

## Ультраструктурные и морфометрические особенности синаптогенеза мозга эмбрионов и плодов человека в условиях пренатального воздействия этанола

Солонский А.В.<sup>1</sup>, Логвинов С.В.<sup>2</sup>

## Ultrastructural and morphometrical peculiarities of embryo and fetus brain synaptogenesis under conditions of prenatal ethanol exposure

Solonsky A.V., Logvinov S.V.

<sup>1</sup> НИИ психического здоровья ТНЦ СО РАМН, г. Томск

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Солонский А.В., Логвинов С.В.

Методами электронной микроскопии и морфометрии изучены особенности формирования структуры эмбриональных синапсов мозга эмбрионов и плодов человека на ранних стадиях (7—12 нед) развития при алкоголизации матери. Электронно-микроскопически на материале, полученном от женщин, больных алкоголизмом, установлено замедление формирования синаптических структур. При морфометрии показано, что под влиянием пренатальной алкоголизации на 9—12-й нед развития происходит задержка формирования компонентов синаптических контактов мозга: выявлено снижение площади пресинаптических терминалей и их периметра, а также уменьшение периметра постсинаптических уплотнений.

**Ключевые слова:** человек, мозг, эмбрион, плод, синапс, этанол.

The method of electron microscopy and morphometry have been used to study peculiarities in formation of the structure of human embryo and fetus brain synapses at early stages (7 to 12 weeks) of development at mother alcoholization. Electron microscopy of material obtained from alcoholic women has shown slowing-down of formation of synaptic structure. Morphometry has revealed that under the influence of prenatal alcoholization the formation of components of synaptic brain contacts slows down at 9—12<sup>th</sup> weeks of development: the area of presynaptic terminals and their perimeter decreases, and the perimeter of postsynaptic densities decreases as well.

**Key words:** human, brain, embryo, fetus, synapse, ethanol.

УДК 572.74:616.831-053.1:547.262

### Введение

В онтогенетическом развитии формообразование синаптических контактов является одним из ведущих процессов, течение которого во многом определяет будущие интегративные возможности мозга. Модифицировать синаптогенез могут некоторые экзогенные и эндогенные факторы, в том числе этанол, поступающий в организм эмбриона при употреблении его беременной женщиной [4]. Как липотропный агент, этанол способен существенно менять физико-химические свойства мембран клеток, что отражается на течении синаптогенеза эмбрионального мозга [1, 3]. Для установления характера этого влияния было предпринято настоящее исследование.

Цель — выявить характерные особенности синаптогенеза в головном мозге эмбрионов и плодов, развивавшихся в организме беременных женщин, употреблявших этанол.

### Материал и методы

Изучался головной мозг эмбрионов и плодов человека 7—12 нед развития, которые были получены в соответствии с требованиями этического комитета, с согласия пациенток, в процессе проведения операций по прерыванию беременности. Всего было получено 53 эмбриона: 23 — от больных алкоголизмом женщин (основная группа) и 30 — от здоровых женщин (контрольная группа). Возраст больных алкоголизмом составлял 26—39 лет, длительность заболевания — от 3 до 13 лет. Во всех случаях была диагностирована II стадия алкоголизма (F 10.201, F 10.202 по МКБ-10). Диагноз установлен в результате клинического обследования со-

трудниками отделения аддитивных состояний НИИ психического здоровья ТНЦ СО РАМН (г. Томск). Возраст женщин контрольной группы был аналогичен таковому у больных матерей.

Головной мозг эмбрионов и плодов фиксировали в 0,5%-м растворе глутаральдегида на фосфатном буфере с концентрацией 0,1 моль, рН = 7,3 ÷ 7,4. Кусочки мозга размером 1 мм<sup>3</sup> дофиксировали в 1%-м растворе OsO<sub>4</sub> на том же буфере в течение 1 ч, затем дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме «Ultracut-E» (Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали в электронных микроскопах JEM-100В и JEM-100СХ (Япония). Для исключения возможных ошибок снимки делали с одним и тем же увеличением, как правило, 36 000 или 48 000. Это связано с такой особенностью эмбриональной ткани, как незначительное количество синапсов на ранних стадиях развития, и величиной самих синаптических соединений. Электронно-микроскопически исследовали промежуточный слой стенки переднего мозга, представляющий собой скопление нейроblastов, глиобlastов (включая микроглиальные клетки), между которыми начинают прорастать кровеносные сосуды.

Морфометрическому анализу подвергали фотоотпечатки с негативов формата 6 × 9 см, полученных с помощью электронного микроскопа. Отпечатки с негативов делали контактным способом 1 : 1, затем изображение сканировали в градациях серого с разрешением 300 dpi с сохранением в формате TIFF без компрессии. Часть негативов оцифровывали с помощью сканера без промежуточных бумажных фотокопий. На снимках при помощи программы Scion Image for Windows, разработанной в National Institute of Health фирмой «Scion Corporation», были исследованы площадь пресинаптической терминали, ее периметр, а также длина постсинаптического уплотнения.

Для анализа брали по пять случаев из каждого возрастного периода в контрольной и основной группах эмбрионов. Из каждого случая использовали по 15—20 микрофотографий различных участков промежуточного слоя. Результаты измерений представлены в относительных значениях, выражающих число пикселей (р) при оценке длины и число пикселей изображения в квадрате (р<sup>2</sup>) при оценке площади структурных компонентов синапсов.

Распределение признаков достоверно не отличалось от нормального, поэтому для статистической обработки дан-

ных применяли параметрический метод вариационной статистики (t-критерий Стьюдента) с использованием программы Statistica 6.0, различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Проведенное исследование подтвердило, что развитие межклеточных контактов в мозге человека начинается с несинаптических форм соединений. Доказательством этому служит наличие многочисленных соединений между клетками, которые относятся к десмосомовидным, наиболее распространенным в мозгу 7-недельных эмбрионов. Различаются контакты характером расположения парамембранного электронно-плотного материала на контактирующих мембранах. Первый вариант — парамембранные утолщения симметричны и синаптическая щель имеет одинаковую ширину на всем протяжении контакта. Электронно-плотный материал имеет форму двух прямоугольников, вытянутых вдоль щели (рис. 1).

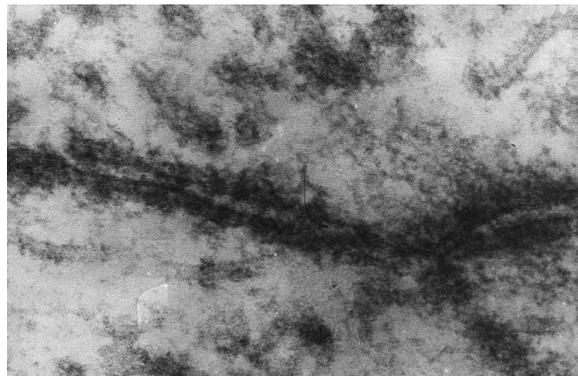


Рис. 1. Контакт авезикулярного типа с равномерно утолщенными мембранами. Основная группа, плод 10—11 нед. Ув. 160 000

Второй вариант — при аналогичном расположении всех составляющих компонентов контакта парамембранные уплотнения обеих мембран имеют неровный контур. Контакты этого типа обнаружены между телами клеток (соматосоматические), между телом клетки и отростками (соматодендритические), а также между отростками клеток (дендродендритические, аксодендритические).

Менее распространенными являются щелевидные соединения, контактирующие мембраны которых имеют в своей средней части симметричные субсинаптические субъединицы. Контакты такого типа встречаются между телами клеток и между различными отростками.

В более поздние сроки развития, начиная с 8-й нед, указанных типов соединений становится меньше, но одновре-

менно возникают контакты, в одной из контактирующих зон которых формируются везикулярные элементы. Синаптические пузырьки, как правило, округлой формы, со светлым центром, и диаметр их составляет около 40 нм. Ширина щели таких незрелых везикулярных синапсов имеет размер около 20 нм.

В пресинаптических отделах наблюдаются плотные проекции, являющиеся специализированными образованиями синаптического цитоскелета, протяженность которых достигает 0,1—0,15 мкм [2].

Появление одиночных синаптических пузырьков вблизи пресинаптической мембраны можно считать переходным этапом от синаптоидных контактов (авезикулярных) к истинно синаптической их форме.

В целом такие синапсы можно назвать функционально компетентными. Они располагались преимущественно в области нижней границы промежуточного слоя коры головного мозга (рис. 2).

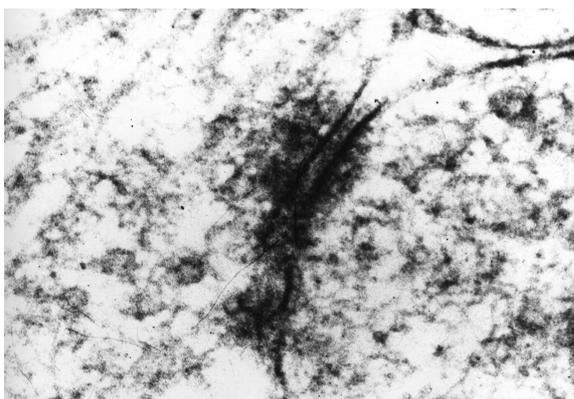


Рис. 2. Одиночные синаптические пузырьки в области формирующегося везикулярного контакта. Основная группа, плод 12 нед. Ув. 144 000

На стадии развития 10—12 нед количество синапсов с относительно зрелой структурой увеличивалось. С большей вероятностью их можно было обнаружить как на границе вентрикулярного и промежуточного слоев, так и в промежуточном слое нервных клеток. На этой стадии синаптические контакты имели все необходимые компоненты, отличаясь от синапсов зрелого мозга меньшим числом синаптических пузырьков (рис. 3).



Рис. 3. Формирующийся синапс в промежуточном слое коры головного мозга. Основная группа, плод 12 нед. Ув. 40 000

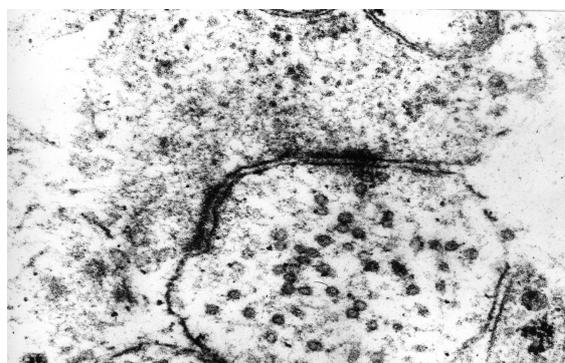


Рис. 4. Сформированный функционально компетентный синапс. Основная группа, эмбрион 11—12 нед. Ув. 70 000

Все описанные выше особенности наблюдались как в контрольной, так и в основной группе эмбрионов.

На материале, полученном от женщин, больных алкоголизмом, установлено замедление формирования синаптических структур. Если формы несинаптических соединений по частоте и структуре не отличались от контрольных и десмосомовидные контакты различной структуры и немногочисленные щелевидные соединения были в этом мозге достаточно распространены, то везикулярных синапсов было значительно меньше. Даже при полностью сформированной структуре синаптического соединения появление синаптических пузырьков в них запаздывает по сравнению с контролем. Как правило, меньшей была и площадь активной зоны синапса.

Для морфометрического анализа электронные микрофотографии синапсов мозга были разделены на четыре подгруппы соответственно сроку развития эмбрионов: 1-я подгруппа — сроки развития 7—8 нед, 2-я подгруппа — 9 нед, 3-я подгруппа — 10 нед и 4-я подгруппа — 11—12 нед. Соответствующее разделение производили в контрольной и основной группах эмбрионов (см. таблицу).

Морфометрические параметры синапсов на разных стадиях развития ( $M \pm m$ )

Параметр	Срок развития, нед							
	7—8		9		10		11—12	
	К (n = 90)	А (n = 90)	К (n = 210)	А (n = 210)	К (n = 210)	А (n = 210)	К (n = 210)	А (n = 210)
Длина постсинаптического уплотнения, р	25,21 ± 3,00	23,56 ± 2,40	36,21 ± 1,56	32,45 ± 1,23*	42,37 ± 1,70	35,80 ± 2,37*	63,33 ± 2,51	51,90 ± 2,88*
Площадь пресинаптической терминали, р <sup>2</sup>	—	—	54521 ± 2673	48861 ± 6773*	66964 ± 3833	63178 ± 3168*	75742 ± 3207	66750 ± 4436*
Периметр пресинаптической терминали, р	—	—	896,28 ± 63,70	798,90 ± 40,09*	948,19 ± 58,20	941,56 ± 64,44	1276,02 ± 73,08	1129 ± 86,87*

П р и м е ч а н и е. К — контрольная группа, А — основная группа; n — общее число проанализированных синапсов; звездочкой отмечены достоверные различия опытных значений параметров от контрольных ( $p < 0,01$ ).

Анализ морфометрических показателей синапсов начинали с общей оценки контрольной и основной групп. При сравнении суммарных показателей периметра пресинаптических терминалей, площади пресинаптических терминалей и длины постсинаптических уплотнений обнаружены значительные различия изученных параметров. Различия состояли в достоверном ( $p < 0,01$ ) снижении всех параметров развивающихся синаптических соединений в основной группе по сравнению с группой контроля. Затем был произведен более детальный анализ параметров синапсов с учетом срока развития эмбрионов и плодов.

Подгруппа 1 оказалась наиболее трудной для анализа, поскольку к этому сроку развития, как уже указано выше, количество синаптических соединений весьма невелико. Результаты исследования показали, что на 7—8-й нед развития длина постсинаптического уплотнения была наименьшей в изучаемых группах и составила в среднем ( $25,21 \pm 3,00$ ) р в контроле и ( $23,56 \pm 2,40$ ) р в основной группе, различия статистически недостоверны ( $p > 0,1$ ). Недоступными для анализа в указанной подгруппе оказались периметр пресинаптической терминали и ее площадь, так как к этому сроку развития пресинаптический отдел синаптических соединений локализуется, как правило, на крупных дендритах.

Таким образом, на стадии 7—8 нед развития выявлено незначительное уменьшение длины постсинаптических уплотнений в основной группе, но это различие не достигает уровня значимости.

Подгруппа 2 характеризовалась рядом особенностей по сравнению с первой. Синаптические соединения в этом периоде более структурированы и встречаются чаще, особенно на верхней границе промежуточного слоя. Длина постсинаптических уплотнений составила ( $36,21 \pm 1,56$ ) р в контроле и ( $32,45 \pm 1,23$ ) р в основной группе, различия статистически

достоверны ( $p < 0,01$ ). Периметр пресинаптической терминали составил ( $896,28 \pm 63,70$ ) р в контроле и ( $798,90 \pm 40,09$ ) р в основной группе, различия статистически достоверны ( $p < 0,01$ ). Значения площади, полученные для пресинаптической терминали в контрольной группе, оказались равными ( $54\,521 \pm 2\,673$ ) р<sup>2</sup> для контрольной группы и ( $48\,861 \pm 6\,773$ ) р<sup>2</sup> для основной ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, количественные параметры синаптических соединений на 9-й нед развития в основной и контрольной группах отличаются достоверно, причем в основной группе показатели немного ниже, что повторяет тенденцию, выявленную при анализе предыдущей подгруппы. По данным исследования, алкоголь в этот период развития оказывает модифицирующее влияние на становление межклеточных взаимосвязей.

При изучении 3-й подгруппы также наблюдались отклонения в сторону уменьшения значений морфометрических параметров в основной группе по сравнению с контрольной. В 3-й подгруппе отмечено уменьшение длины постсинаптических уплотнений и площади пресинаптических терминалей ( $p < 0,01$ ). Количественные параметры периметра пресинаптических терминалей не отличались от контрольных значений.

В 4-й подгруппе выявлены достоверные отличия морфометрических параметров длины постсинаптических уплотнений синаптических контактов ( $p < 0,01$ ), уменьшение площади пресинаптической терминали в основной группе исследования ( $p < 0,01$ ), а также периметра пресинаптических терминалей ( $p < 0,01$ ).

Кроме количественных показателей было обращено внимание на то, что большинство проанализированных синапсов в сроки развития 11—12 нед были представлены аксодендритическими положительно изогнутыми синапсами с

небольшим количеством синаптических пузырьков и одиночными митохондриями в пресинаптических отделах синапсов.

Как показали морфометрические исследования, алкоголизация влияет на развитие важных с точки зрения структурной организации частей синапса — уменьшается периметр и площадь пресинаптической терминали. Это указывает на сниженную способность таких синапсов участвовать в передаче импульсов, адресованных соседним клеткам. Вполне логичным является обнаруженное уменьшение протяженности постсинаптических уплотнений. Необходимо отметить, что сходные нарушения развития синаптических контактов наблюдали и другие исследователи, о чем идет речь в работе P.A. Yanni, T.A. Lindsley [5], выполненной на культуре ткани гиппокампа при внесении в нее раствора этанола. В отличие от результатов, полученных этими авторами, в данном исследовании не отмечено снижения количества дендритов различной длины, однако параметры синапсов изменялись сходным образом.

### Заключение

Таким образом, пренатальное воздействие этанола на мозг эмбрионов и плодов человека существенно нарушает

формирование нейрональных механизмов, лежащих в основе восприимчивости и обработки информации, что, в свою очередь, может сказываться на психической деятельности индивида.

### Литература

1. Бохан Н.А., Прокопьева В.Д. Молекулярные механизмы влияния этанола и его метаболитов на эритроциты *in vitro* и *in vivo*. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. 166 с.
2. Семченко В.В., Боголепов Н.Н., Степанов С.С. Синаптоархитектоника коры большого мозга. Омск: ИПК «Омич». 1995. 168 с.
3. Солонский А.В., Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. Структурно-функциональные особенности мембран клеток крови и мозга при алкогольной интоксикации // Сиб. вестн. психиатрии и наркологии. 2006. № 3. С. 36—39.
4. Bakkum B.W., Benevento L.A., Cohen R.S. Effects of light-dark and dark-rearing on synaptic morphology in the superior colliculus and visual cortex of the postnatal and adult rat // J. Neurosci. Res. 1991. V. 28. № 1. P. 65—80.
5. Yanni P.A., Lindsley T.A. Ethanol inhibits development of dendrites and synapses in rat hippocampal pyramidal neuron cultures // Brain Res Dev Brain Res. 2000. V. 120. № 2. P. 233—243.

Поступила в редакцию 10.12.2007 г.

### Сведения об авторах

**А.В. Солонский** — канд. мед. наук, зав. лабораторией нейробиологии НИИ психического здоровья ТНЦ СО РАМН (г. Томск).

**С.В. Логвинов** — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии СибГМУ (г. Томск).

### Для корреспонденции

Анатолий Владимирович Солонский, тел. (83823) 98-08-76, сот. 8-913-859-35-88, anatsol@mail.ru