преобладают гиперхромные и гиперхромные сморщенные нейроны). Окраска по Ниссию.  $\times 400$

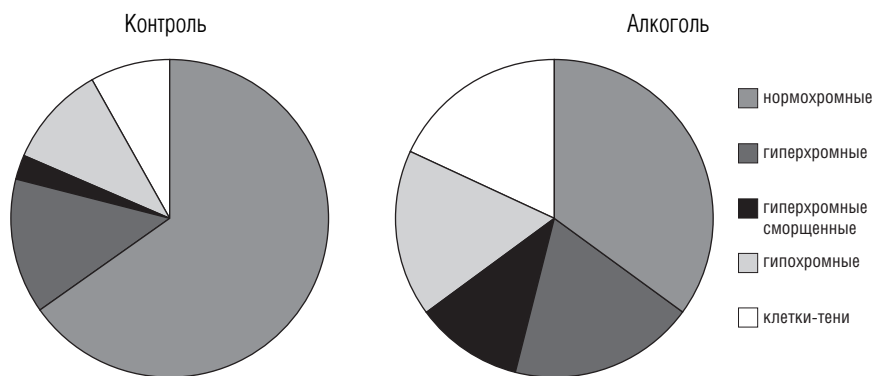


Рис. 4. Соотношение форм нейронов с различной хромотофилией во фронтальной коре 45-суточных крысят

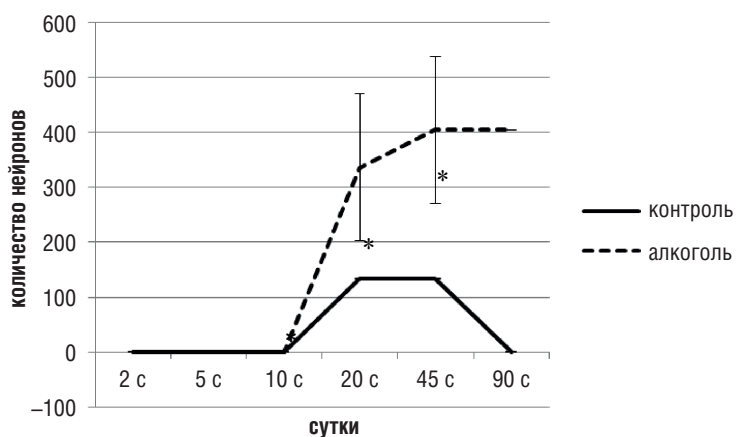


Рис. 5. Количество гиперхромных сморщенных нейронов во фронтальной коре крысят; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

Особый интерес представляют данные, полученные при изучении размеров нейронов. Так, у контрольных животных площадь перикарионов прогрессивно нарастала (в 4–5 раз со 2-х по 90-е сутки). У опытных животных выявлено временное увеличение площади перикарионов нейронов пятого слоя на 2-е сутки, что может быть связано с их набуханием в результате отека коры. Именно в этот срок выявлена наибольшая корреляция между толщиной коры и площадью тел нейронов ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,01$ ). Однако на 20–90-е сутки постнатального развития размеры нейронов становились достоверно меньше по сравнению с таковыми в контроле (рис. 6). В то же время

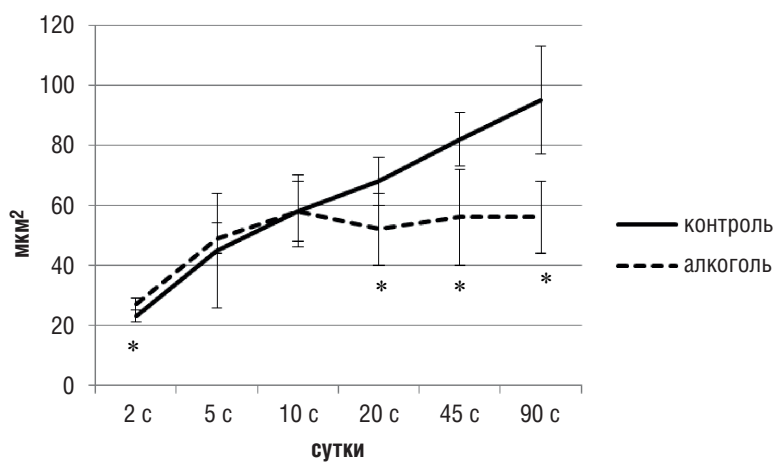


Рис. 6. Динамика площади перикарионов нейронов пятого слоя фронтальной коры; \* –  $p < 0,05$

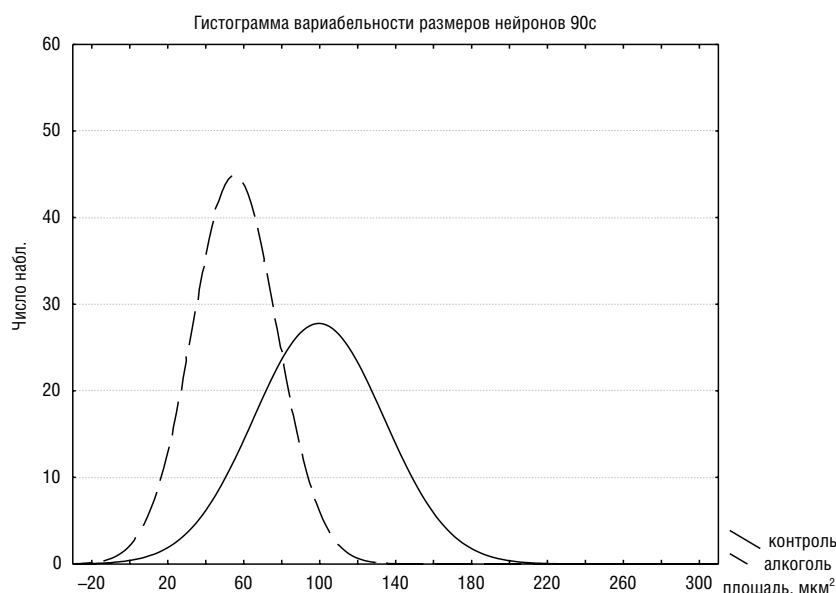


Рис. 7. Варибельность размеров нейронов париетальной коры головного мозга крыс на 90-е сутки после рождения

размеры тел нейронов у контрольных животных со 20-х по 90-е сутки прогрессивно нарастали, а у крыс, подвергшихся антенатальной алкоголизации, их рост спустя 10–20 сут постнатального развития останавливался (рис. 6). При этом наблюдалась отрицательная корреляция между площадью нейронов и числом гиперхромных сморщенных клеток ( $r = -0,87 \dots -0,98$ ;  $p < 0,05$ ). Это касается всех изученных нейронов, что подтверждается нормальным их распределением у контрольных животных по размерным классам в гистограмме (рис. 7).

Установлено также, что содержание РНП в цитоплазме нейронов пятого слоя изучаемых отделов коры алкоголизованных крыс достоверно выше на 5-е и 90-е сутки (см. таблицу), что коррелирует с увеличением в эти сроки числа гиперхромных нейронов (например, во фронтальной коре  $r = 0,86$  и  $r = 0,96$ ;  $p < 0,05$ ).

#### Содержание рибонуклеопротеинов в нейронах пятого слоя фронтальной коры (Me (LQ; UQ), в ед. опт. пл.)

Группа	2-е сутки	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Контроль	0,23 (0,22; 0,23)	0,2 (0,18; 0,22)	0,2 (0,18; 0,22)	0,14 (0,13; 0,15)	0,19 (0,18; 0,2)	0,125 (0,12; 0,13)
Алкоголь	0,23 (0,2; 0,24)	0,26* (0,2; 0,28)	0,22 (0,19; 0,26)	0,16 (0,145; 0,165)	0,2 (0,19; 0,21)	0,18* (0,17; 0,19)

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Выявленные структурные изменения нейронов коры головного мозга могут лежать в основе известных неврологических и поведенческих нарушений после антенатальной алкоголизации. К неврологическим дисфункциям относятся слуховая дисфункция, задержка речи, неспособность к обобщению и обучению. Поведенческие нарушения включают когнитивные [10], сенсомоторные и эмоциональные расстройства [4]. Полагают, что антенатальная алкоголизация снижает выживаемость нейронов и нарушает их функции, вызывая окислительный стресс, повреждение ДНК и митохондриальную дисфункцию, а также подавление сигналов инсулина, необходимых для обеспечения жизнеспособности, метаболизма, формирования синапсов и синтеза ацетилхолина [11]. Это может быть следствием нарушения алкоголем программы постнатального развития нейронов мозга, приводящего к развитию статической энцефалопатии и преждевременному старению мозга.

**Вывод.** Таким образом, антенатальная алкоголизация вызывает в коре головного мозга крыс глубокие и разнообразные гистологические изменения, которые в постнатальном онтогенезе носят волнообразный, долговременный, необратимый, а иногда и прогресси-

рующий характер. Так, выявлено увеличение (на 2-е, 5-е сутки), а затем уменьшение (на 10-е и 90-е сутки) толщины коры, стабильное понижение количества нейронов в пятом слое коры, увеличение числа патологических форм среди сохранившихся нейронов во все сроки исследования, остановка роста и инволюция нейронов коры мозга спустя 10 сут постнатального развития.

### Список использованной литературы

1. *Зиматкин, С. М.* Гистологические изменения коры головного мозга 20-суточных крысят после пренатального воздействия этанола / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // *Новости мед.-биол. наук.* – 2014. – № 4. – С. 208–212.
2. *Riley, E. P.* Fetal alcohol spectrum disorders: an overview / E. P. Riley, M. A. Infante, K. R. Warren // *Neuropsychol. Rev.* – 2011. – Vol. 21. – P. 73–78.
3. *Зиматкин, С. М.* Алкогольный синдром плода / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь. – М.: Нов. знание, 2014.
4. *Зиматкин, С. М.* Влияние алкоголя на развивающийся мозг / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // *Морфология.* – 2014. – Т. 145, № 2. – С. 79–88.
5. *Попова, Э. Н.* Ультраструктура мозга, алкоголь и потомство / Э. Н. Попова. – М.: Науч. мир, 2010.
6. *Артюхина, Н. И.* Влияние употребления алкоголя самцами и самками крыс на структуру головного мозга потомства / Н. И. Артюхина // *Материалы междунар. симп.* – М.: Наука, 1986. – С. 30–33.
7. *Каркищенко, Н. Н.* Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010.
8. *Paxinos, G.* The Rat Brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – Australia: Acad. Press, 1986.
9. *Батин, Н. В.* Компьютерный статистический анализ данных: учеб.-метод. пособие / Н. В. Батин; Нац. акад. наук Беларуси. – Минск: Ин-т подготовки науч. кадров, 2008.
10. *Зиматкин, С. М.* Фетальный алкогольный синдром: поведенческие и неврологические нарушения / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // *Журн. Гродн. мед. ун-та.* – 2013. – № 2. – С. 14–17.
11. *De la Monte, S. M.* Role of central nervous system insulin resistance in fetal alcohol spectrum disorders / S. M. de la Monte, J. R. Wands // *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 17 (3). – P. 390–404.

*Поступила в редакцию 14.09.2015*