

© С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь, 2016  
УДК 611.813.1-018:613.81:599.323.4

*С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь*

## ДИНАМИКА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ВО ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ МОЗГА КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ АНТЕНАТАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ АЛКОГОЛЯ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. С. М. Зиматкин), Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

Цель работы — сравнительное изучение влияния пренатальной алкоголизации на гистологические характеристики нейронов фронтальной коры мозга крыс различного возраста. Исследование проведено на 175 беспородных белых крысах — потомстве 25 самок, получавших 15% раствор этанола в качестве источника питья в течение всей беременности. Кору мозга изучали на 2–90-е сутки после рождения с использованием гистологических, гистохимических и морфометрических методов. Выявлено увеличение (на 2-, 5-е сутки), а затем уменьшение (на 10-е и 90-е сутки) толщины коры и размеров тел нейронов (на 20–90-е сутки), снижение количества нейронов V слоя коры, уменьшение числа нормохромных и увеличение — гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней во все сроки исследования. Антенатальная алкоголизация у крыс вызывает разнообразные гистологические изменения во фронтальной коре мозга, которые в постнатальном онтогенезе имеют долговременный и прогрессирующий характер.

**Ключевые слова:** фронтальная кора, нейроны, антенатальная алкоголизация

Потребление алкоголя во время беременности приводит к развитию ряда специфических нарушений в организме плода, объединяемых в понятие фетальный алкогольный синдром, входящий в «спектр нарушений плода, вызванных алкоголем» [fetal alcohol spectrum disorders (FASD)] [2, 14]. Согласно литературным данным, кора большого мозга особенно чувствительна к пренатальному воздействию этанола [4, 5], который индуцирует у грызунов апоптоз нейронов и нейродегенеративные изменения [4]. Пренатальное воздействие алкоголя вызывает уменьшение числа и размеров пирамидных нейронов в коре мозга у животных, снижение в них содержания белка и недоразвитие цитоплазмы [7]. При этом в сенсомоторной коре у крысят наблюдаются признаки задержки развития нейронов и их дендритов, деструктивные и дистрофические изменения клеток (кариоцитолитиз, хроматолиз, появление «клеток-теней»), значительные ультраструктурные нарушения [4, 14]. Вместе с тем, динамика гистологических изменений в постнатальном онтогенезе у этих животных изучена недостаточно.

Цель настоящей работы — сравнительное изучение влияния пренатальной алкоголизации на гистологические характеристики нейронов фронтальной коры большого мозга у крыс различного возраста.

Материал и методы. 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» [6]. На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике (протокол № 7 от 23.12.2013 г.) Гродненского государственного медицинского университета. Животные находились на стандартном рационе вивария. Крысы подопытной группы на протяжении всей беременности (от дня обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках до родов) получали 15% раствор этанола в качестве единственного источника питья, а животные контрольной группы — то же количество воды. Среднее потребление алкоголя беременными самками составляло  $4 \pm 2$  г/(кг•сут). На 2-, 5-, 10-, 20-, 45-, 90-е сутки после рождения крысят взвешивали, декапитировали и определяли массу мозга и ее соотношение с массой тела. Кусочки переднего отдела коры полушарий большого мозга быстро фиксировали в жидкости Карнуа. Серийные парафиновые срезы окрашивали 0,1% толуидиновым синим по методу Ниссля и для выявления рибонуклеопротеинов (РНП) — по Эйнарсону.

Гистологическое изучение, микрофотографирование, морфометрию и денситометрию осадка хромогена в гистологических препаратах проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры LeicaDFC 320 (Leica, Германия) и программы анализа изображения ImageWarp (Bitflow, США). Расположение фронтальной коры на гистологических препаратах мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [13]. На препаратах, окрашенных по методу Ниссля, измеряли толщину фронтальной коры мозга (по 5 измерений у каждого животного), в ее V слое определяли плотность расположения

### Сведения об авторах:

Зиматкин Сергей Михайлович (e-mail: zimatkin@grsmu.by), Бонь Елизавета Игоревна, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Гродненский государственный медицинский университет, 230015, Беларусь, г. Гродно, ул. Горького, 80

Характеристика фронтальной коры большого мозга крысят в контроле и после пренатальной алкоголизации, Me (LQ; UQ)

Исследованные показатели	Группы крысят	Сроки исследования, сутки					
		2-е	5-е	10-е	20-е	45-е	90-е
Толщина коры мозга, мкм	Контрольная	538 (532;567)	695 (679;711)	1156 (1131;1182)	1277 (1251;1307)	1465 (1444;1473)	1645 (1584;1654)
	Подопытная	809* (802;823)	799* (796;880)	1020* (1016;1024)	1257 (1256;1262)	1445 (1379;1488)	1249* (1225;1262)
Плотность расположения нейронов, количество на площади среза 1 мм <sup>2</sup>	Контрольная	16819 (16684;17223)	9553 (9553;9688)	7804 (7669;7804)	6122 (6055;6189)	5180 (4978;5247)	4575 (4306;4575)
	Подопытная	13993* (13724;14263)	8880* (8880;9015)	6122* (6055;6728)	5382* (5247;5382)	3767* (3767;3902)	3229* (3095;3229)
Количество гиперхромных сморщенных нейронов на площади среза 1 мм <sup>2</sup>	Контрольная	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	134 (134;134)	134 (134;134)	0 (0;0)
	Подопытная	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	336* (269;404)	404* (404;538)	404* (404;404)
Содержание рибонуклеопротеинов в нейронах V слоя, ед. опт. плотности	Контрольная	0,23 (0,22;0,23)	0,20 (0,18;0,22)	0,20 (0,18;0,22)	0,14 (0,13;0,15)	0,19 (0,18;0,2)	0,125 (0,12;0,13)
	Подопытная	0,23 (0,2;0,24)	0,26* (0,2;0,28)	0,22 (0,19;0,26)	0,16 (0,145;0,165)	0,20 (0,19;0,21)	0,18* (0,17;0,19)

\* Различия значимы по сравнению с контролем при  $P < 0,05$ .

Примечание. Me — медиана; в скобках — границы процентилей (от 25 до 75).

нейронов (в 5 полях зрения у каждого животного) и среди них подсчитывали количество клеток с различной степенью хроматофилии цитоплазмы (гипо-, гиперхромных, гиперхромных сморщенных и клеток-теней). Измеряли малый и большой диаметр тела нейрона и определяли площадь его сечения, фактор элоптации и фактор формы. У каждого животного оценивали не менее 30, а в каждой экспериментальной группе — 150 нейронов, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа.

Полученные средние цифровые данные по каждому животному 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 — медиана, LQ — верхняя граница нижнего квартиля; UQ — нижняя граница верхнего квартиля. Значимыми считали различия между показателями в контрольной и подопытной группах при  $P < 0,05$  (U-тест Манна—Уитни) [1].

**Результаты исследования.** Значимых различий массы тела, массы мозга и соотношения массы мозга и массы тела у контрольных и подопытных крысят не обнаружено. У контрольных крысят на протяжении всего срока наблюдения происходило утолщение фронтальной коры, тогда как у крысят, подвергавшихся антенатальной алкоголизации, по сравнению с контролем на 2-е сутки после рождения фронтальная кора была значимо толще на 33%, а на 5-е сутки — на 13%, на 10-е сутки толщина статистически значимо снижалась на 12%. На 20-е и 45-е сутки эти различия исчезали, но на 90-е сутки происходило повторное снижение толщины коры на 23% по сравнению с контролем (таблица).

В V слое коры мозга у алкоголизованных крысят было обнаружено значимое снижение (на 10–25%) количества нейронов на единице площади среза (плотности расположения) во все изученные сроки (см. таблицу).

У контрольных животных на препаратах, окрашенных по Нисслю, в различные сроки постнатального развития соотношение нейронов с различной степенью хроматофилии цитоплазмы существенно различалось; однако всегда преобладали нормохромные нейроны (рис. 1, а) (их доля составляла 60–70% от числа всех нейронов).

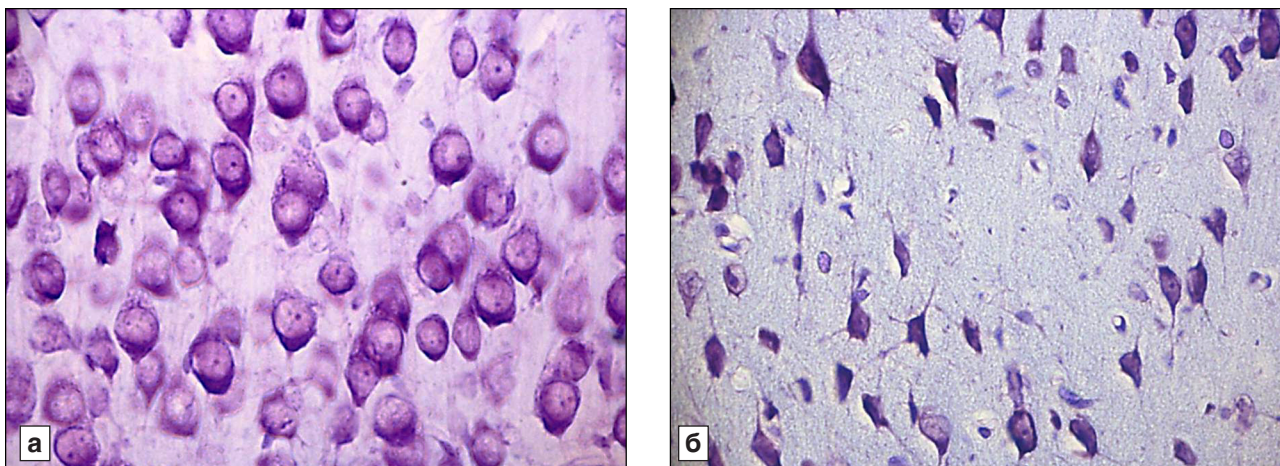
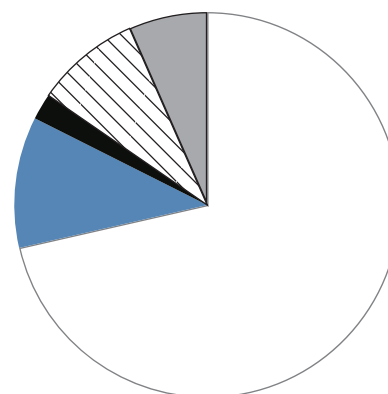


Рис. 1. Нейроны V слоя фронтальной коры мозга у 45-суточных крысят контрольной группы (а) и после антенатальной алкоголизации (б).

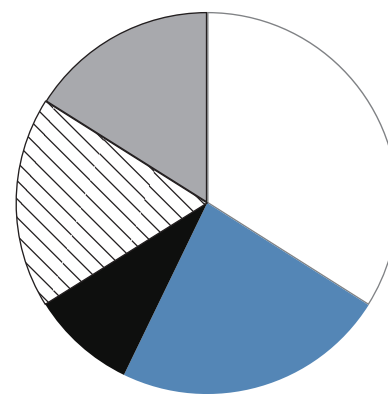
а — преобладают нормохромные нейроны; б — преобладают гиперхромные и гиперхромные сморщенные нейроны. Окраска тионином по Нисслю. Ув. 400

У подопытных животных во все сроки в V слое коры мозга было выявлено уменьшение числа нормохромных нейронов и повышение количества гиперхромных сморщенных нейронов и клеточек-теней, причем в различные сроки постнатального развития выраженность этих изменений была неодинаковой (см. рис. 1, б). Наименьшие изменения были выявлены на 2-е сутки, когда увеличение числа гипер- и гипохромных нейронов было статистически незначимо. Наибольшие изменения во фронтальной коре были выявлены на 20–90-е сутки постнатального развития. Так, на 45-е сутки количество гиперхромных сморщенных нейронов было увеличено на 66%, гипохромных — на 20%, клеточек-теней — на 40% по сравнению с контролем (рис. 2). Гиперхромные сморщенные нейроны у контрольных животных на 45-е и 90-е сутки почти исчезали, а у подвергавшихся антенатальной алкоголизации их количество, напротив, резко возрастало (рис. 3).

При исследовании размеров и формы тел нейронов выявлено статистически значимое временное увеличение площади сечения перикарионов нейронов V слоя у подопытной группы на 2-е сутки. Однако на 20–90-е сутки постнатального развития у подопытных крысят размеры тел нейронов становились значимо меньше, чем в контроле (см. рис. 3), в то время как у контрольных животных они прогрессивно увеличивались. У крыс, подвергшихся антенатальной алкоголизации, рост тел нейронов после 10–20-х суток постнатального развития останавливался (см. рис. 3). При этом была обнаружена отрицательная корреляция между площадью сечения тел нейронов и числом гиперхромных сморщенных нейронов ( $r=(-0,87)-(-0,98)$ ;  $P<0,05$ ).



а



б

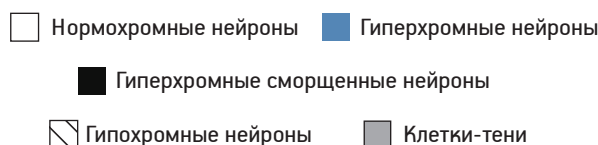


Рис. 2. Процентное соотношение форм нейронов с различной хроматофилией во фронтальной коре мозга у 45-суточных крысят: контрольных (а) и подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя (б)

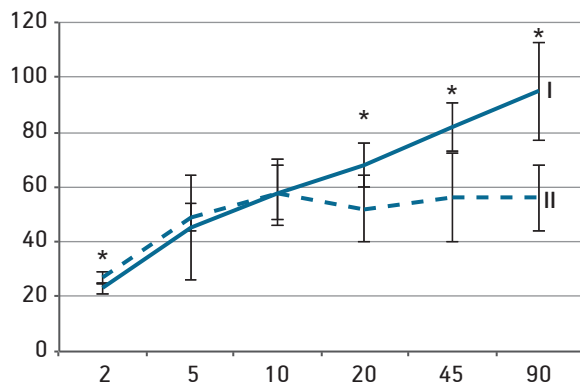


Рис. 3. Площадь сечения тел нейронов V слоя фронтальной коры мозга у контрольных крысят (I) и подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя (II).

По оси абсцисс — возраст крысят (сут); по оси ординат — исследуемый показатель (мкм<sup>2</sup>). Звездочки — различия по сравнению с контролем значимы при  $P < 0,05$ . Вертикальные отрезки — интерквартильный диапазон

Обнаружено, что содержание РНП в цитоплазме нейронов V слоя фронтальной коры у алкоголизированных крыс значительно выше на 5-е и 90-е сутки (см. таблицу) чем в контроле, что коррелировало с увеличением в эти сроки числа гиперхромных нейронов ( $r=0,86-0,96$ ;  $P < 0,05$ ).

Обсуждение полученных данных. Выявленное утолщение коры мозга у антенатально алкоголизированных крысят на 5-е и особенно 2-е сутки после рождения может быть связано с ее периваскулярным отеком и набуханием нейронов, что наблюдалось на гистологических препаратах. Именно на 2-е сутки была выявлена наибольшая корреляция между толщиной коры и площадью сечения тел нейронов ( $r=0,98$ ;  $P < 0,01$ ). Последующее уменьшение толщины коры на 10-е сутки может быть связано с исчезновением отека, а её повторное истончение на 90-е сутки — с тотальным сморщиванием нейронов, что подтверждается высокой корреляцией между толщиной коры и числом сморщенных нейронов ( $r=-0,94$ ;  $P < 0,01$ ). В то же время, толщина коры у контрольных животных закономерно нарастала.

Уменьшение размеров и сморщивание нейронов ранее было обнаружено и у взрослых крыс, подвергавшихся антенатальной алкоголизации [7, 9, 10].

В обеих исследованных группах в постнатальном онтогенезе наблюдалось уменьшение плотности расположения тел нейронов, что может быть связано с более интенсивным ростом нейропиля по сравнению с телами нейронов. Обнаруженное уменьшение плотности расположения нейронов во фронтальной коре у подопытных крыс во все изученные сроки после рождения, возможно, связано

с гибелью части нейронов под действием алкоголя еще в период эмбриогенеза. Соответственно дефицит нейронов сохраняется у них пожизненно. Уменьшение толщины коры мозга и количества в ней нейронов, увеличение числа гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней отмечалось в различные сроки после рождения у потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности, и другими исследователями [12].

Выявленные у антенатально алкоголизированных крыс остановка роста и сморщивание нейронов с 20-х суток после рождения могут быть связаны с нарушением водно-солевого обмена и цитоскелета клеток, а также с окислительным стрессом, активацией процессов перекисного окисления липидов и окисления белков. При этом свободные радикалы, взаимодействуя с ДНК, структурно модифицируют ее. Кроме того, свободные радикалы повреждают клеточные мембраны, а также мембраны органелл клетки, в частности митохондрий нейронов, а уровень эндогенного антиоксиданта глутатиона снижается [9]. Алкоголь нарушает процессы транскрипции и трансляции в развивающемся мозгу, вызывает нарушение экспрессии генов [11]. При электронно-микроскопическом исследовании в гиперхромных нейронах выявляются уплотненная цитоплазма с щелевидными просветлениями и поврежденные органеллы, глубокие инвагинации ядерной оболочки, распад цистерн комплекса Гольджи на вакуоли, резкое набухание митохондрий [7]. Также, согласно данным литературы, этанол ингибирует экспрессию эндогенного инсулина, инсулиноподобного фактора роста (IGF) полипептидов, IGF-1 и IGF-2 рецепторов в мозгу. Результаты показывают, что основные нарушения в мозгу при FASD вызваны нарушениями в инсулин/IGF-сигнализации [10].

Выявленные структурные изменения могут лежать в основе известных неврологических и поведенческих нарушений у животных после антенатальной алкоголизации. Поведенческие нарушения включают когнитивные [3], сенсомоторные и эмоциональные расстройства [4]. К неврологическим дисфункциям, вызванным антенатальной алкоголизацией, относятся слуховая дисфункция, задержка речи, неспособность к обобщению и обучению [3]. В частности, пренатальная алкоголизация приводит к снижению двигательной активности 17-суточных крысят в тесте «открытое поле» и негативно отражается на их способности к выработке (но не воспроизведению) условного пищевого рефлекса. Кроме того, у животных развивается толерантность к алкоголю [8].

Таким образом, антенатальная алкоголизация вызывает глубокие и разнообразные гистологические изменения во фронтальной коре головного мозга крыс, которые в постнатальном онтогенезе имеют волнообразный, долговременный, а иногда и прогрессирующий характер. Так, выявлено увеличение (2-, 5-е сутки), а затем уменьшение толщины коры (на 10-е и 90-е сутки) и размеров нейронов (20–90-е сутки), снижение количества нейронов в V слое коры, уменьшение числа гиперхромных сморщенных нейронов и клеточных тел во все сроки исследования. Особенно интересны факт остановки роста и прогрессивное сморщивание нейронов фронтальной коры мозга с 20-х суток постнатального развития.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных: учеб.-метод. пособие. Минск: Ин-т подгот. науч. кадров Нац. Акад. наук Беларуси, 2008.
2. Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Антенатальная алкоголизация: нарушения внутренних органов // Новости мед.-биол. наук. 2013. № 2. С. 168–174.
3. Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Фетальный алкогольный синдром: поведенческие и неврологические нарушения // Журн. Гродненск. мед. ун-та. 2013. № 2. С. 14–17.
4. Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Алкогольный синдром плода: монография. Минск: Новое знание, 2014.
5. Зиматкин С.М., Бонь Е.И. Влияние алкоголя на развивающийся мозг // Морфология. 2014. Т. 145, вып. 2. С. 79–88.
6. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль-2С, 2010.
7. Попова Э.Н. Ультраструктура мозга, алкоголь и потомство. М.: Научный мир, 2010.
8. Abel E.L. In utero alcohol exposure and development delay of response inhibition // Alcoholism. 1982. Vol. 6. P. 369–376.
9. Brocardo P.S. Anxiety — and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise // Neuropharmacology. 2012. Vol. 62. P. 16–18.
10. de la Monte S.M., Wands J.R. Role of central nervous system insulin resistance in fetal alcohol spectrum disorders // J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol. 2010. Vol. 17, № 3. P. 390–404.
11. Kleiber M.L., Wright E. Maternal voluntary drinking in C57BL/6J mice: advancing a model for fetal alcohol spectrum disorders // Behav. Brain. Res. 2011. Vol. 223. P. 376–387.
12. Lopez-Tejero D. Effects of prenatal ethanol exposure on physical growth sensory reflex maturation and brain development in the rat // Neuropathol. Appl. Neurobiol. Vol. 3. P. 251–260.
13. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in stereotaxic coordinates. London: Press, 1998.
14. Riley E.P., Infante M.A., Warren K.R. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview // Neuropsychol. Rev. 2011. Vol. 21. P. 73–80.

Поступила в редакцию 13.04.2016  
Получена после доработки 28.11.2016

### DYNAMICS OF HISTOLOGICAL CHANGES IN THE FRONTAL CORTEX OF THE BRAIN OF RATS SUBJECTED TO PRENATAL ALCOHOL EXPOSURE

*S.M. Zimatkin, Ye.I. Bon'*

The purpose of the present investigation was a comparative study of the effect of prenatal exposure to alcohol on the histological characteristics of neurons in the frontal cortex of the rats of different ages. The study was conducted on 175 outbred albino rats — the offspring of 25 females given a 15% solution of ethanol as a source of drinking throughout pregnancy. The cortex was examined at Days 2–90 after birth using histological, histochemical and morphometric methods. An increase (Days 2, 5), followed by the reduction (Days 10 and 90) of the thickness of the cortex and the size of neurons (Days 20–90) were detected, together with the decrease in the number of neurons in layer V of the cortex, reduction of the number of normochromic and an increase of the number of shrunken hyperchromic neurons and ghost cells in all study periods. Antenatal alcoholization was found to cause a variety of histological changes in the frontal cortex of rat brain in postnatal ontogenesis that had a long-term and progressive nature.

**Key words:** *frontal cortex, neurons, prenatal exposure to alcohol*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, Belarus