УДК:591.88:591.481.14 [591.35:616-007.15]:[616.36-008.811.6-091.8-092.9:616-085:612.357.15]

НАРУШЕНИЯ СИНАПТОГЕНЕЗА В МОЗЖЕЧКЕ ПОТОМСТВА КРЫС-САМОК С ХОЛЕСТАЗОМ И ИХ КОРРЕКЦИЯ УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТОЙ

Карнюшко О. А.(karnyushko-olga@mail.ru), Зиматкин С. М. (zimatkin@grsmu.by)
УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Цель настоящего исследования – оценка влияния обтурационного подпеченочного холестаза матери на постнатальный синаптогенез в мозжечке потомства, с помощью маркера синаптофизина (SYN), а также возможности коррекции выявленных нарушений урсодезоксихолевой кислотой (УДХК). Исследование проведено на 36 крысятах 2-45-суточного возраста. Установлено, что экспериментальный холестаз матери, вызванный на 17 сутки беременности, задерживает у их потомства синаптогенез в мозжечке, особенно в ранние сроки после рождения: во всех слоях его коры и промежуточном ядре изменяется динамика экспрессии маркера синаптических пузырьков синаптофизина, а УДХК корригирует и частично нормализует эти нарушения.

Ключевые слова: *холестаз, мозжечок, синаптогенез, развитие, синаптофизин, урсодезоксихолевая кислота.*

Холестаз беременных возникает в третьем триместре и сопровождается кожным зудом, избыточным поступлением компонентов желчи в кровь, уменьшением или нарушением поступления желчи в кишечник [9]. Холестаз не представляет большой опасности для матери, его симптомы и лабораторные признаки проходят через 1-2 недели после родов [7]. Данная патология способствует ухудшению состояния плода, а именно недоношенности, низкому весу при рождении, развитию респираторного дистресс-синдрома, антенатальной гибели. В экспериментах на животных установлено, что потомство, развивавшееся в условиях холестаза, существенно отстает в физическом развитии, массе тела и морфофункциональном становлении в онтогенезе многих органов [1]. В предыдущих исследованиях у такого потомства нами обнаружены значительные нарушения морфогенеза мозжечка [2, 3]. Оценка синаптогенеза в мозжечке крыс, развивавшихся в условиях холестаза матери, ранее не проводилась.

В настоящее время для терапии холестаза беременных применяют урсодезоксихолевую кислоту (УДХК). Она безопасна для приема во время беременности и способствует улучшению состояния как матери, так и плода [11]. УДХК улучшает гепатобилиарный транспорт, оказывает холеретический эффект, защищает мембраны гепатоцитов и холангиоцитов от повреждения токсическими желчными кислотами, а также гипохолестеринемическое, иммуномодулирующее, антиоксидантное, антиапоптотическое действие, уменьшает повреждающее воздействие компонентов желчи на структуры плаценты [10].

Развитие мозжечка в онтогенезе является сложным динамическим процессом. Моховидные и лазящие волокна являются основными афферентными путями мозжечка. Лазящие волокна (аксоны нейронов нижней оливы) достигают коры развивающегося мозжечка и устанавливают синаптические контакты с клетками Пуркинье (КП) к 18-19 дню эмбрионального развития. Затем множественная иннервация КП лазящими волокнами к моменту рождения сменяется моноиннервацией к 15 суткам постнатального развития [8]. Моховидные волокна образуют большинство афферентов в мозжечке и формируют гломерулы во внутреннем зернистом слое (ВЗС) на 2-6-й неделе постнатального развития [13]. Синаптические контакты между дендритами КП и параллельными волокнами (аксонами зернистых нейронов) начинают образовываться на 7-9 сутки после рождения, а в течение 1-3-й недели устанавливают синаптические контакты с КП корзинчатые и звездчатые нейроны.

Молекулярный маркер синаптофизин (SYN) – это интегральный белок, обеспечивающий контакт синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной, участвует в эндо- и экзоцитозе нейромедиаторов [4, 6]. В настоящее время считают, что при отсутствии SYN не происходит нарушения экзоцитоза медиатора, но замедляется заполнение синаптических пузырьков медиатором, что ограничивает возможности нейропередачи [14]. SYN синтезируется в перикарионах, а затем транспортируется по аксонам нейронов [12].

Цель исследования – оценка влияния обтурационного подпеченочного холестаза матери на постнатальный синаптогенез в мозжечке потомства крыс с помощью маркера SYN, а также возможности коррекции выявленных нарушений УДХК.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на самках беспородных белых крыс с исходной массой 180±20 г и родившемся от них потомстве (36 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, выполненной 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 операции ежедневно до родов и в течение первой недели после родов получали с пищей УДХК в дозе 50 мг/кг/сут. Полноту потребления крысами препарата строго контролировали. От каждой самки брали по одному крысенку по достижении ими 2, 7 и 15 и 45 суток после рождения и декапитировали. Для получения сопоставимых результатов от всех животных образцы мозжечка обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Их фиксировали в цинк-формалине при +4ºС (на ночь), а затем заключали в парафин. Стандартные парафиновые срезы готовили с помощью микротома (LeicaRM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Для иммуногистохимического выявления SYN применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Thermo Scientific (США) Synaptophysin Antibody (PA5-27286) (в разведении 1:400, при +4ºС, экспо-

Репозиторий ГрГМУ

зиция 20 часов, во влажной камере). Для выявления связавшихся первичных антител использовали набор Thermo Scientific (США) Super Picture™ Polymer Detection Kit (87-9663). Расположение филогенетически старого и нового отделов коры мозжечка в гистологических препаратах развивающегося мозжечка крысят определяли по Оленеву и Paxinos&Watson [5,15]. В филогенетически старом (палеоцеребеллюм) и новом (неоцеребеллюм) отделах коры измеряли плотность расположения клубочков мозжечка на 1мм2 во внутреннем зернистом слое, в молекулярном слое – ширину зоны синаптогенеза и экспрессию в нем SYN, количество синапсов на КП, а также экспрессию SYN в нейропиле промежуточного ядра мозжечка крыс. Оптическую плотность экспрессии исследуемого маркера измеряли в условных единицах.

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование и морфометрию проводили с помощью микроскопа Axioscop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (Leica DFC 320, Германия) и программы анализа изображения Image Warp (Bitflow, США). Полученные средние значения от животных в каждой экспериментальной группе анализировали методами непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 для Windows (Stat. Soft, Inc., США). В описательной статистике для каждого показателя определяли значения медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Достоверными считали различия между группами при значениях p<0,05 (Mann-Whitney U-test).

Результаты и обсуждение

На 2–45-е сутки постнатального онтогенеза у контрольных и опытных крыс по мере роста молекулярного слоя наблюдается прогрессивное увеличение ширины SYN-иммунореактивной зоны синаптогенеза. На 15 сутки после рождения у потомства группы «холестаз» как в палео- так и неоцеребеллюме наблюдается отставание в росте зоны синаптогенеза, а у крысят группы «холестаз+УДХК» – только в палеоцеребеллюме (рис. 1, табл. 1). У контрольных животных иммунореактивность по SYN в молекулярном слое прогрессивно снижается, а у крыс группы «холестаз» этот процесс запаздывает: на 15 сутки иммунореактивность как в палео-, так и неоцеребеллюме выше (табл. 2). У животных группы «холестаз+УДХК» в этот срок достоверных различий по сравнению с контролем не выявлено (табл. 2), что может свидетельствовать о корригирующем действии УДХК на нарушенный холестазом матери синаптогенез в молекулярном слое мозжечка у потомства.

К 7-м суткам после рождения в коре мозжечка SYN-иммунопозитивные синаптические контакты наблюдаются на перикарионах КП (формирующиеся аксосоматические синапсы). Установлено, что к 15-м суткам количество последних в контроле уменьшается до 2,0±1,0. У потомства группы «холестаз» и «холестаз+УДХК их количество было выше, чем в контроле, и составило 4,0±2,0 и 4,0±1,5, соответственно (p<0,05). Это свидетельствует об отставании элиминации

Таблица 1 – Ширина зоны синаптогенеза в молекулярном слое коры мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе (мкм)

	Контроль		Холестаз		Холестаз+УДХК	
Сутки	Палеоцеребеллюм	Неоцеребеллюм	Палеоцеребеллюм	Неоцеребеллюм	Палеоцеребеллюм	Неоцеребеллюм
7	29,2±8,5	24,2±5,6	24,5±6,5	20,9±4,3	25,1±2,7	23,2±8,7
15	82,0±12,0	78,0±13,0	60,2±9,4*	69,2±3,5*	70,3±12,3*	78,6±12,6
45	170,5±17,8	146,6±20,5	160,9±29,2	146,7±10,2	174,0±30,6	155,8±8,1

Таблица 2. – Иммунореактивность синаптофизина в зоне синаптогенеза молекулярного слоя коры мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе (в единицах оптической плотности)

	Контроль		Холестаз		Холестаз+УДХК	
Сутки	Палеоцеребеллюм	Неоцеребеллюм	Палеоцеребеллюм	Неоцеребеллюм	Палеоцеребеллюм	Неоцеребеллюм
7	0,29±0,02	0,32±0,04	0,24±0,03*	0,35±0,05	0,25±0,04*	0,28±0,08
15	0,25±0,05	0,23±0,02	0,29±0,04*	0,29±0,04*	0,26±0,04	0,28±0,06
45	0,22±0,03	0,23±0,02	0,22±0,01	0,23±0,01	0,22±0,04	0,23±0,04

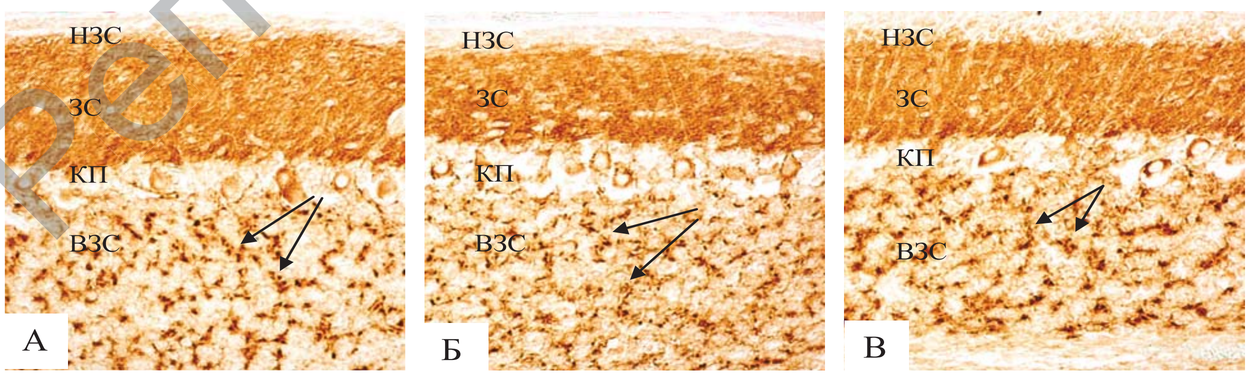
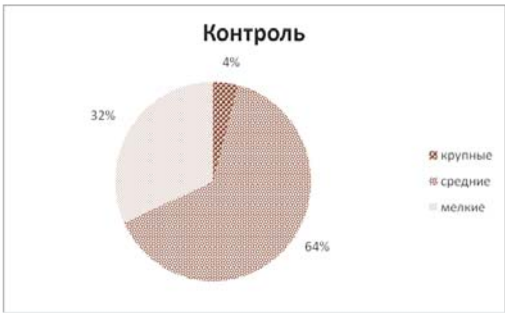
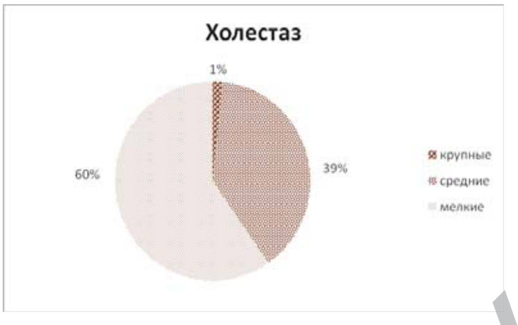


Рисунок 1 .– Ширина SYN – иммунопозитивной зоны синаптогенеза в молекулярном слое палеоцеребеллюма 15-суточных крысят. А – контроль, Б – холестаз, В – холестаз+УДХК. НЗС – наружный зернистый слой; ЗС – зона синаптогенеза в молекулярном слое, КП – клетки Пуркинье, ВЗС – внутренний зернистый слой, стрелками показаны клубочки мозжечка Ув. 200

Репозиторий ГрГМУ





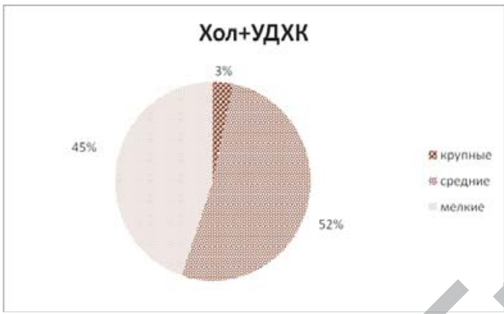


Рисунок 2. – Плотность расположения клубочков мозжечка на 1 мм² зернистого слоя палеоцеребеллюма 15-суточных крысят

синапсов на КП у потомства крыс с холестазом.

В период формирования клубочков мозжечка с 7-х по 45-е сутки во внутреннем зернистом слое у контрольных животных увеличивается количество крупных синапсов и уменьшается количество мелких, что характеризует образование клубочков мозжечка. У потомства крыс с холестазом на 15-е сутки после рождения в палеоцеребеллюме выявлено увеличение плотности расположения мелких клубочков мозжечка и уменьшение количества крупных и средних по сравнению с контролем, а у потомства крыс с холестазом, получавших коррекцию УДХК, достоверных различий по сравнению с контролем не обнаружено (рис. 1, 2), что свидетельствует о нарушении синаптогенеза в зернистом слое мозжечка у потомства крыс с холестазом и нормализации этого процесса под действием УДХК.

В нейропиле промежуточного ядра, где располагаются аксодендритические синапсы, у крысят группы «холестаз» на 2-е сутки постнатального онтогенеза экспрессия SYN ниже, чем в контроле, а на 15-е сутки выше, что свидетельствует о запаздывании синаптогенеза. Применение УДХК нормализует этот показатель (рис. 3, табл. 3).

Таким образом, у потомства крыс с обтурационным подпеченочным холестазом, вызванным на 17-е сутки беременности, нарушается синаптогенез в мозжечке. Известно, что экспрессия SYN в молекулярном слое мозжечка обусловлена главным образом синаптическими контактами между дендритами КП и параллельными волокнами [16]. Нами показано, что у крыс, развивавшихся в условиях холестаза матери, наблюдается отставание в росте ширины зоны синаптогенеза и замедление уменьшения в ней иммунореактивности по SYN в раннем постнатальном онтогенезе, что может быть связано с замедлением формирования дендритного дерева КП и формирования

Таблица 3. – Экспрессия синаптофизина в нейропиле промежуточного ядра мозжечка крыс в постнатальном онтогенезе (в единицах оптической плотности)

Сутки	Контроль	Холестаз	Холестаз+УДХК
2	0,22±0,03	0,18±0,02*	0,22±0,03
7	0,23±0,03	0,23±0,03	0,22±0,03
15	0,22±0,01	0,24±0,00*	0,23±0,04
45	0,21±0,04	0,20±0,07	0,23±0,03

ими синапсов с параллельными волокнами. Повышенное количество SYN-иммунореактивных синапсов на перикарионах КП на 15-е сутки после рождения связано с замедлением элиминации избыточного количества синапсов, образованных лазящими волокнами, и замедлением их перемещения на дендриты КП.

У крысят группы «холестаз» на 15-е сутки после рождения наблюдалось меньшее количество крупных и средних SYN-иммунопозитивных синапсов во внутреннем зернистом слое и большее количество мелких, что, возможно, связано с нарушением формирования клубочков мозжечка. УДХК корригировала этот процесс.

Уменьшение иммунореактивности в нейропиле промежуточного ядра крысят группы «холестаз» связано с меньшим количеством аксоденритических синапсов, которые образованы преимущественно аксонами развивающихся КП, а также коллатералями лазящих, моховидных и многослойных волокон.

Протективное действие УДХК на синаптогенез в мозжечке может быть связано с холеретическим действием, стимуляцией билиарной секреции желчных кислот, с усилением элиминации токсических компонентов желчи, снижением транспорта желчных кислот через плаценту к плоду, что уменьшает вероятность развития его повреждения [10].

Репозиторий ГрГМУ

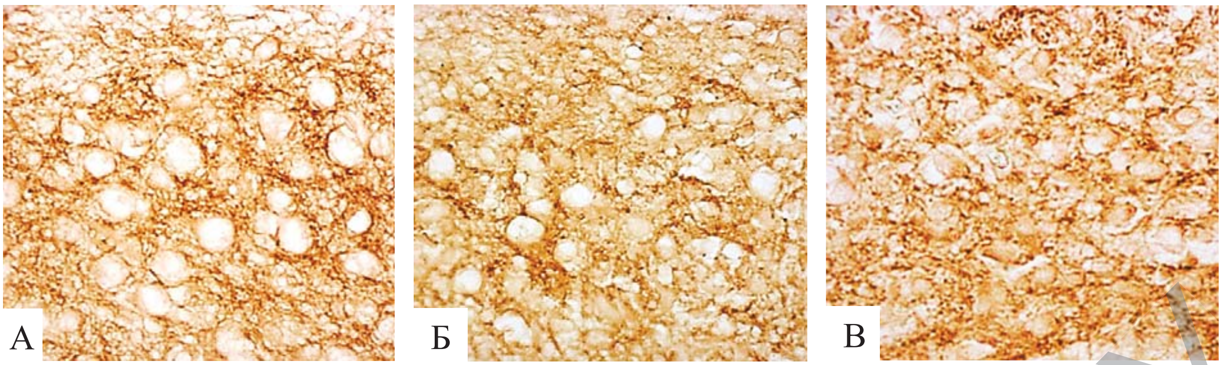


Рисунок 3. – SYN – иммунопозитивные синапсы промежуточного ядра мозжечка 2-суточных крысят, А – контроль, Б – холестаз, В – холестаз+УДХК. Ув. 400

Выводы

1. У потомства крыс с обтурационным подпеченочным холестазом, вызванным на 17-е сутки беременности, нарушается синаптогенез в мозжечке, особенно в ранние сроки после рождения: во всех слоях его коры и промежуточном ядре изменяется динамика экспрессии маркера синаптических пузырьков синаптофизина.
2. УДХК корригирует и частично нормализует нарушения синаптогенеза в мозжечке потомства, которое развивалось в условиях холестаза матери.

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 промежуточного ядра мозжечка потомства крыс с холестазом, вызванным во время беременности; коррекция урсодезоксихолевой кислотой / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Новости мед. – биол. наук. – 2015. – Т. 11, № 2. – С. 139-145.
3. Карнюшко, О. А. Нарушения морфогенеза коры мозжечка потомства крыс с экспериментальным холестазом и их коррекция / О. А. Карнюшко, С. М. Зиматкин // Вес. НАН Беларусі.Сер. мед. навук.- 2015. - №3. – С.95-101.
4. Колос, Е. А. Маркер синаптических контактов – синаптофизин / Е. А. Колос, И. П. Григорьев, Д. Э. Коржевский // Морфология. - 2015. -Т. 147, № 1.-С.78-82.
5. Оленев, С. Н. Развивающийся мозг / С. Н. Оленев // Л.: Наука. - 1978. - 221 с.
6. Одновременное выявление глутаматдекарбоксилазы и синаптофизина в парафиновых срезах мозжечка крысы / Д. Э. Коржевский [и др.] // Морфология. - 2015. - Т. 147, № 1. - С. 74-77.
7. 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.
8. A change in the pattern of activity affects the developmental regression of the Purkinje cell polyinnervation by climbing fibers in the rat cerebellum / P. R. Andjus [et.al] // Neuroscience. - 2003. - Vol. 121, № 3. - P. 563-572.
9. Dixon, P. H. The pathophysiology of intrahepatic cholestasis of pregnancy / P. H. Dixon, C. Williamson // Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. – 2016. Jan 25. pii: S2210-7401(15)00299-5. doi: 10.1016/j.clinre.2015.12.008.
10. Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal cholestasis in the rat placenta maternal liver tandem excretory pathway / M.A. Serrano [et.al] // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 2003. - № 305. - P. 515–524.
11. Efficacy of ursodeoxycholic acid in treating intrahepatic

Literatura

1. Duduk, N. I. Xolestaz beremenny'x i ego posledstviya dlya materi i potomstva / N. I. Duduk, S. M. Zimatkin // Zhurnal GrGMU. – 2011. - № 1. – S. 3-6.
2. Karnyushko, O. A. Narusheniya morfogeneza promezhutochnogo yadra mozzhechka potomstva kry's s xolestazom, vy'zvanny'm vo vremya beremennosti; korrekciya ursodezoksixolevoj kislotoj / O. A. Karnyushko, S. M. Zimatkin // Novosti med. – biol. nauk. – 2015. – T. 11, № 2. – S. 139-145.
3. Karnyushko, O. A. Narusheniya morfogeneza kory' mozzhechka potomstva kry's s e'ksperimental'ny'm xolestazom i ix korrekciya / O. A. Karnyushko, S. M. Zimatkin // Ves. NAN Belarusi.Ser. med. navuk.- 2015. - №3. – S.95-101.
4. Kolos, E. A. Marker sinapticheskix kontaktov – sinaptofizin / E. A. Kolos, I. P. Grigor'ev, D. E'. Korzhevskij // Morfologiya. - 2015. -T. 147, № 1.-S.78-82.
5. Olenev, S. N. Razvivayushhijsya mozg / S. N. Olenev // L.: Nauka. - 1978. - 221 s.
6. Odnovremennoe vy'yavlenie glutamatdekarboksilazy' i sinaptofizina v parafinovy'x srezax mozzhechka kry'sy' / D. E'. Korzhevskij [i dr.] // Morfologiya. - 2015. - T. 147, № 1. - S. 74-77.
7. Uspenskaya, Yu. B. Sovremennoe sostoyanie problemy' xolestaza u beremenny'x / Yu. B. Uspenskaya, N. V. Goncharenko // Probl. zhensk. zdorov'ya. - 2013. - T.8, № 3. – S. 70-76.
8. A change in the pattern of activity affects the developmental regression of the Purkinje cell polyinnervation by climbing fibers in the rat cerebellum / P. R. Andjus [et.al] // Neuroscience. - 2003. - Vol. 121, № 3. - P. 563-572.
9. Dixon, P. H. The pathophysiology of intrahepatic cholestasis of pregnancy / P. H. Dixon, C. Williamson // Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. – 2016. Jan 25. pii: S2210-7401(15)00299-5. doi: 10.1016/j.clinre.2015.12.008.
10. Effect of ursodeoxycholic acid on the impairment induced by maternal cholestasis in the rat placenta maternal liver tandem excretory pathway / M.A. Serrano [et.al] // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 2003. - № 305. - P. 515–524.

Репозиторий ГрГМУ

cholestasis of pregnancy: a meta- analysis / Y. Bacq [et.al] // Gastroenterology. - 2012. - Vol. 143, № 6. –P. 1492–1501.

12. Fujita, M. Developmental profiles of synaptophysin in granule cells of rat cerebellum: an immunohistocytochemical study / M, Fujita, T. Kadota, T. Sato // J. Electron. Microsc. (Tokyo). - 1996. - Vol. 45, №3. - P. 185-194.

13. Hamori, J. Differentiation of cerebellar mossy fiber synapses in the rat: a quantitative electron microscope study / J. Hamori, J. Somogyi // J. Comp Neurol. – 1983. - Vol. 220, № 4. - P. 365-77.

14. Kwon, S. E. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons / S. E. Kwon, E. R. Chapman // Neuron. - 2011. - Vol. 70, № 5. - P. 847-854.

15. Paxinos, G. The Rat Brain in stereotaxic coordinates, 7th Edition / G. Paxinos, C. Watson // Academic Press. - 2013. – 472 p.

16. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex / N. Leclerc [et.al] // J. Comp. Neurol. - 1989. - Vol. 280, № 2. - P. 197-212.

11. Efficacy of ursodeoxycholic acid in treating intrahepatic cholestasis of pregnancy: a meta- analysis / Y. Bacq [et.al] // Gastroenterology. - 2012. - Vol. 143, № 6. –P. 1492–1501.

12. Fujita, M. Developmental profiles of synaptophysin in granule cells of rat cerebellum: an immunohistocytochemical study / M, Fujita, T. Kadota, T. Sato // J. Electron. Microsc. (Tokyo). - 1996. - Vol. 45, №3. - R. 185-194.

13. Hamori, J. Differentiation of cerebellar mossy fiber synapses in the rat: a quantitative electron microscope study / J. Hamori, J. Somogyi // J. Comp Neurol. – 1983. - Vol. 220, № 4. - P. 365-77.

14. Kwon, S. E. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons / S. E. Kwon, E. R. Chapman // Neuron. - 2011. - Vol. 70, № 5. - R. 847-854.

15. Paxinos, G. The Rat Brain in stereotaxic coordinates, 7th Edition / G. Paxinos, C. Watson // Academic Press. - 2013. – 472 p.

16. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex / N. Leclerc [et.al] // J. Comp. Neurol. - 1989. - Vol. 280, № 2. - R. 197-212.

DISTURBANCES OF SYNAPTOGENESIS IN THE CEREBELLUM OF OFFSPRING OF FEMALE RATS WITH CHOLESTASIS AND THEIR CORRECTION WITH URSODEOXYCHOLIC ACID

Karniushko O. A., Zimatkin S. M.

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

The purpose of the study was to evaluate the effect of mother's subhepatic cholestasis on the postnatal synaptogenesis in the cerebellum of offspring with the marker synaptophysin (SYN) as well as to assess the possibility of correction of the revealed disturbances with ursodeoxycholic acid (UDCA). 36 rat pups from 2 to 45 days old were studied. It was found that experimental cholestasis induced in the mother on the 17th day of gestation retarded synaptogenesis in the cerebellum of their offspring, especially in the early period after birth: in all cortex layers and nucleus interpositus of the cerebellum there were changes in the dynamics of the expression of the synaptic vesicles marker synaptophysin, while UDCA partially corrected these disturbances.

Keywords*: cholestasis, cerebellum, synaptogenesis, development, synaptophysin, ursodeoxycholic acid.*

Поступила: 28.03.2016 *Отрецензирована: 14.04.2016*

Репозиторий ГрГМУ