

Оригинальные исследования



© УСТИНОВА Т. И., МЕДВЕДЕВА Н. Н., САЛМИНА А. Б., МАЛИНОВСКАЯ Н. А.

УДК 616.8-091.81-02:613.842

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРО-ГЛИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ СПИННОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТАБАЧНЫМ ДЫМОМ

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

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, ректор – д. м. н., проф. И. П. Артюхов; кафедра биологии с экологией и курсом фармакогнозии, зав. – д.б.н., доцент Т. Я. Орлянская; кафедра анатомии и гистологии человека, зав. – д. м. н., проф. Н. Н. Медведева; кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии; НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, зав. – д. м. н., проф. А. Б. Салмина.

Цель исследования. Изучить количественные и качественные структурные изменения нейро-глиальных популяций моторных ядер спинного мозга молодых животных после воздействия табачным дымом (пассивное курение).

Материалы и методы. Объект исследования нейро-глиальные популяции моторных ядер спинного мозга молодых крыс. Используются гистологические и иммуногистохимические методы исследования, статистический анализ данных.

Результаты. Отмечено уменьшение числа нормально функционирующих нейронов, появление клеток в состоянии деструкции, затормаживание процесса нейрогенеза.

Заключение. Выявлены морфологические и иммуногистохимические изменения в спинном мозге крыс, свидетельствующие о включении компенсаторно-приспособительных процессов после экзогенного воздействия.

Ключевые слова. спинной мозг, нейро-глиальная популяция, апоптоз, нейрогенез.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF NEURO-GLIAL POPULATIONS OF RAT SPINAL CORD FOLLOWING TOBACCO SMOKE EXPOSURE

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

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky

The aim of the research. To study the quantitative and qualitative structural changes of neuro-glial populations of the motor nuclei of the spinal cord of young animals following tobacco smoke exposure (passive smoking).

Materials and methods. The object of the study the neuro-glial population of the motor nuclei at the spinal cord in young rats. Were used histological and immunohistochemical methods of research, statistical analysis of data.

Results. It was noted a decrease in the number of normally functioning neurons, the appearance of cells in the state of degradation, braking process of neurogenesis.

Conclusion. There were revealed morphological and immunohistochemical changes in the spinal cord of rats, indicating the inclusion of compensatory and adaptive processes after the exogenous impact.

Key words: the spinal cord, neuro-glial population, apoptosis, neurogenesis.

Введение

Согласно современным представлениям, пластичность биологических структур основывается на их способности к адаптации, возникающей в организме под влиянием факторов среды и влекущей за собой морфологические изменения [4]. Многие исследования в данной области наглядно свидетельствуют, что морфологические изменения в нервной системе проявляются в закономерных компенсаторно-приспособительных изменениях нейронов и глии. Исследователями выделяется две категории функциональных изменений: первая – гистохимические, связанные с изменением ферментативной активности и белкового фонда в клетке; вторая – морфометрические,

проявляющиеся в изменении линейных параметров нейронов, в разных вариантах хроматолиза базофильного вещества [9].

Преобладающее большинство морфологических исследований нервной системы касается структурных перестроек нейронов и клеток глии головного мозга после ишемии, спинного мозга после спинальных травм [8, 10, 11].

Нами не найдено работ, посвященных изучению изменений в нейро-глиальных популяциях спинного мозга после воздействия табачным дымом. Однако, курение является одной из вредных привычек современного общества, которая наносит серьезный урон здоровью, в частности, нервной системе.

Цель исследования – изучить количественные и качественные структурные изменения нейро-глиальных популяций моторных ядер спинного мозга молодых животных после воздействия табачным дымом (пассивное курение).

Материалы и методы

Объект исследования – беспородные белые крысы-самцы пубертатного возраста (120 суток) массой 100-120 граммов: 12 животных – интактная и 48 – экспериментальные группы. В зависимости от срока наблюдения (1, 3, 6 и 12 часов) экспериментальные животные распределены на 4 группы по 12 животных [6]. Лабораторные животные экспериментальных групп помещались в пластиковую камеру объёмом 6,2 л, в которой были имитированы условия пассивного курения (сигареты Winston, лёгкие популярные среди молодежи) [5]. По окончании эксперимента осуществляли оценку неврологического статуса животных [2]. Животные выводились из эксперимента путем острой декапитации под эфирно-воздушным наркозом с соблюдением правил о гуманном отношении к лабораторным животным, утвержденных Международной федерацией по защите животных (Приложение к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.1977; Приказ №1179 МЗ СССР от 11.10.1983 и №267 МЗ РФ от 19.06.2003). Из образцов спинного мозга (шейный и крестцово-поясничный отделы) по классической гистологической методике изготовлены гистологические препараты, которые были окрашены тионином по Нисслю (в модификации И. В. Викторова) и амидочерным 10Б.

При описании гистологических препаратов регистрировали плотность распределения нейронов и глиоцитов (сателлитные и свободные), их линейные размеры и степень хроматофилии [1, 3, 7]. Проводился подсчет количества клеток, вступивших в процесс апоптоза (метод TUNEL). Для выявления в нейронах моторных ядер спинного мозга

процесса нейрогенеза использовали иммуногистохимический метод определения в нервных клетках транскрипционного фактора Pax 6 (Abcam, ab78545, mouse monoclonal) [9, 13]. Математическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ «STATISTICA v. 6.0».

Описательная статистика результатов исследования для количественных признаков представлена медианами и квартилями (Me [Q₂₅; Q₇₅]). 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. Межгрупповое различие оценивалось при помощи H-критерия Крускала-Уоллиса, при обнаружении различий между выборками использовали непараметрические варианты критериев Даннета и Ньюмена-Кейлса. Для сравнения двух опытных выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе неврологического статуса экспериментальных животных выявлено, что через 1 и 3 часа пассивного курения подопытные находились в состоянии умеренной комы (95% и 97%), встречались единичные случаи глубокой комы (5% и 3%). Через 6-12 часов 95% и 90% животных, соответственно, находились в глубокой коме, а 5% и 10% в состоянии умеренной комы. При умеренной коме животные лежали на животе, все рефлексы были замедлены, также наблюдалось слабое слюноотделение и слезоточивость. При глубокой коме основные рефлексы отсутствовали, наблюдалось сильное слюнотечение и слезоточивость [5,6].

При изучении гистологических препаратов спинного мозга животных экспериментальных групп, в сравнении с животными интактной группы, установлено, что количество

Таблица 1

Количественные показатели нейронов и глиоцитов в популяции больших нейронов моторных ядер спинного мозга крыс после воздействия табачным дымом

№	Сроки воздействия (Me [Q ₁ ; Q ₃])	Количественные показатели, абсолютное число клеток (на S=1 мм ²)				
		Количество нейронов	Количество сателлитной глии	Количество свободной глии	Глио-нейрональный индекс по отношению к сателлитной глии	Глио-нейрональный индекс по отношению к свободной глии
1.	контроль N=12	34,6 [34,6; 34,6]	69,2 [34,6; 103,9]	2736,2 [2632,3; 3013,3]	1,5 [1; 2,5]	79 [63,6; 85,0]
2.	1 час N=12	34,6 [34,6; 34,6]	86,5 [34,6; 103,9]	2736,2 [2459,1; 2952,7]	1,7 [1; 3]	71 [43,5; 80,2]
3.	3 часа N=12	34,6 [34,6; 34,6]	69,2 [34,6; 103,9]	1489,3 [1212,2; 2424,5]	1,58 [1; 3]	39 [28; 57]
4.	6 часов N=12	34,6 [34,6; 34,6]	34,6 [34,6; 69,2]	1454,7 [1177,6; 1974,2]	1 [0,5; 2]	39,5 [28; 57]
5.	12 часов N=12	34,6 [34,6; 34,6]	0 [0; 69,2]	1264,2 [1004,4; 1697,1]	0 [0; 2]	36 [29; 47,2]
p		p>0,05	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ >0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₁₋₅ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₂₋₅ <0,05 p ₃₋₄ <0,05 p ₃₋₅ <0,05 p ₄₋₅ <0,05	p ₁₋₂ >0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₁₋₅ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₂₋₅ <0,05 p ₃₋₄ >0,05 p ₃₋₅ <0,05 p ₄₋₅ <0,05	p ₁₋₂ >0,05 p ₁₋₃ >0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₁₋₅ <0,05 p ₂₋₃ >0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₂₋₅ <0,05 p ₃₋₄ <0,05 p ₃₋₅ <0,05 p ₄₋₅ <0,05	p ₁₋₂ >0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₁₋₄ <0,05 p ₁₋₅ <0,05 p ₂₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₂₋₅ <0,05 p ₃₋₄ >0,05 p ₃₋₅ >0,05 p ₄₋₅ >0,05

Таблица 2

Процессы апоптоза и нейрогенеза в нервных клетках моторных ядер спинного мозга после пассивного курения

Сроки воздействия	Табачный дым				
	Клетки в состоянии деструкции, абс. число			Клетки в состоянии апоптоза, абс. число	Рах 6-позитивные клетки, абс. число
	тотально-гиперхромные	сморщенные	клетки-тени		
контроль	0 [0; 2]	0 [0; 3]	0 [0; 3]	34,5 [5,5; 44,5]	2 [0; 3]
1 час	1* [0; 3]	0 [0; 3]	1,7* [0; 5]	10,5* [1,5; 20,5]	28,89* [5,13; 61,29]
3 часа	1,49* [0; 5]	0 [0; 3]	0 [0; 2]	17,5* [3; 27,5]	0 [0; 3]
6 часов	6,15* [0; 19,7]	1,2* [0; 3]	5,6* [0; 14,2]	14* [2,5; 24]	0 [0; 3]
12 часов	13,13* [11,3; 22,2]	2,35* [1,9; 6,2]	1,28* [0; 3,3]	0 [0; 2]	0 [0; 3]

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

нейронов на разных сроках наблюдения существенно не изменялось (результаты исследования представлены на примере больших нейронов) [3]. Увеличение количества сателлитных глиоцитов наблюдалось на сроке 1-го часа, по истечению 6-ти часов их число уменьшилось в 2 раза, а через 12 часов они не выявлены. Число свободных глиоцитов с увеличением срока воздействия уменьшалось (табл. 1). Значения глио-нейронального индекса по отношению к сателлитной глии увеличивались на сроке 1-го часа и уменьшались в последующие сроки воздействия табачным дымом. Глио-нейрональный индекс по отношению к свободной глии существенно уменьшался с увеличением срока воздействия (табл. 1). Уменьшение клеток свободной глии и увеличение сателлитной глии, в соответствии с выполняемыми ими функциями, свидетельствует о включении компенсаторно-приспособительных возможностей нервной ткани в экстремальных для неё условиях.

Исследование препаратов спинного мозга на апоптоз показало, что запрограммированная гибель нейронов встречается как в норме, так в препаратах животных экспериментальных групп на сроках воздействия табачным дымом 1, 3 и 6 часов. Наибольшее количество апоптозных клеток выявлено в препаратах спинного мозга животных интактной группы, среди экспериментальных животных – на сроке 3-х часов, однако их количество было меньше в 2 раза. Одновременно изучение гистологических препаратов спинного мозга, окрашенных тионином по Нисслю, показало, что количество нормохромных клеток существенно уменьшалось с увеличением срока воздействия табачным дымом, но увеличивалось число клеток, находящихся в состоянии деструкции (тотально-гиперхромные, сморщенные, клетки-тени). Эти факты могут свидетельствовать о том, что при пассивном курении наряду с процессами апоптоза выявлены процессы деструкции нейронов (патологическая гибель клеток) в отличие от интактных животных [11]. Одновременно нами изучены процессы нейрогенеза в моторных ядрах спинного мозга путем подсчета Рах 6-позитивных клеток. Оказалось, что через 1 час после воздействия табачным дымом, нервные клетки активно включаются в процессы восстановления, однако во все последующие сроки наблюдения Рах 6-позитивные клетки, свидетельствующие о протекающих процессах нейрогенеза, нами не выявлены (табл. 2) [12].

Заключение

Результаты исследования продемонстрировали проявление нейро-глиальными популяциями моторных ядер спинного мозга крыс высоких пластических возможностей на ранних сроках воздействия табачным дымом. Более длительные сроки (6 и 12 часов) пассивного курения привели к затормаживанию компенсаторно-приспособительных процессов в нервной системе животных, гибели клеток нейронального ряда, что подтверждают морфологические исследования на уровне популяции нейронов.

Литература

1. Благова Н.В. Количественный анализ популяции мотонейронов спинного мозга, участвующих в образовании седалищного нерва // Морфология. – 2010. – № 4. – С. 33.
2. Бонитенко Е.Ю., Гребенюк А.Н., Башарин В.А. Оценка неврологического статуса при острой алкогольной интоксикации в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 3. – С. 300-303.
3. Гладкович Н.Г., Наумова Л.Н., Воробьева А.Д. Количественная морфологическая характеристика нейронов передних рогов спинного мозга котенка // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1992. – № 2. – С. 254-261.
4. Живолупов С.А., Самарцев И.Н., Сыроежкин Ф.А. Современная концепция нейропластичности (теоретические аспекты и практическая значимость) // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013. – № 10. – С. 102-108.
5. Жуков И.Н., Кашевская О.П., Ходжагельдиев Т. Экспериментальная модель формирования влечения к табаку и отбора средств для ее фармакокоррекции // Вопросы наркологии. – 1989. – № 3. – С. 11-14.
6. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – Киев: Наукова думка, 1983. – 383 с.
7. Калимулина Л.Б. К вопросу о «темных» и «светлых» клетках // Морфология. – 2002. – № 4. – С. 75-79.
8. Малиновская Н.А., Салмина А.Б., Прокопенко С.В., Комлева Ю.К., Морозова Г.А., Панина Ю.А., Гасымлы Э.Д. Нейрон-астроглиальные взаимодействия в клетках

среднего мозга при экспериментальной болезни Паркинсона // Сибирское медицинское обозрение. – 2014. – № 6. – С.5-10.

9. Малиновская Н.А., Прокопенко С.В., Комлева Ю.К., Панина Ю.А., Пожиленкова Е.А., Рябоконт Р.В., Салмина А.Б. Молекулы-маркеры активации глии при нейровоспалении: новые возможности для фармакотерапии нейродегенерации // Сибирское медицинское обозрение. – 2014. – № 5. – С.5-15.

10. Моргун А.В., Кувачева Н.В., Хилажева Е.Д., Салмина А.Б. Изучение метаболического сопряжения и межклеточных взаимодействий на модели нейроваскулярной единицы *in vitro* // Сибирское медицинское обозрение. – 2014. – № 6. – С. 1-5.

11. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicol. Pathology*. – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 495-516.

12. Kawakami Y., Yoshida K., Yang J. H. Impaired neurogenesis in embryonic spinal cord of Phgdh knockout mice, a serine deficiency disorder model // *Neurosci. Res.* – 2009. – Vol. 63, № 3. – P. 184-193.

13. Zhang G., Vidal Pizzaro I., Swain G.P. Neurogenesis in the lamprey central nervous system following spinal cord transection // *J. Comp. Neurol.* – 2014. – Vol. 522, № 6. – P. 1316-1332.

References

1. Blagova N.V. Quantitative analysis of the population of motor neurons of the spinal cord involved in the formation of the sciatic nerve // *Morphology*. – 2010. – № 4. – P.33.

2. Bonitenko E.Yu., Grebenyuk A.N., Basharin V.A. Evaluation of neurological status in acute alcohol intoxication in experiment // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2010. – № 3. – P. 300-303.

3. Gladkovich N. G., Naumova L.N., Vorobyov A.D. Quantitative morphological characteristics of neurons in the anterior horns of the spinal cord in kitten // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 1992. – № 2. – P. 254-261.

4. Zhivolupov S.A., Samartsev I.N., Syroezhkin F.A. Current concept of neuroplasticity (theoretical aspects and practical significance) // *Journal of Neurology and Psychiatry named after S.S. Korsakov*. – 2013. – № 10. – P. 102-108.

5. Zhukov I.N., Kashevskaya O.P., Hodzhagel'diev T. Experimental model of craving for tobacco and the selection of funds for its pharmacocorrection // *Problems of Narcology*. – 1989. – № 3. – P. 11-14.

6. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakharia E.A. Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in the experiment. – Kiev: Naukova Dumka, 1983. – 383 p.

7. Kalimulina L.B. On the question of «dark» and «light» cells // *Morphology*. – 2002. – № 4. – P. 75-79.

8. Malinovskaya N.A., Salmina A.B., Prokopenko S.V., Komleva Yu.K., Morozova G.A., Panina Yu.A., Gasyml E.D. Neuron-astroglial interactions in cells of the midbrain at experimental Parkinson's disease // *Siberian Medical Review*. – 2014. – № 6. – P. 5-10.

9. Malinovskaya N. A., Prokopenko S. V., Komleva Yu. K., Panina Yu. A., Pozhilenkova E. A., Ryabokon R. V., Salmina A. B. Molecular markers of glial cells activation in neuroinflammation: new opportunities for pharmacotherapy of neurodegeneration // *Siberian Medical Review*. – 2014. – № 5. – P. 5-15.

10. Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Khilazheva E.D., Salmina A.B. Research of the metabolic conjugation and intercellular interactions on the model of neurovascular unit *in vitro* // *Siberian Medical Review*. – 2015. – № 1. – P. 28-32.

11. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicol. Pathology*. – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 495-516.

12. Kawakami Y., Yoshida K., Yang J. H. Impaired neurogenesis in embryonic spinal cord of Phgdh knockout mice, a serine deficiency disorder model // *Neurosci. Res.* – 2009. – Vol. 63, № 3. – P. 184-193.

13. Zhang G., Vidal Pizzaro I., Swain G. P. Neurogenesis in the lamprey central nervous system following spinal cord transection // *J. Comp. Neurol.* – 2014. – Vol. 522, № 6. – P. 1316-1332.

Сведения об авторах

Устинова Татьяна Ивановна – старший преподаватель кафедры биологии с экологией и курсом фармакогнозии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660021, г. Красноярск, ул. Карла Маркса, д. 124; тел. 8(391)2217202; e-mail: ecnbyjd185@mail.ru.

Медведева Надежда Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой анатомии и гистологии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8 (391)2201409; e-mail: medvenad@mail.ru.

Салмина Алла Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8 (391)2280769; e-mail: allasalmina@mail.ru.

Малиновская Наталья Александровна – доктор медицинских наук, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, доцент кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8 (391)2280769; e-mail: reg.kgmu@gmail.com.

Authors

Ustinova Tatyana Ivanovna – Lecturer, the Department of Biology, Ecology and the Course of Pharmacognosy, Krasnoyarsk State Medical University prof. named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation.

Address: 124, K. Marx Str., Krasnoyarsk, RF, 660021; Phone: 8 (391) 2217202; e-mail: ecnbyjd185@mail.ru

Medvedeva Nadezhda Nikolaevna – Doctor of Medicine Sciences, Professor, Head of the Department of Anatomy and Histology, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation.

Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, RF, 660022; Phone: 8 (391) 2201409; e-mail: medvenad@mail.ru.

Salmina Alla Borisovna – Doctor of Medicine Sciences, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry with Course of Medical, Pharmaceutical and Toxicological chemistry, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Patobiology, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation.

Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, RF, 660022; Phone: 8 (391) 2280769; e-mail: allasalmina@mail.ru.

Malinovskaya Natalia Alexandrovna – Doctor of Medicine Sciences, Research Institute of Molecular Medicine and Patobiology, Assistant Professor of the Department of Biological Chemistry with Course of Medical, Pharmaceutical and Toxicological chemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation.

Address: 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, RF, 660022; Phone: 8 (391) 2280769; e-mail: reg.kgmu@gmail.com.