

УДК 612.83:616-091.818-06:[612.821.44+613.842]

ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА И НЕЙРОГЕНЕЗА В НЕЙРОНАХ МОТОРНЫХ ЯДЕР СПИННОГО МОЗГА МОЛОДЫХ КРЫС ПОСЛЕ ЭКЗОГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Устинова Т.И., Медведева Н.Н., Малиновская Н.А.

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ; НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, Красноярск, Россия, e-mail: ecnbyjdf85@mail.ru

В данной статье показана взаимосвязь процессов апоптоза и нейрогенеза в нейро-глиальных популяциях моторных ядер спинного мозга крыс ювенильного возраста после воздействия легким алкогольным напитком и табачным дымом. В зависимости от продолжительности экзогенного воздействия оценивали степень повреждения (апоптоз) и восстановления (нейрогенез) нервных клеток в сравнении с интактной группой животных. Оценивали участие транскрипционного фактора Pax6 в процессах нейрогенеза. Для анализа данных процессов были использованы гистологические и иммуногистохимические методы. Установлено, что запрограммированная гибель клеток происходит на всех сроках воздействия экзогенных факторов с разной степенью выраженности, а процессы нейрогенеза наблюдаются в определенные сроки. Эти данные позволяют говорить о процессах частичного восстановления нервной ткани после травмирующего экзогенного воздействия. Полученные результаты могут в дальнейшем быть использованы для разработки профилактических работ, направленных на восстановление нервных клеток.

Ключевые слова: нейрон, спинной мозг, апоптоз, некроз, нейрогенез.

OF APOPTOSIS AND NEUROGENESIS IN THE NEURONS IN THE MOTOR NUCLEI OF THE SPINAL CORD IN YOUNG RATS AFTER EXTERNALITIES

Ustinova T.I., Medvedeva N.N., Malinowskaya N.A.

Medical University "Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky Ministry of Health"; Institute of Molecular Medicine and patobiohimii, Krasnoyarsk, Russia (660022, Krasnoyarsk, street Zheleznyaka Partizana, 1), e-mail: ecnbyjdf85@mail.ru

This article shows the relationship of apoptosis and neurogenesis in the neuro-glial populations of motor nuclei of the spinal cord of rats after exposure to the juvenile age of light alcoholic beverages and tobacco smoke. Depending on the duration of exposure to exogenous evaluated the degree of damage (apoptosis), and recovery (neurogenesis) neuronal cells compared to intact group of animals. Evaluated transcription factor Pax6 participation in the processes of neurogenesis. For data analysis processes are used histological and immunohistochemical techniques. It was established that programmed cell death occurs at all stages of the impact of exogenous factors with varying degrees of severity, and the processes of neurogenesis observed in certain terms. These data allow us to talk about the partial recovery of neural tissue after traumatic effects of exogenous. The results obtained can be further used for the development of prophylactic activities aimed at restoring neuronal cells.

Keywords: neuron, spinal cord, apoptosis, necrosis, neurogenesis.

Процесс апоптоза является запрограммированной гибелью клеток, который может происходить при нормально протекающих условиях окружающей среды для организма, и может носить не всегда положительный характер. Исследования этого процесса за последние годы расширили представления о нем как о запрограммированной гибели клеток. Нас интересовали исследования этого процесса в области неврологии. Наиболее часто встречаются данные по изучению ишемии головного мозга, связанной с нарушением кровоснабжения тканей, данные повреждения запускают программы самоуничтожения клеток [2].

В ранних исследовательских работах гибель нейронов при острой церебральной ишемии интерпретирована как некроз ткани мозга. На современном этапе развития нейронауки существуют данные о том, что признаки апоптоза наблюдаются во всех структурах нейроглиальной популяции, преимущественно повреждаются олигодендроциты. При этом количество погибших клеток возрастает в зависимости от продолжительности ишемии мозга. Существуют данные о том, что число апоптозных клеток максимально увеличивается на более длительном сроке воздействия экзогенным фактором. Эти данные свидетельствуют о том, что реанимационные мероприятия, проводимые на ранних сроках воздействия экзогенным фактором, могут защитить поврежденную ткань мозга [4]. Современные исследования травматического повреждения спинного мозга рассматривают два основных взаимосвязанных механизма гибели клеток: апоптоз и некроз. Оба типа клеточной смерти имеют место быть в травмированном спинном мозге, при этом апоптоз рассматривается как один из путей клеточного обмена. На ранних этапах повреждения тканей спинного мозга наблюдается некроз – конденсация хроматина в размытые массы и деградация органоидов, позже происходит разрушение мембран, и только после этого запускается апоптоз, необходимый для обновления клеточного пула нервной ткани, её клеточной дифференцировки и развития. Как правило, апоптоз развивается при действии менее сильного повреждающего фактора, запуская внутренние энергозависимые механизмы самоуничтожения клетки – наблюдается конденсация ядерного хроматина, сморщивание тела клетки при сохранной цитоплазматической мембране, затем происходит разделение на отдельные фрагменты цитоплазмы, содержащие хроматин [5; 6]. Апоптоз в спинном мозге происходит в следующей последовательности – гибель нейронов, микроглии, олигодендроглии, приводя к общей дегенерации. Таким образом, апоптоз нейронов приводит к существенной потере числа активных клеток, растущей в прогрессии, а апоптоз глии препятствует выживанию и прорастанию оставшихся волокон, что выражается в отсутствии полноценной регенерации в спинном мозге. Изучение апоптоза при травматическом повреждении спинного мозга является очень перспективным с точки зрения возможности влияния на патологический процесс [5; 6].

Наряду с процессами гибели клетки изучались механизмы восстановления нервных клеток, одним из которых является нейрогенез. Процессы апоптоза и нейрогенеза – два взаимодополняющих механизма, направленных на поддержание гомеостаза в организме. Нейрогенез – процесс образования новых нервных клеток, в котором важную роль играет транскрипционный фактор Рахб – регулятор пролиферации, дифференцировки и созревания

нейронов, а также глиогенеза (процесс образования новых глиоцитов). В научной литературе приводятся факты об экспрессии Рахб в стволовых клетках-предшественниках (радиальная глия), а также в коре и среднем отделе головного мозга. Экспериментально доказано, что большинство Рахб-позитивных клеток сохраняется и во взрослом мозге, но интенсивность нейрогенеза становится менее выраженной [3; 7]. Существуют исследования, в которых показано, что у крыс Рахб экспрессируется в пролиферирующих нейрональных клетках непосредственно перед началом нейрогенеза. Данные клетки выявлены в переднем, заднем отделах головного мозга и спинном мозге. Полученные данные подтверждают функциональную активность Рахб в нейронах животных, которые играют важную роль в пролиферации и в поддержании прогениторных клеток, нейрональной дифференцировке, в антиапоптозной функции [3; 5].

Цель исследования: изучить процессы апоптоза и нейрогенеза в нейро-глиальных популяциях спинного мозга молодых крыс после экзогенного воздействия.

Материалы и методы исследования

В нашем исследовании мы оценивали губительное влияние алкоголя и табачного дыма на нейроны спинного мозга животных. Эксперимент проводился на крысах пубертатного периода: одной группе животных (N=30) с помощью зонда внутривентрикулярно вводился алкоголь (пиво «Балтика» 8%), другой группе (N=30) создавали с помощью специальной камеры условия пассивного курения (использовались легкие сигареты фирмы Winston). В зависимости от вида воздействия животные разделены на группы по 6 крыс согласно длительности воздействия (1, 3, 6, 12 часов) – экспериментальные группы. По окончании срока воздействия производился забор и фиксация материала (спинной мозг, шейно-грудной и поясничные отделы). Гистологические препараты были приготовлены по классической гистологической методике, окрашены тионином по методу Ниссля в модификации И.В. Викторова для определения степени хроматофилии нервных клеток; для выявления и оценки процессов нейрогенеза и апоптоза использовали иммуногистохимические методы и метод TUNEL.

На гистологических микропрепаратах проводился подсчет количества клеток, вступивших в процесс апоптоза, на разных сроках воздействия. Установление апоптоза в нейронах осуществлялось в результате окрашивания в клетках разрывов в цепи ДНК методом TUNEL. Для того чтобы иметь наиболее полную картину о процессах деградации и регенерации в нейронных популяциях спинного мозга, проводили параллели между

количеством клеток, вступивших в апоптоз, и числом клеток с деструктивными изменениями, которые оценивались по степени хроматофилии их цитоплазмы [1; 3]. Хромофильное вещество – это вещество Ниссля, т.е. скопления цистерн в комплексе Гольджи с продуктами обмена клетки. Можно предположить, что деструктивные процессы идут не только в хроматине клеток, демонстрируя процесс апоптоза, но и в других структурных компонентах клетки (степень хроматофилии), приводя в общей массе к деструктивным и, возможно, необратимым процессам – к гибели клеток. В своих исследованиях мы сравнили количество клеток, вступивших в процесс апоптоза и пришедших в состояние деструкции (по степени хроматофилии – это тотально-гиперхромные, сморщенные клетки и клетки-тени) [4]. Параллельно оценивали процессы нейрогенеза, изучая синтез фактора Рахб нейрональными клетками моторных ядер спинного мозга. Фактор транскрипции Рахб (зеленые светящиеся точки) является ранним маркером нейрогенеза в нервных клетках. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0. Для выбора критерия оценки значимости различий проверяли соответствие формы нормального распределения, используя критерий χ^2 , а также равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. Общее межгрупповое различие оценивалось при помощи H-критерия Крускала-Уоллиса. В случае обнаружения различия нескольких выборок проводили множественное сравнение с использованием непараметрических вариантов критериев Даннета (для сравнения всех выборок с контрольной выборкой) и Ньюмена-Кейлса. Для сравнения двух опытных выборок (определенной популяции на определенный срок) использовали U-критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования показали, что после воздействия алкоголем клетки, вступившие в апоптоз, выявлены у животных контрольной и экспериментальных групп (табл. 1). Анализ данных позволил выявить, что количество апоптозных клеток после воздействия алкоголем значительно уменьшается на сроке 6 часов, на сроке 1 час равно нулю, на сроке 3 часа выявлены самые высокие значения. После воздействия табачным дымом наименьшее число нейронов, выступивших в апоптоз на сроке 1 час, после 12 часов воздействия они отсутствуют, наибольшее их количество наблюдалось после трехчасового воздействия экзогенного фактора (рис. 1). В экспериментальных группах, в которых наблюдалось уменьшение числа апоптозных нейронов, увеличивалось число клеток с деструктивными изменениями (тотально-гиперхромные, сморщенные клетки, клетки-тени). Нейроны, вошедшие в состояние деструкции, уже не смогут выйти из него, т.е. включается процесс некроза [6; 7].

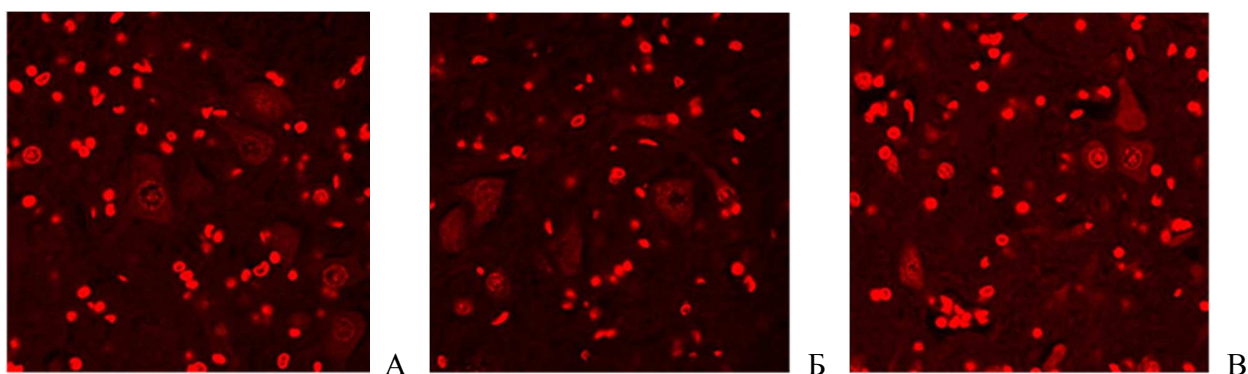


Рис. 1. Апоптоз в нейронах спинного мозга крыс: А – контрольная группа; Б – через 3 часа после воздействия алкоголем; В – через 3 часа после воздействия табачным дымом.

Как уже было выше сказано, наряду с процессами гибели клеток могут активизироваться процессы нейрогенеза, направленные на восстановление клеточного резерва тканей, что позволяет поддерживать гомеостаз [8; 9]. Для оценки процесса нейрогенеза подсчитывали количество клеток, синтезирующих транскрипционный фактор нейрогенеза Рахб. В результате оказалось, что данный процесс происходит в нервной ткани и в нормальных условиях существования организма.

Однако после воздействия алкоголем наблюдалось полное угнетение процессов нейрогенеза через 1 и 3 часа после воздействия, на сроке 6 часов его некоторая активизация и полное угнетение после 12 часов. После воздействия табачным дымом процессы нейрогенеза имеют другую характеристику. Через 1 час после воздействия они значительно активны, через 3 часа и в последующие сроки они подавлены, и не наблюдается их восстановления после 12 часов воздействия (рис. 2).

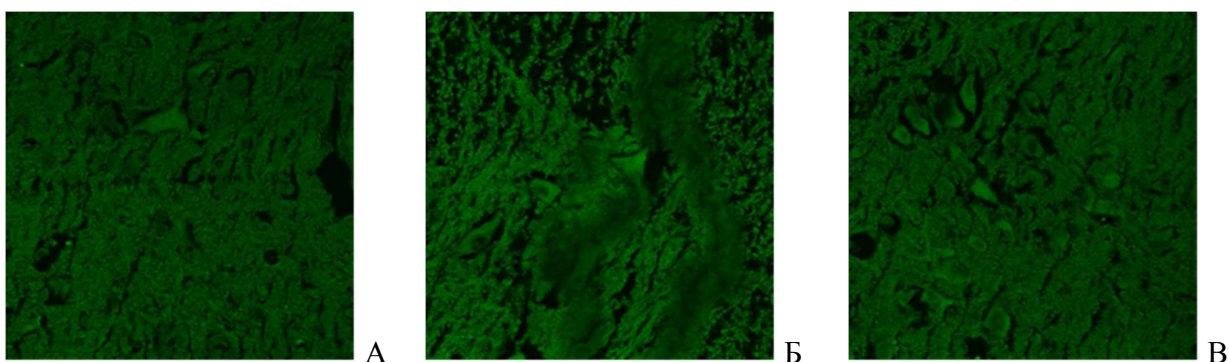


Рис. 2. Рахб-позитивные нейроны в спинном мозге крыс: А – в контрольной группе; Б – после воздействия алкоголем (6 часов); В – после воздействия табачным дымом (1 час).

Процессы апоптоза и нейрогенеза в нервных клетках моторных ядер спинного мозга после экзогенного воздействия

Сроки воздействия	Алкоголь					Табачный дым				
	Клетки в состоянии деструкции, абс. число			Клетки в состоянии апоптоза, абс. число	Рах 6-положительные клетки, абс. число	Клетки в состоянии деструкции, абс. число			Клетки в состоянии апоптоза, абс. число	Рах 6-положительные клетки, абс. число
	тотально-гиперхромные	сморщенные	клетки-тени			тотально-гиперхромные	сморщенные	клетки-тени		
контроль	0	0	0	34,5 [5,5; 44,5]	2 [0; 3]	0	0	0	34,5 [5,5; 44,5]	2 [0; 3]
1 час	0	0	0	0	0	1* [0; 3]	0	1,7* [0; 5]	10,5* [1,5; 20,5]	28,89* [5,13; 61,29]
3 часа	3,94* [0; 10]	0	0	30* [4,5; 40]	0	1,49* [0; 5]	0	0	17,5* [3; 27,5]	0
6 часов	3,78* [0; 10]	0	0	17,5* [6,5; 20]	18,03* [5,26; 51,06]	6,15* [0; 19,7]	1,2* [0; 3]	5,6* [0; 14,2]	14* [2,5; 24]	0
12 часов	5,98* [0; 15]	1,69* [0; 10]	0	26* [4; 36]	0	13,13* [11,3; 22,2]	2,35* [1,9; 6,2]	1,28* [0; 3,3]	0	0

* – наличие статистически значимых различий между контролем и экспериментальными группами по критерию Манна-Уитни (при $p < 0,05$).

Заключение

Проведя анализ полученных результатов, можно сделать вывод о том, что нейроны спинного мозга проявляют пластичность после воздействия табачным дымом на сроке 1 час и на сроке 6 часов после воздействия алкоголем, а также в контрольной группе животных. Это является очередным подтверждением включения компенсаторно-приспособительных возможностей нервных клеток спинного мозга при экзогенном воздействии. Также подтвердились уже имеющиеся данные в литературе о том, что с удлинением срока воздействия процессы запрограммированной гибели клеток и нейрогенеза угнетаются, возрастает число клеток с деструктивными признаками, что свидетельствует о присутствии некротических процессов. Проведенное исследование продемонстрировало, что табачный дым оказывает более губительное действие на спинной мозг экспериментальных животных в сравнении с действием алкоголя (легкий алкогольный напиток).

Список литературы

1. Аврущенко М.Ш. Постреанимационные изменения мозга на уровне нейрональных популяций: закономерности и механизмы / М.Ш. Аврущенко, В.В. Мороз, И.В. Острова // *Общая реаниматология*. - 2012. - № 4. - С. 69-78.
2. Восстановление функции спинного мозга: современные возможности и перспективы исследования / И.Н. Шевелев, А.В. Басков, Д.Е. Яриков [и др.] // *Вопросы нейрохирургии*. – 2010. – № 3. – С. 35-38.
3. Дробленков А.В. Дифференциальная диагностика отравления этанолом, алкогольной абстиненции и хронической алкогольной интоксикации по изменениям нейронов и макроглиоцитов коры головного мозга // *Судебно-медицинская экспертиза*. - 2010. - № 4. - С. 28-32.
4. Живолупов С.А. Современная концепция нейропластичности (теоретические аспекты и практическая значимость) / С.А. Живолупов, И.Н. Самарцев, Ф.А. Сыроежкин // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. - 2013. - № 10. - С. 102-108.
5. Малиновская Н.А. [и др.] Нейрон-астроглиальные взаимодействия в клетках среднего мозга при экспериментальной болезни Паркинсона // *Сибирское медицинское обозрение*. - 2014. - № 6. - С. 5-10.

6. Glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting genetically modified human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote recovery in a rat model of Parkinson's disease / A. Glavaski-Joksimovic, T. Virag, T.A. Mangatu [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2010. – Vol. 88, № 12. – P. 2669—2681.
7. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicol. Pathology.* - 2007. - Vol. 35, № 4. - P. 495-516.
8. Impaired neurogenesis in embryonic spinal cord of Phgdh knockout mice, a serine deficiency disorder model / Y. Kawakami, K. Yoshida, J. H. Yang [et al.] // *Neurosci. Res.* – 2009. – Vol. 63, № 3. – P. 184-193.
9. Neurogenesis in the lamprey central nervous system following spinal cord transection / G. Zhang, I. Vidal Pizarro, G.P. Swain [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 2014. – Vol. 522, № 6. – P. 1316-1332.

Рецензенты:

Мучкина Е.Я., д.б.н., проф. кафедры экологии и природопользования ИЭУиП ФГАОУ ВПО «СФУ», г. Красноярск;

Зайцева О.И., д.м.н., проф., старший научный сотрудник лаборатории этногенетических и метаболических проблем нормы и патологии, Институт медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск.