

Карнюшко О. А., Зиматкин С. М.

НАРУШЕНИЯ МОРФОГЕНЕЗА ПАЛЕОЦЕРЕБЕЛЛУМА ПОТОМСТВА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ХОЛЕСТАЗОМ

Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

Холестаз беременных характеризуется интенсивным зудом, желтухой, нарушением поступления желчи в двенадцатиперстную кишку, что приводит к повышению её компонентов в крови. Данная патология развивается в третьем триместре беременности с последующим исчезновением симптомов после родов. Холестаз, не представляя большой опасности для матери, ухудшает прогноз для плода и новорожденного. Так, у плода часто наблюдается гипоксия, респираторный дистресс-синдром, признаки морфофункциональной незрелости, антенатальная гибель. Экспериментально установлено, что потомство, развивавшееся в условиях холестаза, существенно отстает в физическом развитии, массе тела и морфофункциональном становлении в онтогенезе многих органов [1]. Филогенетически в мозжечке различают несколько отделов: архидеребеллум (древний), палеодеребеллум (старый) и неодеребеллум (молодой) участок коры мозжечка. Влияние холестаза беременных на становление палеодеребеллума у потомства животных и человека не изучено.

Целью настоящего исследования явилось выяснение влияния подпеченочного холестаза, вызванного у самок-крыс на 17 сутки беременности на развитие нейронов и синаптогенез палеодеребеллума потомства в постнатальном онтогенезе.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на самках беспородных белых крыс с исходной массой 180 ± 20 г и родившемся от них потомстве (108 крысят). Все опыты проведены с учетом «правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 7 от 23.12.2013). Животные находились на стандартном рационе вивария. Крысята контрольной группы были получены от самок с лапаротомией на 17 сутки беременности без перевязки общего желчного протока. Крысята группы «холестаз» были получены от самок, которым на 17 сутки беременности осуществляли перевязку общего желчного протока. От каждой самки брали по одному крысенку по достижении ими 2, 7, 15, 45 и 90-х суток после рождения и декапитировали. Для получения сопоставимых результатов от всех животных образцы мозжечка обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Образцы мозжечка фиксировали в жидкости Карнуа с последующей стандартной гистологической обработкой. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, 0,1 % раствором тионина по методу Ниссля для морфометрического исследования, галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для выявления рибонуклеопротеинов (РНП). Для иммуногистохимического выявления даблкортина (DCX, маркер незрелых нейронов), NeuN (маркер зрелых нейронов), синаптофизина (SYN, маркер синаптогенеза) осуществляли фиксацию в цинк-формалине. Изучение гистологических препаратов, микрофотографирование, морфометрию и денситометрию осадка хромогена в гистологических препаратах проводили с помощью микро-

скопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (Leica DFC 320, Германия) и программы анализа изображения Image Warp (Bitflow, США). Для электронно-микроскопических исследований кусочки мозжечка фиксировали на льду в 1%-ном растворе OsO₄ на 0,05 М буфере Миллонига (pH 7,2–7,4). Материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в аралдит. Затем изготавливали ультратонкие срезы толщиной около 35 нм на ультрамикротоме Leica EM UC 7 (Германия), собирали на опорные медные сеточки, контрастировали 2%-ным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Japan), фотографировали цифровой камерой (Olympus MegaView III, Germany). Полученные средние значения в каждой экспериментальной группе анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США).

Результаты и обсуждение. В наших предыдущих исследованиях установлено, что у потомства крыс с холестазом, вызванным на 17-сутки беременности, нарушается морфогенез палеоцереbellума. В раннем периоде постнатального развития это выражается в торможении роста коры, нарушении динамики развития наружного зернистого слоя, размеров перикарионов и плотности расположения клеток Пуркинье (КП). В более позднем периоде онтогенеза это проявляется в уменьшении количества нормохромных КП и увеличении гиперхромных, а также содержания в их цитоплазме РНП [2].

На 2–15 сутки в нейронах наружного зернистого слоя (НЗС) у потомства крыс с холестазом обнаружено отставание убыли экспрессии DCX, а во внутреннем зернистом слое (ВЗС) — уменьшение плотности расположения иммунопозитивных по NeuN нейронов, замедление нарастания в них экспрессии NeuN. Это свидетельствует о замедлении миграции нейронов из НЗС и формирования ВЗС в постнатальном онтогенезе [3].

При электронно-микроскопическом исследовании КП палеоцереbellума 7- и 15-суточных крысят группы «холестаз» ГрЭС развита хуже, чем в контроле, обнаруживалась ее дезорганизация, на цистернах меньшее количество рибосом, наблюдались участки цитоплазмы, заполненные преимущественно многочисленными свободными рибосомами и полисомами, что свидетельствует о замедлении дифференцировки КП. Митохондрии характеризовались полиморфизмом, наблюдалась их гипертрофия, в некоторых просветление матрикса, очаговое лизис крист, увеличение числа лизосом, которые контактируют с измененными митохондриями. Наблюдалась тесные контакты митохондрий с органеллами (особенно с ГрЭС). В некоторых КП наблюдалось расширение цистерн гладкой эндоплазматической сети. В ядре наблюдается усиленный выход субъединиц рибосом в цитоплазму. На 45 сутки цитоплазма гиперхромных КП более осмиофильна, имеется большое количество свободных рибосом и уменьшение связанных, митохондрии имели просветленный матрикс с нечеткими кристами, гипертрофия эндоплазматической сети и комплекса Гольджи.

У потомства крыс группы «холестаз» в раннем постнатальном онтогенезе нарушается синаптогенез. Наблюдается отставание в росте ширины зоны синаптогенеза в молекулярном слое и замедление уменьшения в ней иммунореактив-

ности по SYN. Повышенное количество SYN-иммунореактивных синапсов на перикарионах КП на 15-е сутки.

В мозжечке формирование клубочков мозжечка во ВЗС происходит с 7 по 45 сутки постнатального онтогенеза. В палеocerebellуме у потомства крыс с холестазами на 15 сутки после рождения выявлено увеличение плотности расположения мелких клубочков и уменьшение количества крупных и средних, по сравнению с контролем. Это свидетельствует о нарушении синаптогенеза и образования клубочков в зернистом слое мозжечка.

Повышенные в сыворотке крови уровни желчных кислот является одним из главных признаков холестаза, с ними же и связывают неблагоприятные последствия для плода при холестазах. Причем частота возникновения осложнений для плода коррелирует с их увеличением в крови матери [4]. Нарушение морфогенеза коры мозжечка у потомства крыс с холестазами также может быть обусловлено этим патогенетическим фактором. Развитие коры мозжечка происходит раньше в филогенетически более старых ее отделах. Поэтому возможно развитие потомства в условиях холестаза матери, приводит к наиболее выраженным нарушениям в филогенетически старом отделе коры мозжечка.

Таким образом, у потомства, развивавшегося в условиях экспериментального холестаза матери, наблюдается нарушение морфогенеза палеocerebellума, которые более выражены в раннем периоде (2–15 сутки), на 45 сутки наблюдаются изменения в КП, которые нивелируются к 90 суткам развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дудук, Н. И. Холестаз беременных и его последствия для матери и потомства / Н. И. Дудук, С. М. Зиматкин // Журнал ГрГМУ. 2011. № 1. С. 3–6.
2. Карнюшко, О. А. Нарушения морфогенеза коры мозжечка потомства крыс с экспериментальным холестазами и их коррекция / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2015. № 3. С. 95–101.
3. Карнюшко, О. А. Нарушения развития нейронов мозжечка у потомства крыс с холестазами и их коррекция урсодезоксихолевой кислотой / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Новости мед.-биол. наук. 2015. Т. 12, № 4. С. 185–190.
4. Успенская, Ю. Б. Современное состояние проблемы холестаза у беременных / Ю. Б. Успенская, Н. В. Гончаренко // Пробл. женск. здоровья. 2013. Т. 8, № 3. С. 70–76.

Karniushko O. A., Zimatkin S. M.

Disturbances of paleocerebellum morphogenesis of rat offspring with experimental cholestasis

Grodno State Medical University, Belarus

Histological, immunocytochemical and ultrastructural disturbances of paleocerebellum in rat offspring with experimental cholestasis induced during pregnancy in postnatal ontogenesis were found.

Key words: cholestasis, the cerebellum.