

ВАРЕНЦОВ ВЯЧЕСЛАВ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ОСОБЕННОСТИ АКТИВИЗАЦИИ НЕЙРОГЕНЕЗА В ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЛУКОВИЦАХ
КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ
(экспериментально-морфологическое исследование)**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология
(медицинские науки)

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Румянцева Татьяна Анатольевна

Официальные оппоненты:

Павлов Артём Владимирович - доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, кафедра анатомии, заведующий кафедрой;

Воронков Дмитрий Николаевич - кандидат медицинских наук, ФГБНУ «Научный центр неврологии», лаборатория нейроморфологии, старший научный сотрудник отдела исследований мозга.

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «19» октября 2020 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по адресу 119991, г. Москва, ул. Трубецкая д.8, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по адресу 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2020 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук, доцент

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время отмечается высокий интерес к вопросам о репаративных возможностях нервной системы. Открытие нейрогенеза в постнатальном периоде развития, в том числе и у взрослых, ставит перед исследователями задачу по управлению этим процессом: разработки методов его активизации, прогнозирования последствий стимуляции и угнетения, оценки эффективности интеграции вновь образованных клеток в нейрональную сеть. Появляются данные о разных путях миграции прогениторных клеток, формировании в ответ на повреждения новых «стволовых ниш» [Osman A.M. et al., 2011; Benner et al., 2013; Picard-Riera et. al., 2002; Gould, 2007]. Эти многочисленные данные открывают возможности для новых подходов к терапии заболеваний ЦНС [Ярыгин К.Н., Ярыгин В.Н., 2012; Гомазков О.А., 2014]. Вместе с тем, многие авторы отмечают, что активность пролиферации в стволовых нишах с возрастом резко снижается, сравнивая только новорожденных и зрелых животных [Smith K., Semënov M.V., 2018; Jason S. Snyder, Michael R. Drew, 2020]. Данные о возрастных особенностях клеточного состава стволовых ниш на протяжении первого полугодия жизни крыс отрывочны и трудно сопоставимы. Вопрос о пластичности нейрогенеза, отзывчивости его фаз на воздействия в раннем возрасте также не изучены. Отсутствуют однозначные критерии для оценки активности нейрогенеза. Обонятельная луковица, традиционно относящаяся к периферической части обонятельного мозга, в тоже время является стволовой нишей, в котором можно оценивать напрямую или косвенно все фазы нейрогенеза. Она выступает в качестве «диагностического окна» этого сложного процесса. Именно это и определяет актуальность данного исследования и выбор объекта.

Степень разработанности темы исследования

Активные исследования процесса эндогенного нейрогенеза происходят на протяжении последних 20-25 лет. В результате накоплены значительные данные о том, что вновь сформированные нейроны участвуют в реализации различных физиологических и патологических процессов. Новые нейроны включаются в организацию процессов обучения и памяти, когнитивных функций. Отмечена реакция клеточного состава ниш при ишемии, травме, психических расстройствах. Появление многочисленных маркеров позволило разделить преобразования стволовых клеток на стадии экспрессии стволовых предшественников (прогениторов), их пролиферации, апоптической селекции, трансформации в клетки специфического фенотипа (дифференцировки), интеграции в нейрональную сеть, а также выявить «критические периоды», определяющие возможности их выживания [Yamaguchi M., Mori K., 2014]. Сформулирована концепция «репрограммирования» стволовых

клеток при эндогенном нейрогенезе в функционально необходимом направлении в зависимости от взаимодействия целого множества сигнальных молекул [Gage F.H., Temple S., 2013]. Таким образом, накопление морфологических, физиологических, патоморфологических данных о течении нейрогенеза привело к появлению множества направлений его экспериментального изучения. В тоже время, реакция «детских» стволовых ниш осталась вне внимания исследователей.

Цель исследования

Изучить особенности активизации нейрогенеза в обонятельных луковицах крыс при экспериментальных воздействиях в раннем возрасте.

Задачи исследования

1. Изучить особенности распределения маркёров Ki-67, нестина, даблкортина и n-NOS в обонятельных луковицах крыс в различные сроки онтогенеза крысы.
2. Определить влияние нейропептида TKPRPGP (Семакс) на экспрессию маркеров Ki-67, нестина, даблкортина и n-NOS в обонятельных луковицах крыс разного возраста.
3. Определить влияние неонатального введения капсаицина на экспрессию маркеров нейрогенеза в обонятельных луковицах крыс.
4. Изучить особенности динамики экспрессии маркеров нейрогенеза в обонятельных луковицах крыс при моделировании нейростимуляции и нейродегенерации.

Научная новизна

В результате исследования получены нормативные данные фазного изменения толщины слоев обонятельной луковицы, гетерохрония их формирования и раннее начало их истончения, от 30 до 90 суток, сопровождающееся снижением активности пролиферации к периоду полового созревания.

Впервые описана возрастная гистотопографическая картина распределения маркёров пролиферации (Ki-67), нейрогенеза (нестина и даблкортина), и экспрессия n-NOS в различных слоях обонятельных луковиц крыс с неонатального периода до зрелого возраста (180 суток). Изучены особенности экспрессии и гистотопографии вышеперечисленных маркеров в фазу перехода антеннатального (A22) в ранний неонатальный (1 сутки жизни) периоды. Отмечено резкое снижение интенсивности пролиферации во внутренних слоях (гранулярный в 2,8 раза, субэпендимальный – в 2,5 раза) луковицы сразу после рождения (A22 – новорожденные), вероятно, обусловленное перинатальным стрессом, процессами адаптации к внеутробным условиям существования, резким расширением спектра и интенсивности сенсорных стимулов.

Впервые получены морфологические подтверждения положительного влияния нейропептида TKPRPGP на активность нейрогенеза в обонятельной луковице. Доказано, что

стимуляция в неонатальном возрасте вызывает максимальный эффект, введение в инфантильном возрасте только поддерживает уровень экспрессии маркеров нейрогенеза. Стимуляция в зрелом возрасте не приводит к реэкспрессии маркеров нейрогенеза и повышению плотности пролиферирующих клеток в слоях обонятельной луковицы.

Впервые показано, что неонатальное введение капсаицина, вызывающее гибель части нейронов в разных отделах центральной и периферической нервной системы, в тоже время приводит к развитию компенсаторного процесса, проявляющегося длительным повышением экспрессии Ki-67 и даблкортина, менее выраженной пролонгацией экспрессии нестина, особенно выраженное в центральной зоне луковицы.

Впервые установлено, что реакция на стимуляцию и на введение капсаицина характерна только для субпопуляции n-NOS⁺ нейронов гранулярного слоя. Стимуляция сопровождается повышением численной плотности этой субпопуляции, а введение нейротоксина – ее снижением.

Научно-практическая и теоретическая значимость

Полученные данные дополняют сведения по активности нейрогенеза в обонятельных луковицах мозга крысы на протяжении первого полугодия жизни. Оценка распределения позитивных клеток по слоям луковицы при переходе к внеутробному периоду, стимуляции и введении нейротоксина, не только подтвердила радиальное направление миграции прогениторных клеток, но и позволила выявить волнообразность этого процесса. Результаты работы расширяют немногочисленные данные о возрастных особенностях и возможностях активизации нейрогенеза у крыс раннего возраста.

Использованный набор маркеров и выбранный объект исследования могут быть рекомендованы для комплексной оценки влияния различных веществ на нейрогенез в детском и зрелом организме, что позволяет оценивать и прогнозировать реакцию остальных стволовых ниш и направление компенсаторного процесса в целом.

Результаты могут составить основу для дальнейшей разработки и клинического применения новых методов стимуляции нейрогенеза, что дает возможность использовать эти данные в практике неврологов, нейроморфологов. Внедрение полученных результатов и выводов в учебный процесс в ВУЗах позволит расширить представления студентов и врачей о репаративных возможностях нервной системы.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на 377 белых крысах самцах линии Wistar разного возраста, разделенных на контрольную и экспериментальные группы. Объектом морфологического исследования служили правые обонятельные луковицы головного мозга крыс. В

экспериментальную группу входило две модели: нейростимуляция (интраназальное введение нейропептида TKPRPGP), нейродегенерация (системное введение высокой дозы капсаицина 100 мг/кг). В работе были использованы гистологические методы исследования (окраски методом Ниссля), иммуногистохимические методы исследования (использование маркёров нейрогенеза: Ki-67, DCX, Nestin, n-NOS). Созданная база цифровых изображений проанализирована и статистически обработана на кафедре анатомии человека ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России.

Исследование одобрено Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России (протокол №20 от 14.12.2017 г.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия маркеров, отражающих разные стадии нейрогенеза, в обонятельной луковице имеет возрастные и гистотопографические особенности.
2. Введение нейропептида TKPRPGP и нейротоксина капсаицин крысам в раннем возрасте вызывает активизацию и пролонгацию экспрессии маркёров нейрогенеза в обонятельной луковице.
3. Изменения экспрессии маркеров нейрогенеза при экспериментальных воздействиях имеют топографические особенности - максимальный и самый ранний эффект наблюдается в центре луковицы, затем распространяется радиально в наружные слои, проявляясь в последнюю очередь в гломерулярном слое.

Достоверность результатов и апробация работы

Достоверность полученных результатов основывается на использовании достаточного объема экспериментального материала, методах исследования, адекватных для поставленных задач статистических методов обработки информации.

Основные результаты диссертационного исследования докладывались и обсуждались на Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2015); Всероссийской научно - практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвящённой 70-летию победы в Великой Отечественной войне (Ярославль, 2015); 70-ой Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2016); II Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы нейробиологии. Структура и функции нервной системы в норме и патологии» (Ярославль, 2016); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием посвящённой 120-летней годовщине со дня рождения профессора Б.М. Соколова (Рязань, 2016); на XIII

Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Петрозаводск, 2016); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием посвящённой юбилею президента университета, профессора, академика РАН Ю.В. Новикова «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2017); Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты морфогенеза человека» (Оренбург, 2017); Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (Рязань, 2017); III международной научной конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, проф. Шилкина В.В. «Современные проблемы нейробиологии» (Ярославль, 2018); на XIV Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Астрахань, 2018); на VIII съезде научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019).

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры анатомии человека, гистологии, цитологии и эмбриологии, нервных болезней с медицинской генетикой и нейрохирургией, нормальной физиологии с биофизикой ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автором лично были выполнены: экспериментальная часть исследования, морфологические и морфометрические исследования, статистическая обработка полученных данных и анализ результатов, написание текста диссертации. Автор принимал непосредственное участие в написании статей и тезисов и их подготовке к публикации в научных изданиях, участвовал в качестве докладчика на конференциях разного уровня.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология, а именно областей науки, занимающихся исследованием происхождения, строения, развития, функционирования клеток и тканей, их взаимодействия в процессе жизнедеятельности организма как в норме, так и при различных патологических нарушениях.

Публикации по теме работы

По теме диссертации опубликовано 27 научных работ, из них 6 оригинальных статей в журналах, включенных в перечень Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 1 статья в библиографической базе SCOPUS, а также 1 патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 30 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, пяти глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 227 источников, в том числе 48 отечественных и 179 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор литературы, в котором рассматриваются возрастные особенности гистологии обонятельных луковиц крыс. Анализируются современные данные постнатального нейрогенеза и существующих стволовых ниш. Приводится описание современных маркёров нейрогенеза и особенности их экспрессии при различных негативных и стимулирующих воздействиях.

В главе 2 представлено описание материалов и методов исследования активизации нейрогенеза в обонятельных луковицах крыс при экспериментальных воздействиях. Дизайн исследования был одобрен Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России (протокол №20 от 14.12.2017 г.).

Экспериментальная часть работы выполнена на 377 лабораторных крысах – половозрелых самцах линии Wistar. Объектами исследования служили правые обонятельные луковицы головного мозга крыс разного возраста.

Моделирование нейростимуляции осуществляли путём закапывания интраназально в каждую ноздрю 1% раствора нейропептида ТКPRPGP (Семакс®, Пептоген, Россия), 1 раз в сутки, в установленное время, в дозировке 50 мкг/кг массы животного. Наблюдение за эффектами Семакса продолжалось до 180 суток, для этого животных разделили на 3 группы с двухнедельными курсами введения: первой группе вводили нейропептид с рождения до 14 суток, второй группе с рождения до 14 суток и с 21 до 35 суток и третьей группе с рождения до 14 суток, с 21 до 35 суток и с 61 до 74 суток и в последующие сроки, соответствующие контрольной группе. Забор материала осуществляли в промежутки между курсовыми введениями на 14, 21, 35, 60, 75, 90 и 180 сутки жизни.

Экспериментальную группу (модель нейростимуляции) составили 105 белых крыс. Для контроля использовали данные интактных крыс, т.к. показатели группы ложностимулированных животных (интраназально вводили 0,9% NaCl) достоверно не отличались.

Моделирование нейротоксического воздействия проводили путем однократного подкожного введения новорожденным крысятам на 1 сутки жизни 10% раствора капсаицина

(N-vanillylonanamide, Sigma) в смеси, состоящей из 1 части спирта, 1 части Твин-100, 8 частей физиологического раствора, в дозе 100 мг/кг [Santicioli P. с соавт., 1992]. Экспериментальную группу (модель нейродегенерации) составили 120 белых крыс, которые исследовались через 1 неделю после введения и в сроки аналогичные интактной группе животных до 180 суток.

Животных опытных и контрольных групп выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. и Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986).

При заборе материала, изготовлении и окраске срезов соблюдались условия, стандартные для всех объектов. Использовались нейрогистологический (окраска по Нисслю), иммуногистохимические, морфометрические и статистические методы. Иммуногистохимическое исследование выполнено на парафиновых парасагиттальных срезах мозга толщиной 7 мкм методом непрямого мечения. Использовали первичные моноклональные антитела anti-Ki-67 ab16667 (UK, разведение 1:100), anti-n-NOS ab76067 (UK, разведение 1:200), первичные поликлональные антитела anti-DCX ab18723 (UK, разведение 1:500), anti-Nestin ab93157 (UK, разведение 1:100), и вторичные поликлональные антитела (Goat anti Rabbit IgG ab97051, UK, разведение 1:1000). Для выявления в нейронах следующих специфических белков:

1. Даблкортина (DCX), маркёра, ассоциированного с микротрубочками, экспрессируемого исключительно незрелыми нейронами.
2. Нестина (Nestin) белок промежуточного филамента типа VI, маркёра нейростеволовых клеток (НСК).
3. Ki-67 маркёр пролиферации нейронов, отсутствует в G₀ периоде интерфазы митоза (маркер, ассоциированный с транскрипцией р-РНК).
4. Нейрональной NO-синтазы (n-NOS), маркёра нитроксидэргических зрелых нейронов.

Микроскопию проводили при помощи светового микроскопа Optica DM-20 (Italy 2016) со встроенной камерой.

По микрофотографиям с помощью программы ImageJ- Fiji (NIH) 1.51h оценивали: численную плотность позитивных нейронов (шт/мм²), относительную плотность иммунопозитивных структур, площадь сечения нейронов в каждом слое обонятельной луковицы. Статистическую обработку данных проводили методами вариационной статистики с использованием пакетов Microsoft Excel 2010 и Statistica 8 (Statsoft). Вариационные ряды

соответствовали близкому к нормальному распределению (критерий Колмогорова-Смирнова), что позволило для проверки статистических гипотез использовать параметрические методы (t-критерий Стьюдента). Достоверным считали различие сравниваемых показателей при $p < 0,05$.

В главе 3 представлены результаты собственных исследований.

В результате проведенного исследования установлены возрастные нормативы толщины слоев ОЛ белой крысы на срединном сагиттальном срезе от рождения до шестимесячного возраста. После рождения морфогенез слоев продолжается: появляются четкие границы между слоями, они приобретают структуру, характерную для дефинитивного состояния.

Особенно выраженные преобразования отмечаются в течение первого месяца жизни. Так, в гломерулярном слое увеличивается количество клубочков, они оформляются капсулой, появляется значительное количество перигломерулярных нейронов. Изменения в гранулярном слое сопровождаются появлением зон разрежения между группами тел гранулярных нейронов. В митральном слое отмечается перераспределение митральных нейронов из многослойного расположения в однослойное.

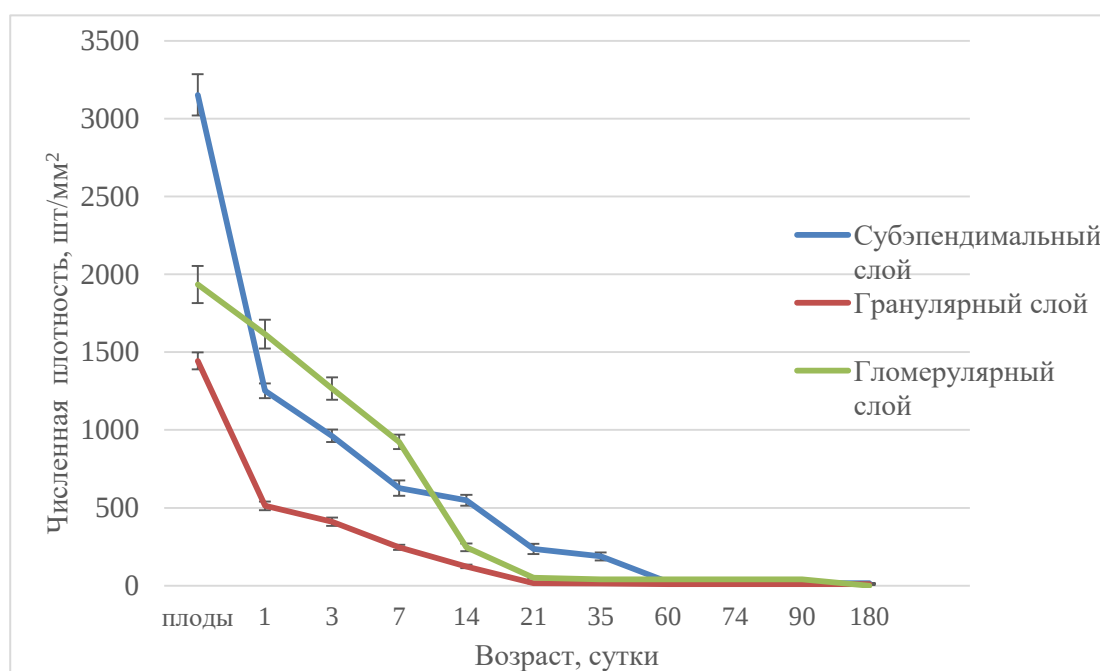


Рисунок 1. Численная плотность Ki-67 позитивных клеток в слоях ОЛ у крыс контрольной группы

Установлено, что толщина слоев ОЛ, оцененная на протяжении от 1-х до 180 суток жизни крысы, изменяется фазно: в течение первого месяца жизни наблюдается резкое утолщение всех слоев и закрытие зародышевого желудочка в центре обонятельной луковицы. Второй месяц жизни характеризуется резким замедлением темпов роста ОЛ, стабилизацией толщины большинства слоев. В последующем (с 60 суток) наблюдается фаза истончения слоев, достигающего на 90 сутки достоверных различий.

Использованные маркеры позволили оценить активность нейрогенеза в обонятельной луковице с разных позиций: экспрессия Ki-67 отражает общую пролиферативную активность, экспрессия нестина - начальные стадии дифференцировки прогениторных клеток, DCX является маркером клеток, выбравших путь нейрональной дифференцировки и, наконец, p-NOS-активность отражает возрастные особенности высокоспециализированной субпопуляции нейронов.

Экспрессия Ki-67 в обонятельной луковице имеет выраженные топографические различия, зависит не только от возраста, но и от слоя. В первую очередь стоит отметить, что значимая пролиферация отмечается в ОЛ на протяжении первых двух недель постнатального развития. Причем, при количественной оценке отмечается выраженный радиальный градиент, который проявляется максимальной плотностью пролиферирующих клеток в источнике – центре луковицы и в гломерулярном слое – месте интеграции клеток. После 14 суток с падением активности пролиферации в субэпендимальном слое, снижается до единичных клеток и позитивность в юктагломерулярных клетках.

Плотность Ki-67+ ядер в субэпендимальном слое в плодном и неонатальном периоде многократно превосходит плотность в других слоях, что связано с особенностями его развития как аналога субвентрикулярной зоны, интенсивно функционирующей стволовой ниши. Уже в подсосном возрасте желудочек внутри луковицы не определяется, и центр луковицы становится окончанием рострального потока (рис.5 А,В). Именно в этой зоне на протяжении инфантильного и ювенильного возраста выявляется значимое количество пролиферирующих прогениторных клеток, в зрелом возрасте уровень пролиферации также, как в периферических слоях, падает до единичных клеток (рис. 1). Резкое снижение интенсивности пролиферации во внутренних слоях (гранулярный в 2,8 раза, субэпендимальный – в 2,5 раза) ОЛ сразу после рождения (P22 – новорожденные), вероятно, обусловлено перинатальным стрессом, процессами адаптации к внеутробным условиям существования, слишком резким расширением спектра и интенсивности сенсорных стимулов.

Такое многократное снижение плотности пролиферирующих клеток в течение 24-30 часов внутри луковицы при смене периодов развития отражает высокую чувствительность этой прогениторной зоны. Возникает вопрос, а происходит ли в этот момент активизация дифференцировки прогениторов? Рассмотрим динамику экспрессии нестина.

Экспрессия нестина в клетках ОЛ отмечается в пренатальном и раннем постнатальном периодах до 14 суток. Позитивностью обладают прогениторные клетки, находящиеся на ранних этапах дифференцировки. Изменения распределения позитивных клеток по слоям имеют волнообразный характер, отражая радиальную миграцию прогениторов. В начальные сроки – максимальная плотность нестина отмечается в центре ОЛ (рис. 6 В), а на 7 сутки – в гломерулярном (рис. 6 А), с последующим угасанием экспрессии до нуля (рис. 2).

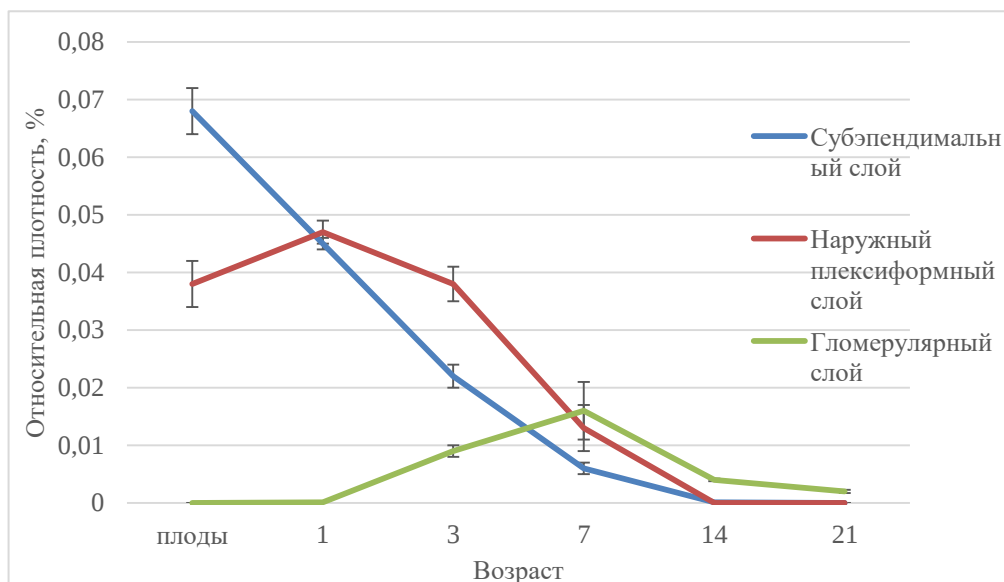


Рисунок 2. Относительная плотность нестин-позитивных структур в ОЛ крыс контрольной группы

При сравнении плотности нестин-позитивных структур с позиций влияния перехода к внеутробному существованию удастся выявить двунаправленный процесс. Во-первых, отмечается падение плотности прогениторов в начальных фазах в зоне активной пролиферации – субэпендимальном слое. Но, во-вторых, увеличение экспрессии нестина уже в первые сутки у крысят в средней зоне ОЛ (митральный, плексиформный слои) отражают стимулирующий эффект рождения на дифференцировку клеток, что подтверждается и появлением нестина в структурах периферической зоны ОЛ – гломерулярном слое, нарастающее до 7 суток.

Дальнейшая судьба прогениторных клеток, происходящих из субэпендимальной зоны луковицы и роstralного миграционного потока, проясняется при исследовании экспрессии даблкортина, как маркера нейрональных предшественников.

Динамика экспрессии DCX показывает, что первые две недели постнатальной жизни крыс сопровождаются резким возрастанием относительной плотности позитивных клеток во всех слоях, что отражает усиленную миграцию нейрональных прогениторов из центра на периферию ОЛ. (рис. 3). Высокий уровень экспрессии даблкортина в гломерулярном слое отражает значимый уровень интеграции постнатально образующихся нейронов в

нейрональную сеть ОЛ (рис. 7 А, В). Сроком активного развития клеточного состава ОЛ можно считать период до полового созревания. Несмотря на закрытие полости зародышевого желудочка, позитивные клетки встречаются в центральных слоях ОЛ и после 60 суток. Их источником является ростральный миграционный поток.

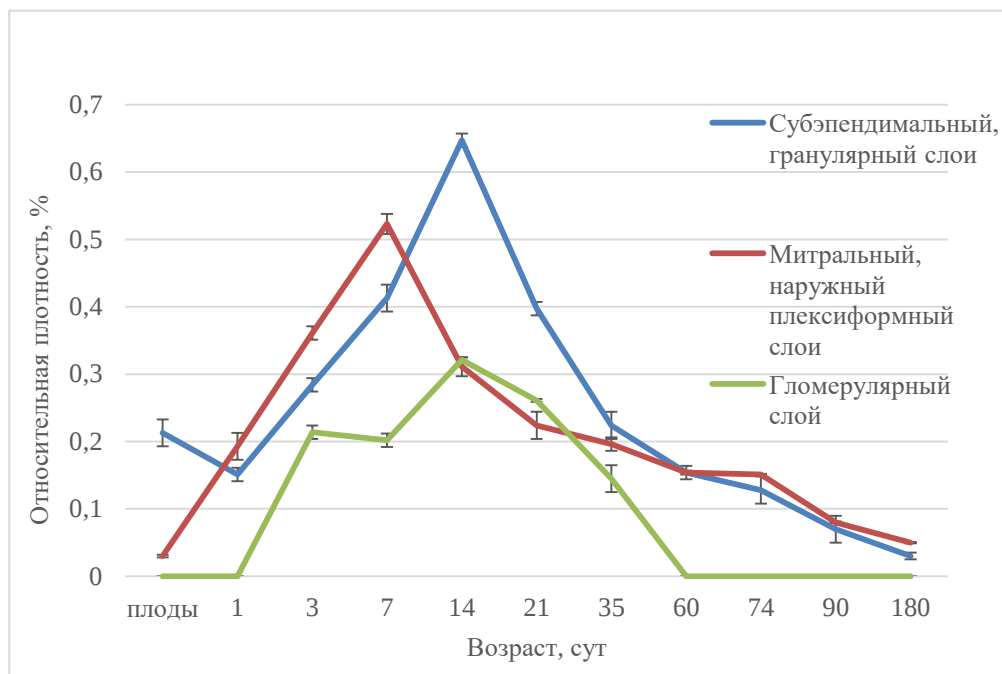


Рисунок 3. Относительная плотность DCX-позитивных структур в ОЛ крыс контрольной группы

Оценка экспрессии p-NOS выявила морфологическую разнородность позитивных нейронов (рис. 8 А, В). Описанные субпопуляции имеют разную динамику возрастных преобразований. Стабильной позитивностью обладают короткоаксонные нейроны, плотность которых возрастает с нулевого значения до максимального в течение 21 суток жизни и в дальнейшем не изменяется. Сходная динамика отмечается для перигломерулярных позитивных нейронов, которые обнаруживаются с 7 суток жизни, плотность их возрастает к 35 суткам до максимума и стабилизируется. Особая динамика отмечается в гранулярном слое. Уже у плодов в этом слое наблюдаются p-NOS⁺ клетки. Их численная плотность в течение двух недель многократно (в 3,9 раза) возрастает до максимума, затем постепенно снижается к 35 суткам в 2,1 раза и стабилизируется. Такие различия динамики субпопуляций, по-видимому, обусловлены полифункциональностью p-NOS.

Полученные нормативные характеристики экспрессии изученных маркеров активности пролиферации и нейрогенеза мы использовали для оценки экспериментального материала.

Данные первой экспериментальной группы, в которой животные получали Семакс по курсовой схеме, рекомендованной производителем, выявили, что выбранная химическая стимуляция вызывает резкое увеличение плотности пролиферирующих Ki-67 позитивных

клеток при введении крысам подсосного возраста. Отмеченный эффект не отменяет характерную возрастную динамику снижения показателя, но при прекращении введения сохраняется на достигнутом уровне длительно. Повторные введения Семакса позволяют замедлить снижение активности пролиферации. Наиболее выражен этот эффект при введении в подсосном возрасте, менее выражен в инфантильном. Повторный курс в зрелом возрасте поддерживает эффекты предыдущих введений, при том, что в этом возрасте в контроле пролиферирующие клетки единичны. При прекращении введения в этом возрасте показатель резко падает.

Градиент относительной плотности распределения позитивных клеток по слоям неизменно сохраняется. Максимальная плотность регистрируется в субэпендимальном слое, меньшая в гранулярном и минимальная – в гломерулярном.

Изолированная оценка процесса ранней дифференцировки прогениторов по плотности нестин – позитивных структур показала, что стимуляция с рождения до 14 суток сохраняет уровень экспрессии нестина, препятствуя его снижению. Низкодифференцированные прогениторы массово устремляются из центральной зоны на периферию, не успевая утратить нестин-позитивность, что регистрируется многократным превышением показателя в гломерулярном слое по сравнению с контролем. При сопоставлении экспрессии нестина с показателем экспрессии Ki-67 можно утверждать, что стимуляция не только повышает уровень пролиферативной активности, но и ускоряет радиальное продвижение незрелых клеток, поэтому мы и отмечали многократное увеличение относительной плотности по обоим маркерам. При прекращении введения Семакса в течение недели экспрессия нестина резко снижается, начиная с центральных зон луковицы, а через три недели уже не регистрируется.

Т.е., стимуляция препятствует возрастному снижению экспрессии в центральных слоях, где находятся нейропрогениторы ОЛ, но лишь при высоком возрастном уровне экспрессии, который характерен только для подсосного возраста.

Стимуляция в инфантильном и молодом возрастах не влияет на появление незрелых нестин-положительных прогениторов в обонятельных луковицах. Реэкспрессия нестина в ОЛ не отмечалась.

Динамика плотности DCX+ клеток при курсовом введении Семакса в целом соответствует динамике экспрессии Ki-67. Отмечено повышение плотности прогениторов нейронального направления, но степень выраженности эффекта коррелировала с возрастом стимуляции: чем моложе крыса, тем более значимые изменения экспрессии DCX отмечались. Каждый курс введения стимулятора вызывал повышение плотности маркера, но степень эффективности с возрастом снижалась, и длительность эффекта сокращалась. Также

отмечался и радиальный градиент экспрессии маркера: наиболее выраженные изменения отмечались в центральной зоне ОЛ, наименее значимые в гломерулярном слое. Подъем DCX иммунореактивности субэпендимального и гранулярного слоёв, вероятно, обусловлен активацией пула нейропрогениторных клеток, в гломерулярном слое – интеграцией новых клеток в нейрональную сеть ОЛ (рис. 4).

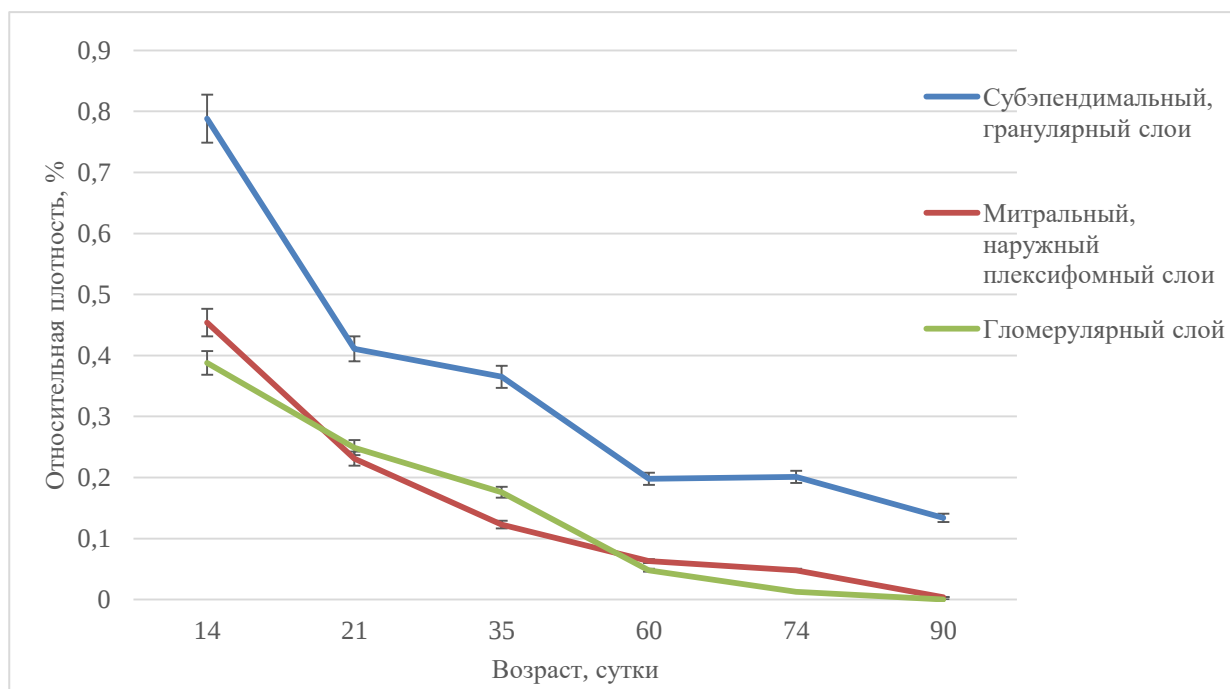


Рисунок 4. Относительная плотность DCX – позитивных структур в слоях ОЛ крыс после введения нейропептида

Оценка n-NOS – позитивных высокоспециализированных клеток, показывает, что нейростимуляция негативно влияет на продукцию NO в обонятельных луковицах. Максимальные изменения отмечаются в субпопуляции КАН, их количество снижается вдвое, особенно на первом месяце наблюдения. Субпопуляция позитивных клеток гранулярного слоя также уменьшается после введения Семакса на 14 и 35 сутки эксперимента в 1,4 и в 1,2 раза соответственно. Отдалённый эффект нейростимуляции проявляется снижением численной плотности позитивных клеток гранулярного слоя до конца срока эксперимента.

При постановке эксперимента, мы уже через неделю отмечали повышение относительной плотности Ki-67+ клеток, что отражает активизацию пролиферации в ОЛ.

Выраженность активизации имеет топологические особенности - максимальный и самый ранний эффект наблюдается в центре луковицы, затем распространяется на периферию в наружные слои. Скорость развития реакции доказывает, что в начале наблюдения основным источником пролиферирующих клеток является герминативная зона зародышевого желудочка ОЛ, а в последующие сроки мигрирующие предшественники рострального потока. Пролиферирующие Ki-67+ клетки начинают постепенную радиальную миграцию, заполняя

слои ОЛ в течение месяца после воздействия. Пролонгация пролиферативной активности отмечена до 90 суток жизни крыс.

Экспрессия нестина при системном неонатальном введении капсаицина также значимо пролонгируется – до 21 суток, что нехарактерно для контроля. Нестин-позитивные клетки - дифференцирующиеся в нейрональном направлении прогениторы – в норме на 21 сутки сохраняются только на периферии ОЛ, а при нейротоксическом воздействии встречались и в других слоях, но плотность их была минимальна.

Оценка DCX позитивных структур показала, что через неделю после введения капсаицина, относительная плотность DCX+ нейробластов субэпендимального и гранулярного слоев возрастает по сравнению с показателями интактных новорожденных. Этот эффект сохраняется и на 14 сутки, но к 21 суткам после введения экспрессия даблкортина снижается, соответствуя сроку 14 суточных животных контрольной группы. В последующие сроки наблюдения с 35 до 90 суток в экспериментальной группе плотность позитивных структур субэпендимального и гранулярного слоев постепенно уменьшается, при этом показатель превышает контроль. В целом, относительная плотность иммунопозитивных тел и отростков субэпендимального и гранулярного слоев сохраняет характерную возрастную динамику, но превосходит контроль в течение всего наблюдения.

Таким образом, введение токсической дозы капсаицина в первый день жизни, приводящее гибели зрелых нейронов разных локализаций, вызывает развитие компенсаторной реакции, проявляющейся усилением продукции прогениторных клеток в субгранулярной и паравентрикулярной зонах головного мозга животного. В результате уже через неделю после воздействия резко повышается миграция клеток по ростральному потоку, что доказывается высокой экспрессией даблкортина в структурах центральных слоев ОЛ с последующим распространением позитивных прогениторов на периферию.

Введение капсаицина вызывает повышение экспрессии n-NOS в клетках гранулярного слоя до 35 суток наблюдения, затем показатель восстанавливается на контрольный уровень и стабилизируется.

Таким образом, диффузная гибель части нейронов, вызываемая введением капсаицина в неонатальном периоде, и хроническое течение нейродегенеративного процесса, приводит к развитию компенсаторного процесса, проявляющегося длительной активизацией канонических стволовых ниш и герминативной зоны ОЛ.

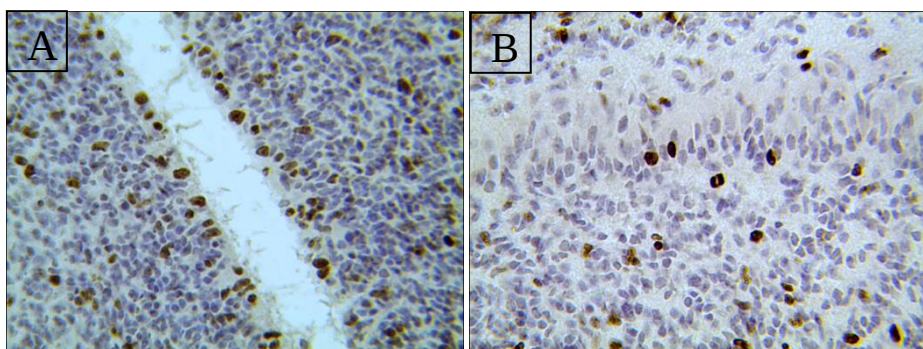


Рисунок 5. Распределение Ki-67 в ОЛ у плодов крыс.

А – Ki-67+ ядра в субэпендимальном слое (полость зародышевого желудочка), В – Ki-67+ ядра в митральном, наружном плексиформном и гранулярном слоях.

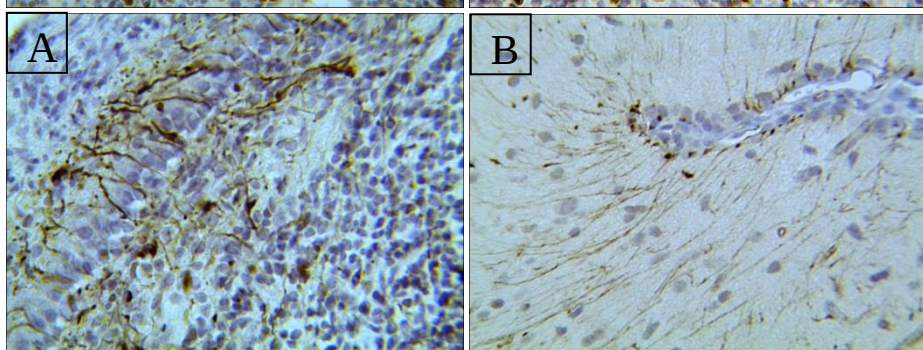


Рисунок 6. Распределение Nes+ структур в ОЛ крыс.

А – экспрессия нестина в наружном и внутреннем плексиформном слоях (1 сут); В – эмбриональный желудочек (7 сут).

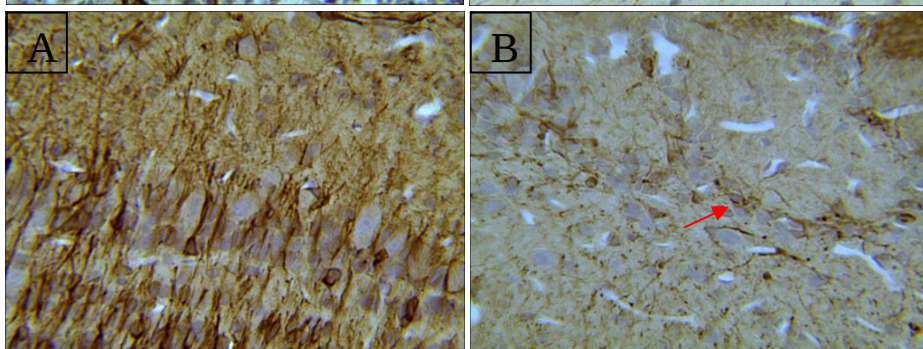


Рисунок 7. Распределение DCX+ структур в ОЛ контрольных крыс.

А – DCX+ клетки митрального и их отростки нар. плексиформного слоя; В – перигломерулярные клетки одноименного слоя (красная стрелка) (14 суток).

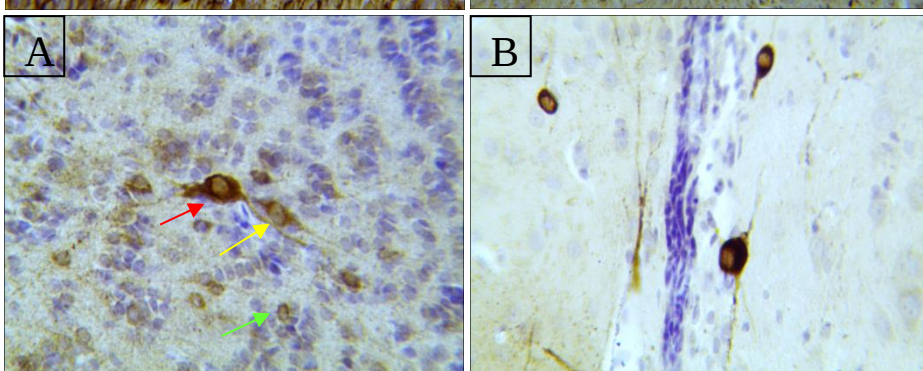


Рисунок 8. Разнообразие субпопуляции p-NOS + нейронов ОЛ.

А – гранулярный слой; В – p-NOS+ КАН в месте окончания РМП в субэпендимальном слое. (красная стрелка нейроны с высокой экспрессией фермента, жёлтая стрелка со средней, зелёная с низкой), 35 суток.

ИГХ, антитела к Ki-67, Nestin, DCX, p-NOS. Докраска гематоксилином Майера. Об.40, ок.10.

ВЫВОДЫ

1. Постнатальный онтогенез обонятельной луковицы у крыс линии Вистар сопровождается фазными изменениями толщины слоев: в течение первого месяца наблюдается резкое утолщение всех слоев и закрытие желудочка в центре обонятельной луковицы. Второй месяц жизни характеризуется резким замедлением темпов роста обонятельной луковицы, стабилизацией толщины большинства слоев. В последующем (с 60 суток) наблюдается фаза истончения слоев, достигающего на 90 сутки достоверных различий. Эти изменения коррелируют со снижением активности нейрогенеза.
2. Экспрессия Ki-67 и нестина в клетках обонятельной луковицы максимальна в плодном периоде (A22), постепенно снижается на протяжении двух недель постнатальной жизни во всех слоях, за исключением центральной зоны луковицы, демонстрируя радиальный градиент.
3. Экспрессия DCX в структурах обонятельной луковицы при рождении минимальна, затем нарастает, достигая максимума в митральном на 7-е, а в гранулярном слое – на 14-е сутки жизни. У крыс 2-х месячного возраста плотность DCX+ структур снижается, но по-прежнему превышает показатели новорожденных. Снижение активности нейрогенеза, оцененное по DCX иммунопозитивности, в обонятельной луковице у крыс происходит только к периоду полового созревания.
4. У плодов (A22) n-NOS позитивные нейроны определяются только в гранулярном слое, с 7 суточного возраста позитивные клетки разделяются на три субпопуляции: короткоаксонные, гранулярные и перигломерулярные нейроны. Каждая субпопуляция обладает собственной возрастной динамикой размеров нейронов и активности фермента.
5. Введение нейропептида TKPRPGP приводит к усилению и длительному сохранению пролиферативной активности в обонятельной луковице у крыс. Степень изменения плотности пролиферирующих клеток в обонятельной луковице зависит от возраста воздействия: максимальная экспрессия Ki-67 наблюдается при стимуляции с рождения до 14 суток. Повторная стимуляция не вызывает возрастания пролиферации, но позволяет сохранить высокий уровень показателя экспрессии Ki-67. При отмене препарата численная плотность позитивных клеток в течение двух недель снижается до нуля.
6. Курсовое введение нейропептида TKPRPGP крысам в раннем возрасте пролонгирует экспрессию нестина - маркера ранних стадий дифференцировки и DCX - маркера

дифференцировки прогениторов по нейрональному пути, в обонятельных луковицах крыс до 21-35 суток и до 74 суток наблюдения, соответственно. Введение нейропептида в зрелом возрасте не приводит к реэкспрессии данных маркеров.

7. В ответ на неонатальное введение капсаицина пролиферативная реакция отмечается уже в течение первой недели и пролонгируется до 75 суток, в контроле до 21 суток. Повышение численной плотности Ki-67+ клеток достигает двух и более раз, особенно выражено в центральных слоях обонятельной луковицы.
8. Гибель части нейронов приводит к непродолжительной пролонгации экспрессии нестина в обонятельной луковице крыс до 21 суток, в контроле до 14 суток. На протяжении наблюдения отмечается волнообразное изменение плотности нестин-позитивных структур от центра луковицы к периферии.
9. Неонатальное введение токсической дозы капсаицина вызывает усиление экспрессии DCX в структурах центральных слоев ОЛ с последующим распространением позитивных прогениторов на периферию. Эта интенсификация миграции внутри луковицы проявляется в центральных отделах на протяжении 90 суток, в митральном и плексиформном слоях – в течение трех недель. В гломерулярном слое эффект увеличения экспрессии развивается на 3-4 недели позже, чем в других слоях, и продолжается до 90 суток жизни крыс.
10. Нейростимуляция путем введения нейропептида TKPRPGP и токсическое воздействие капсаицином в неонатальном периоде приводят к повышению уровня и пролонгации экспрессии маркеров пролиферации и разных стадий дифференцировки, но степень выраженности изменений различна.
11. Оценка численной плотности n-NOS+ нейронов в экспериментах выявила разнонаправленные изменения. Введение нейропептида TKPRPGP приводит к устойчивому снижению численной плотности всех субпопуляций n-NOS позитивных клеток до конца наблюдения (180 суток). Влияние капсаицина на субпопуляции n-NOS+ нейронов отличается избирательностью: численная плотность n-NOS+ короткоаксонных нейронов гранулярного и субэпендимального слоёв, а также перигломерулярных нейронов, достоверно не отличается от контроля, в клетках гранулярного слоя отмечается повышение экспрессии n-NOS до 35 суток наблюдения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Использованный набор маркеров и выбранный объект исследования могут быть рекомендованы для комплексной оценки влияния различных веществ на нейрогенез в детском и зрелом организме, что позволяет оценивать и прогнозировать реакцию остальных стволовых

ниш и направление компенсаторного процесса в целом. Результаты могут составить основу для дальнейшей разработки и клинического применения новых методов стимуляции нейрогенеза, что дает возможность использовать эти данные в практике неврологов, нейроморфологов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Варенцов В.Е.** Распределение NADPH-d позитивных нейронов в обонятельной луковице головного мозга крыс // Сб. мат. X Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. М., 2016. – №2 – С. 280–281.
2. **Варенцов В.Е.** Гистотопографические особенности NADPH-d позитивных нейронов в обонятельной луковице и в конечном мозге крыс // Сб. мат. науч. работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно - практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвящённой 70-летию победы в Великой Отечественной войне. – Ярославль, 2015. – С.130–131.
3. **Варенцов В.Е.,** Пожилов Д.А., Чепышев Д.В., Знаткова О.А. Гистотопографические особенности распределения нейрональной-NOS в добавочной обонятельной луковице крыс // Сб. мат. науч. работ студентов и молодых ученых 70-ой Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Ярославль, 2016. – С.109–110.
4. Пожилов Д.А., **Варенцов В.Е.** Морфометрическая характеристика астроцитов обонятельной луковицы белой крысы разного возраста // Сб. тез. науч. работ студентов и молодых ученых 70-ой Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Ярославль, 2016. – С.110–112.
5. Пожилов Д.А., **Варенцов В.Е.,** Румянцева Т.А. Возрастные особенности морфологии астроцитов обонятельной луковицы и рострального потока у белой крысы // Мат. II Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы нейробиологии. Структура и функции нервной системы в норме и патологии». – Ярославль, 2016. – С.42–43.
6. **Варенцов В.Е.,** Пожилов Д.А., Чепышев Д.В., Знаткова О.А. Особенности распределения нейрональной-NO-синтазы и NADPH-диафоразы в обонятельной луковице у крыс // Мат. II Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы нейробиологии. Структура и функции нервной системы в норме и патологии». – Ярославль, 2016. – С.9–10.

7. **Варенцов В.Е.**, Пожилов Д.А., Чепышев Д.В., Знаткова О.А. Морфометрические показатели ламинарной структуры обонятельной луковицы крыс в онтогенезе // Морфология. – 2016, №3. – С. 45–46.
8. **Варенцов, В.Е.**, Румянцева, Т.А., Пожилов, Д.А., Чепышев, Д.В., Знаткова, О.А. Активность нейрональной-NOS в различных слоях обонятельной луковицы крысы // Мат. Всероссийской научно-практической конференции с Международным участием, посвященный 120-летней годовщине со дня рождения профессора Б.М. Соколова. – Рязань, 2016. – С. 30–31.
9. Пожилов, Д.А., **Варенцов, В.Е.**, Румянцева, Т.А. Сравнительная характеристика астроцитов обонятельной луковицы белой крысы в подсосном и зрелом возрасте // Мат. Всероссийской научно-практической конференции с Международным участием, посвященный 120-летней годовщине со дня рождения профессора Б.М. Соколова. – Рязань, 2016. – С. 165.
10. **Варенцов В.Е.** Распределение даблкортин-позитивных нейронов в ростральном миграционном потоке у крыс раннего постнатального периода // Сб. тез. науч. работ студентов и молодых ученых 71-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием посвящённой юбилею президента университета, профессора, академика РАН Ю.В. Новикова. – Ярославль, 2017. – С. 152–153.
11. **Варенцов В.Е.**, Румянцева Т.А. Возрастные особенности экспрессии даблкортина в структурах обонятельных луковиц крысы // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2017. – Т. 6, №3. – С. 19–24.
12. **Варенцов В.Е.**, Пшениснов К.К., Пожилов Д.А., Мясищева Т.С. Экспрессия нестина в слоях обонятельных луковиц крыс в онтогенезе // Сборник научных трудов, посвященный 120-летию со дня рождения профессора Н.И. Одноралова и 100-летию ВГМУ им. Н.Н. Бурденко «Однораловские морфологические чтения». – Воронеж, 2018. – С. 42–46.
13. **Варенцов В.Е.**, Румянцева Т.А., Мясищева Т.С. Распределение NADPH - диафораза позитивных структур обонятельной луковицы крыс в онтогенезе // **Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.** – 2018. – Т. 26, №1. – С. 5–13. Переводная версия: **Varentsov V.E., Rumyanceva T.A., Myasishcheva T.S. Distribution of NADPH - diaphorase positive structures of olfactory bulb of rats in ontogenesis** // I.P. Pavlov Russian Medical biological herald. – 2018. – Vol. 26, №1. – P. 13–20. Опубликовано 26.01.2018.

14. Румянцева Т.А., Пожилов Д.А., **Варенцов В.Е.**, Москаленко А.В. Возрастные особенности экспрессии GFAP и DCX в обонятельных луковицах и ростральном миграционном потоке у крыс // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2018. – Т. 7, №2. – С. 69–75.
15. **Варенцов В.Е.**, Пшениснов К.К., Мясищева Т.С. Ранние изменения экспрессии нестина в обонятельной луковице крыс // **Морфология.** – 2018. – Вып. 3. – С. 54.
16. Пожилов Д.А., Москаленко А.В., **Варенцов В.Е.** DCX-позитивные клетки в обонятельной луковице и в ростральном миграционном потоке у крыс разного возраста // **Морфология.** – 2018. – Т.153, № 3. – С. 221–222.
17. Румянцева Т.А., **Варенцов В.Е.**, Пожилов Д.А., Пшениснов К.К. Распределение DCX и Ki-67 позитивных клеток в ростральном миграционном потоке у крысят // **Морфология.** – 2018. – Т.153, № 3. – С. 234–235.
18. **Варенцов В.Е.**, Румянцева Т.А., Пшениснов К.К. Экспрессия нестина в обонятельных луковицах под воздействием нейропептида Семакс // **Мат. III международной научной конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, проф. Шилкина В.В. «Современные проблемы нейробиологии».** – Ярославль, 2018. – С.13– 14.
19. Пожилов Д.А., Румянцева Т.А., **Варенцов В.Е.**, Москаленко А.В. Экспрессия даблкортина в обонятельной луковице и ростральном потоке у крыс инфантильного возраста после воздействия нейротоксина // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2018. – Т. 7, №4. – С. 50–55.
20. Румянцева Т.А., Пожилов Д.А., **Варенцов В.Е.**, Москаленко А.В. Реакция астроцитов обонятельной луковицы крысы на введение капсаицина в инфантильном возрасте // **Вестник новых медицинских технологий.** – 2018. – Т.155, №4. – С. 239 – 244.
21. **Варенцов В.Е.**, Пожилов Д.А., Пшениснов К.К., Резников А.С. Влияние химической стимуляции на пролиферацию в обонятельных луковицах // **Морфология.** – 2019. – Т.155, № 2. – С. 56.
22. Пожилов Д.А., Румянцева Т.А., **Варенцов В.Е.**, Москаленко А.В. Особенности компенсаторной реакции обонятельных луковиц крыс на введение нейротоксина в инфантильном возрасте // **Морфология.** – 2019. – Т.155, № 2. – С. 231.
23. **Варенцов В.Е.**, Шурыгина Р.К., Можаяева О.К., Мясищева Т.С. Влияние нейротоксина на уровень пролиферации в обонятельных луковицах // **Морфология.** – 2019. – Т.155, №2. – С. 244–245.
24. **Варенцов В.Е.**, Румянцева Т.А., Пшениснов К.К., Мясищева Т.С., Пожилов Д.А. Возрастная пластичность нитрэргических субпопуляций нейронов обонятельной

- луковицы крысы // **Медицинский вестник Северного Кавказа.** – 2019. – Т. 14, №1.2. – С. 168–171.
25. **Варенцов В.Е.,** Румянцева Т.А., Киселева Е.В., Мясищева Т.С. Пролиферативная активность в обонятельных луковицах у крыс при моделировании нейродегенерации // **Морфология.** – 2019. – Т.156, №5 – С. 26–31.
26. **Варенцов В.Е.,** Румянцева Т.А., Верзилина А.Д., Пшенисцов К.К. Экспрессия нестина в субвентрикулярной зоне мозга крысы в разные периоды онтогенеза // «Морфологические исследования в клинической практике и экспериментальной медицине». – Петрозаводск, 2019. – С.13–17.
27. Способ моделирования нейродегенеративного заболевания у половозрелых лабораторных крыс: **патент №2674086** Российская Федерация / Знаткова Ольга Алексеевна, **Варенцов Вячеслав Евгеньевич,** Румянцева Татьяна Анатольевна, Пожилов Дмитрий Алексеевич, заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, заявл. №2018110503 23.03.2018, опубл. 04.12.2018. – Бюл. №34.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ОЛ – обонятельная луковица
- ЦНС – центральная нервная система
- SVZ – субвентрикулярная зона
- SGZ – субгранулярная зона
- ИГХ - иммуногистохимия
- RMS – ростральный миграционный поток
- КАН – короткоаксонные нейроны (ГКАН – глубокие, ПКАН - поверхностные)
- НСК – нейральные стволовые клетки
- Ki-67 – маркер пролиферации
- DCX – даблкортин
- NES – нестин
- n-NOS – нейрональная NO-синтаза