

УДК 616.831.711-018:[618.3.-06:616.36-008.811.6]-085.244-092.9

О. А. КАРНЮШКО, С. М. ЗИМАТКИН

НАРУШЕНИЯ МОРФОГЕНЕЗА КОРЫ МОЗЖЕЧКА ПОТОМСТВА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ХОЛЕСТАЗОМ И ИХ КОРРЕКЦИЯ

*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь,
e-mail: karnyushko-olga@mail.ru*

У потомства крыс с холестазом, вызванным на 17-сутки беременности, нарушается морфогенез коры мозжечка. В раннем периоде постнатального развития это выражается в торможении роста коры, нарушении динамики развития наружного зернистого слоя и плотности расположения клеток Пуркинье. В более позднем периоде онтогенеза это проявляется в уменьшении количества нормохромных клеток Пуркинье, увеличении количества гиперхромных клеток, а также концентрации рибонуклеопротеинов в их цитоплазме. Наиболее выражены эти изменения в палеocerebellum. Применение урсодезоксихолевой кислоты позволяет частично нормализовать выявленные нарушения.

Ключевые слова: беременность, холестаз, потомство, мозжечок.

O. A. KARNIUSHKO, S. M. ZIMATKIN

DISTURBANCES FEATURES OF THE MORPHOGENESIS OF THE CEREBELLAR CORTEX OF OFFSPRING OF RATS WITH EXPERIMENTAL CHOLESTASIS AND THEIR CORRECTION

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus, e-mail: karnyushko-olga@mail.ru

In offspring of rats with cholestasis induced on the 17th gestation-day, the disturbances of morphogenesis of the cerebellar cortex were found. In the early postnatal period development this results in inhibiting a growth of the cortex, disturbances of the dynamics development of the external granular layer and the density of Purkinje cells. In the later period development this results in decreasing normochromic and increasing the number of hyperchromic neurons, and the content of ribonucleoproteins in their cytoplasm; these changes were more pronounced in paleocerebellum. UDCA allows one to partially correct those disturbances.

Keywords: pregnancy, cholestasis, offspring, cerebellum.

Введение. Холестаз беременных является многофакторным заболеванием, важную роль в развитии которого играют генетические, гормональные и экологические факторы. Холестаз беременных развивается в третьем триместре беременности и сопровождается нарушением выведения желчи в двенадцатиперстную кишку. Это приводит к застою желчи и повышению содержания ее компонентов и печеночных ферментов в крови матери. Данная патология не представляет большой опасности для матери, но ухудшает прогноз для плода и новорожденного [1, 2]. У детей, рожденных от матерей, перенесших во время беременности холестаз, чаще диагностируются внутриутробная гипоксия, пренатальная гипотрофия, геморрагический синдром, синдром дыхательных расстройств, признаки морфофункциональной незрелости, тахи- и брадикардия, трепетание предсердий, отмечается высокий показатель перинатальной смертности [3, 4]. При холестазе беременных увеличивается проницаемость плацентарного барьера, в связи с чем создаются условия для поступления компонентов желчи из крови матери в кровь плода [5]. Экспериментально установлено, что потомство, развивавшееся в условиях холестаза, существенно отстает в физическом развитии, массе тела и морфофункциональном становлении многих органов в период онтогенеза [6–10]. Влияние холестаза беременных на развитие коры мозжечка у потомства не изучено.

Мозжечок – важный отдел головного мозга, который наряду с регуляцией двигательной активности выполняет ряд «недвигательных функций», принимает участие в регуляции вегетативных функций (потреблении кислорода, терморегуляции, артериального давления), в осуществлении краткосрочной памяти, оказывает модулирующее влияние на восприятие боли, течение цикла сон–бодрствование [11], гуморальный иммунитет [12], участвует в организации эмоционально-мотивационного поведения (запуск и торможение пищевого поведения, инициация реакций ярости и агрессии, страха), а также оказывает координирующее влияние на согласованную работу нейронов коры большого мозга, участвующих в сложных формах психической деятельности [13]. В филогенетическом плане выделяют архи-, палео- и неocerebellum. Они отличаются по функциональной специализации и связям с другими структурами головного мозга.

Применение урсодезоксихолевой кислоты (УДХК), обладающей холеретическим, цитопротективным, антиапоптотическим, иммуномодулирующим, гипохолестеринемическим и литолитическим действием, при холестазах беременных позволяет снизить уровень желчных кислот в сыворотке крови матери и улучшить состояние и прогноз у плода.

Цель настоящего исследования – определить влияние подпеченочного холестаза, вызванного у крыс на 17-е сутки беременности, на морфогенез коры мозжечка потомства и возможность коррекции выявленных нарушений урсодезоксихолевой кислотой.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на самках белых крыс массой 180 ± 20 г и родившемся от них потомстве (90 крысятах). Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» [14]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 7 от 23.12.2013 г.). Животные находились на стандартном рационе вивария. Крысята контрольной группы были получены от самок с лапаротомией на 17-е сутки беременности (без перевязки общего желчного протока). Крысята группы «Холестаз» были получены от самок, которым на 17-е сутки беременности осуществляли перевязку общего желчного протока. Группу «Холестаз + УДХК» составили крысята, родившиеся от самок, которые после перевязки общего желчного протока ежедневно до родов и в течение первой недели после родов получали с пищей УДХК (препарат Урсофальк, Фальк, Германия) в дозе 50 мг/кг/сут. Потребление крысами препарата строго контролировалось. Декапитацию крысят осуществляли на 2-, 7-, 15-, 45- и 90-е сутки после рождения. Образцы мозжечка фиксировали в жидкости Карнуа, а затем подвергали стандартной гистологической обработке. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, 0,1 %-ным раствором тионина по методу Ниссля для морфометрического исследования, галлоцианин – хромовыми квасцами по Эйнарсону для выявления рибонуклеопротеинов (РНП) [15].

Изучение гистологических препаратов, микрофотографирование, морфо- и денситометрию осадка хромогена в гистологических препаратах проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (Leica DFC 320, Германия) и программы анализа изображения Image Warp (Bitflow, США). **Расположение долек коры в гистологических препаратах мозжечка крысят определяли с помощью стереотаксического атласа [16]. В филогенетически старом (долька culmen) и новом (дольки crus 1, 2) отделах коры мозжечка измеряли толщину коры и ее слоев, количество клеток Пуркинье на 1 мм длины среза коры; площадь, фактор формы и фактор элонгации перикарионов клеток Пуркинье. Подсчитывали процент нейронов с различной хроматофилией цитоплазмы: нормохромных (с умеренной окраской цитоплазмы тионином), гиперхромных (с интенсивной окраской цитоплазмы), гиперхромных сморщенных, гипохромных (со слабой окраской цитоплазмы) и клеток-теней. В цитоплазме клеток Пуркинье измеряли содержание РНП. В палео- и неocerebellum каждого животного измеряли не менее 20 клеток Пуркинье, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа. Полученные средние значения от 6 животных в каждой экспериментальной группе 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) и интерквартильного диапазона (IQR). Достоверными считали различия между группами при $p < 0,05$ (U-тест Манна–Уитни) [17].**

Результаты и их обсуждение. Установлено, что у крысят контрольных и опытных животных толщина коры в постнатальном онтогенезе закономерно прогрессивно увеличивается. На 7-е сутки после рождения у потомства крыс с холестазом толщина коры как палеоцеребеллюма, так и неоцеребеллюма была меньше по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1. Толщина коры филогенетически старого и нового отделов коры мозжечка крысят в постнатальном онтогенезе (Me + IQR), мкм

Сроки после рождения	Контроль	Холестаз	Холестаз + УДХК
Палеоцеребеллюм			
2-е сутки	121,56 ± 12,76	115,08 ± 11,58	114,10 ± 9,82
7-е сутки	127,82 ± 21,36	107,07 ± 14,89*	112,76 ± 5,43*
15-е сутки	216,69 ± 41,45	215,63 ± 44,02	227,08 ± 33,81
45-е сутки	322,10 ± 21,50	316,81 ± 39,75	322,52 ± 36,16
90-е сутки	324,91 ± 32,68	328,05 ± 40,08	318,76 ± 40,86
Неоцеребеллюм			
2-е сутки	96,46 ± 4,99	99,71 ± 14,61	97,91 ± 4,52
7-е сутки	111,23 ± 15,04	95,96 ± 16,58*	97,95 ± 18,93*
15-е сутки	207,44 ± 45,24	194,68 ± 61,40	200,15 ± 21,43
45-е сутки	277,58 ± 25,42	270,53 ± 10,16	268,14 ± 26,75
90-е сутки	280,96 ± 22,11	269,45 ± 38,26	276,31 ± 15,50

Примечание. * – достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Известно, что в коре развивающегося мозжечка 2-, 7-, 15-суточных крысят наряду с обычным внутренним зернистым слоем (ЗС) существует дополнительный – наружный зернистый слой (НЗС), где пролиферация продолжается постнатально. Этот слой состоит из 5–6 рядов плотно прилежащих предшественников зернистых нейронов, мигрирующих во внутренний зернистый слой. Его толщина достигает максимума на 7-е сутки после рождения, а к 15-м суткам уменьшается. На 7-е сутки постнатального онтогенеза у потомства крыс с холестазом толщина НЗС в неоцеребеллюме по сравнению с контролем была значительно меньше (на 18 %). На 15-е сутки после рождения его толщина в палеоцеребеллюме по сравнению с контролем, напротив, была больше (на 23,7 %) (рис. 1).

Это свидетельствует о замедлении развития зернистого слоя коры мозжечка (торможении формирования НЗС на 7-е сутки и уменьшении миграции нейронов в ВЗС на 15-е сутки в постнатальном онтогенезе) у потомства крыс с холестазом.

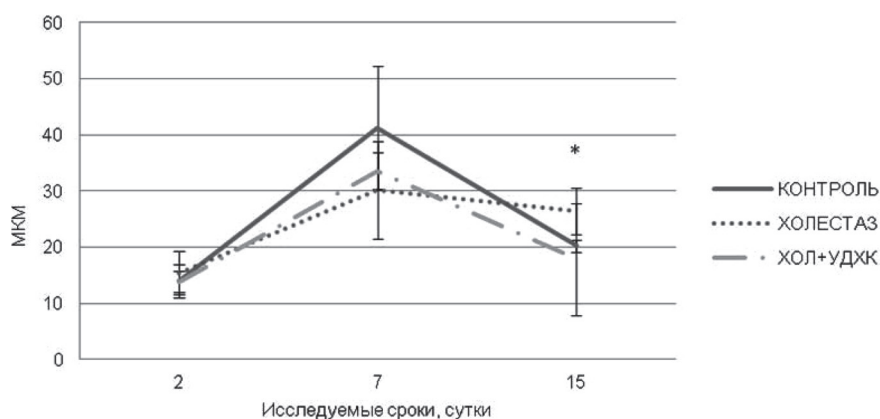


Рис. 1. Толщина наружного зернистого слоя в палеоцеребеллюме крысят в постнатальном онтогенезе (Me + IQR), мкм. * – достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем

У всех животных в постнатальном онтогенезе толщина молекулярного слоя прогрессивно возрастала. Расширению молекулярного слоя способствовал рост отростков клеток Пуркинье, зернистых, звездчатых и корзинчатых нейронов. У потомства крыс с холестазом в палеоцеребеллуме наблюдалось отставание в росте молекулярного слоя на 2-е и 7-е сутки постнатального онтогенеза (на 19,8 и 21 % соответственно) по сравнению с контролем.

Т а б л и ц а 2. Толщина молекулярного слоя коры мозжечка крысят в постнатальном онтогенезе (Me + IQR), мкм

Сроки после рождения	Контроль	Холестаз	Холестаз + УДХК
Палеоцеребеллум			
2-е сутки	33,44 ± 13,77	26,83 ± 3,72*	28,18 ± 5,70
7-е сутки	26,33 ± 4,52	20,77 ± 5,94*	22,92 ± 3,64
15-е сутки	75,37 ± 21,29	64,31 ± 22,91	78,94 ± 9,90
45-е сутки	170,47 ± 17,83	160,90 ± 29,20	174,00 ± 30,57
90-е сутки	171,91 ± 13,69	176,64 ± 35,34	177,64 ± 24,15
Неоцеребеллум			
2-е сутки	24,07 ± 6,34	24,36 ± 6,42	24,41 ± 3,36
7-е сутки	17,71 ± 3,33	16,72 ± 5,49	18,72 ± 2,09
15-е сутки	69,54 ± 8,20	61,35 ± 25,90	72,33 ± 8,34
45-е сутки	146,56 ± 20,48	146,67 ± 10,16	155,80 ± 8,08
90-е сутки	154,77 ± 5,84	152,19 ± 13,22	159,07 ± 9,06

П р и м е ч а н и е. * – достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

У 2-суточных крысят контрольной и опытных групп клетки Пуркинье располагаются в несколько рядов, а у 7-суточных животных эти нейроны выравниваются в монослой. В постнатальном онтогенезе расстояние между перикарионами быстро увеличивается. Это связано с формированием вокруг них корзинок, образованных аксонами корзинчатых, звездчатых нейронов и глиальными клетками, что приводит к уменьшению плотности их расположения в извилине. На 7-е сутки после рождения у крысят группы «Холестаз» плотность расположения клеток Пуркинье была увеличена в палеоцеребеллуме и неоцеребеллуме (на 20 и 8,7 % соответственно) по сравнению с контролем, что также может свидетельствовать о замедлении развития коры мозжечка. Применение УДХК позволило нормализовать этот показатель, и у потомства крыс, получавших УДХК, плотность расположения клеток Пуркинье не отличалось от контроля (рис. 2).

Размеры перикарионов клеток Пуркинье мозжечка у всех животных со 2-х по 45-е сутки постнатального развития прогрессивно увеличивались (рис. 3). В палеоцеребеллуме потомства крыс с холестазом площадь перикарионов клеток Пуркинье на 7, 15 и 45-е сутки постнатального развития была меньше на 9–17 % по сравнению с контролем. В неоцеребеллуме у крысят

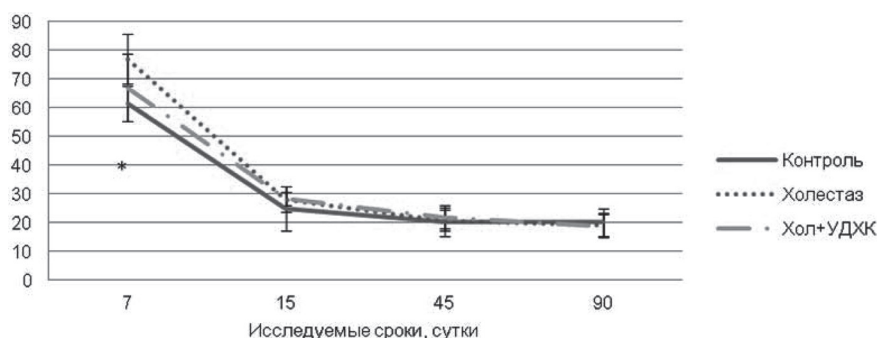


Рис. 2. Динамика в постнатальном онтогенезе плотности расположения клеток Пуркинье в палеоцеребеллуме крысят (Me + IQR), шт/мм. * – достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем

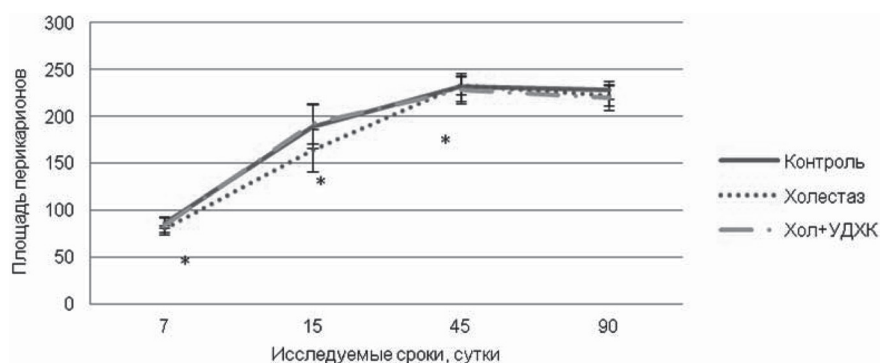


Рис. 3. Динамика площади перикарионов клеток Пуркинье в палеocerebellуме крысят в постнатальном онтогенезе (Me + IQR), мкм². * – достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем

группы «Холестаз» на 15-е сутки после рождения также наблюдалось уменьшение площади перикарионов (на 13 %) по сравнению с контролем. Это подтверждает отставание роста клеток Пуркинье мозжечка в постнатальном онтогенезе. Применение УДХК позволило нормализовать эти параметры.

У контрольных и опытных животных на препаратах, окрашенных по методу Ниссля, на ранних сроках постнатального развития выявлялись только нормохромные клетки Пуркинье. На 45-е и 90-е сутки по степени хромотофилии выявлялись нормохромные, гиперхромные, гиперхромные сморщенные, гипохромные нейроны и клетки-тени (рис. 4). На 45-е сутки постнатального онтогенеза у крысят группы «Холестаз» в неocerebellуме наблюдалось достоверное снижение относительного числа нормохромных нейронов (в группе «Контроль» – до 95 %, в группе «Холестаз» – до 85 %) и увеличение гиперхромных (в группе «Контроль» – до 3 %, в группе «Холестаз» – до 8 %) и гипохромных нейронов (в группе «Контроль» – до 3 %, в группе «Холестаз» – до 6 %). Изменения по данному показателю были более выражены в палеocerebellуме, где количество гиперхромных нейронов в группе «Холестаз» было в 5 раз больше, чем в группе «Контроль», и составило соответственно 60 и 12 % (рис. 4). Применение УДХК в значительной степени позволило нормализовать эти нарушения.

У крыс группы «Холестаз» содержание РНП в цитоплазме клеток Пуркинье коры мозжечка достоверно увеличено на 15-е сутки в неocerebellуме и на 15-е и 45-е сутки в палеocerebellуме по сравнению с контролем (рис. 5). Это коррелировало с числом гиперхромных нейронов ($r = 0,84$), которое значительно возрастало. УДХК незначительно корригировала этот параметр.

По данным многих исследований, наиболее частые осложнения со стороны плода при холестазе беременных связывают с повышением уровня токсичных желчных кислот в крови самки. При этом повышенный уровень желчных кислот отмечается в крови самки, в амниотической жидкости и пуповинной крови. Постнатально желчные кислоты продолжают поступать к потомству с молоком самки. Нарушение морфогенеза коры мозжечка у потомства крыс с холестазом также может быть обусловлено этим патогенетическим фактором.

Развитие коры мозжечка происходит сначала в филогенетически более старых ее отделах [18]. Возможно, поэтому развитие потомства в условиях холестаза самки приводит к более выраженным нарушениям именно в палеocerebellуме.

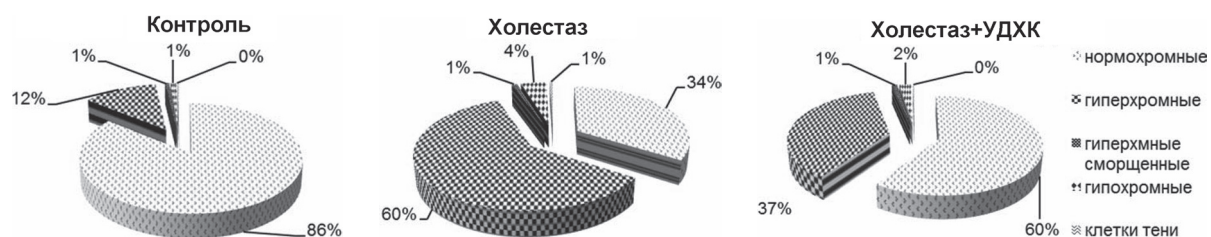


Рис. 4. Соотношение клеток Пуркинье с различной хромотофилией цитоплазмы в палеocerebellуме 45-суточных крысят

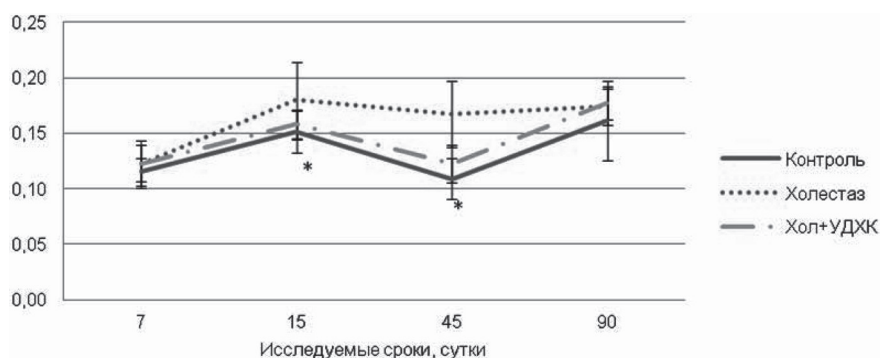


Рис. 5. Содержание рибонуклеопротеинов в клетках Пуркинье в палеocerebellуме крысят в постнатальном онтогенезе (Me + IQR, ед. опт. пл. * – достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем

Корригирующее действие УДХК при нарушениях морфогенеза коры мозжечка может быть связано с защитой от повреждения желчных протоков гидрофобными желчными кислотами и другими гепатотоксическими компонентами, снижением транспорта желчных кислот через плаценту к плоду, что уменьшает вероятность развития его токсического повреждения [19], а также с ее антиапоптотическим, цитопротективным и антиоксидантным действием в мозге [20].

Заключение. Таким образом, у потомства крыс с холестазом, вызванным на 17-е сутки беременности, нарушается (замедляется) морфогенез коры мозжечка. В раннем периоде постнатального развития это выражается в торможении роста коры, нарушении динамики развития наружного зернистого слоя и плотности расположения клеток Пуркинье. В более позднем периоде онтогенеза это проявляется в уменьшении количества нормохромных клеток Пуркинье, увеличении количества гиперхромных клеток, а также концентрации РНП в их цитоплазме. Наиболее выражены эти изменения в палеocerebellуме. Применение УДХК позволяет частично нормализовать выявленные нарушения.

Список использованных источников

1. Williamson, C. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy / C. Williamson, V. L. Geenes // *Obstet. Gynecol.* – 2014. – Vol. 124, N 1. – P. 120–133.
2. Дудук, Н. И. Холестаз беременных и его последствия для матери и потомства / Н. И. Дудук, С. М. Зиматкин // *Журн. ГрГМУ.* – 2011. – № 1. – С. 3–6.
3. Fetal complications due to intrahepatic cholestasis of pregnancy / P. Šimják [et al.] // *J. Perinat. Med.* – 2015. – Vol. 43, N 2. – P. 133–139.
4. Impaired fetal adrenal function in intrahepatic cholestasis of pregnancy / C. Wang [et al.] // *Med. Sci. Monit.* – 2011. – Vol. 17, N 5. – P. 265–271.
5. Gabzdyl, E. M. Intrahepatic cholestasis of pregnancy : a critical clinical review / E. M. Gabzdyl, J. M. Schlaeger // *J. Perinat. Neonatal Nurs.* – 2015. – Vol. 29, N 1. – P. 41–50.
6. Дудук, Н. И. Морфофункциональные изменения печени и возможность их коррекции у потомства крыс с холестазом / Н. И. Дудук, Р. И. Кравчук, С. М. Зиматкин // *Морфология.* – 2015. – № 1. – С. 48–53.
7. Мацюк, Я. Р. Структурно-цитохимические свойства ободочной кишки потомства крыс, развивающихся в условиях холестаза матери / Я. Р. Мацюк, Е. Ч. Михальчук, Е. А. Шелесная // *Новости мед.-биол. наук.* – 2013. – № 4. – С. 122–129.
8. Мацюк, Я. Р. Влияние урсодезоксихолевой кислоты на структурно-метаболические свойства желудка плодов крыс при экспериментальном холестазе / Я. Р. Мацюк, Е. Ч. Михальчук // *Вест. НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2014. – № 3. – С. 67–73.
9. Михальчук, Е. Ч. Структурно-цитохимические особенности почек 19-суточных плодов крыс при холестазе матери / Е. Ч. Михальчук, Я. Р. Мацюк // *Новости мед.-биол. наук.* – 2014. – № 2. – С. 140–146.
10. Чернышев, Ю. Н. Структурные и цитохимические свойства подвздошной кишки крысят при холестазе матери / Ю. Н. Чернышев, Я. Р. Мацюк // *Новости мед.-биол. наук.* – 2014. – Т. 10, № 3. – С. 112–118.
11. Бека, Г. Л. Мозжечковый контроль интегративной деятельности головного мозга : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Г. Л. Бека. – Ереван, 1990. – 56 с.
12. Cerebellar fastigial nuclear GABAergic projections to the hypothalamus modulate immune function / B. B. Cao [et al.] // *Brain. Behav. Immun.* – 2013. – Vol. 27, N 1. – P. 80–90.
13. Калашникова, Л. А. Роль мозжечка в организации высших психических функций / Л. А. Калашникова // *Журн. неврол. и психиатр.* – 2001. – Т. 101, № 4. – С. 55–60.

14. Каркищенко, Н. Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. – М. : Профиль-2С, 2010. – 358 с.
15. Пирс, Э. Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс. – М. : Иностр. лит-ра, 1962. – 962 с.
16. Paxinos, G. The Rat Brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – San Diego : Academic Press, CA, 1986.
17. Батин, Н. В. Компьютерный статистический анализ данных: учеб.-метод. пособие / Н. В. Батин. – Минск : Ин-т подготовки науч. кадров Нац. акад. наук Беларуси, 2008. – 160 с.
18. Nagasaki, S. Difference in the postnatal development of the layer structures in the phylogenetically different cat cerebellar cortices / S. Nagasaki, S. Deura // Kaibogaku Zasshi. – 1989. – Vol. 64, N 6. – P. 539–549.
19. Grand'Maison, S. The effects of ursodeoxycholic acid treatment for intrahepatic cholestasis of pregnancy on maternal and fetal outcomes : a meta-analysis including non-randomized studies / S. Grand'Maison, M. Durand, M. Mahone // J. Obstet. Gynaecol. Can. – 2014. – Vol. 36, N 7. – P. 632–641.
20. Bilirubin injury to neurons: contribution of oxidative stress and rescue by glyoursodeoxycholic acid / M. A. Brito [et al.] // Neurotoxicology. – 2008. – Vol. 29, N 2. – P. 259–69.

Поступила в редакцию 27.05.2015