

НЕЙРОГЕНЕЗ В МОЗГЕ КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ КАТЕГОРИЙ, ПОЛУЧАВШИХ ДОЗИРОВАННУЮ ФИЗИЧЕСКУЮ НАГРУЗКУ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

ЗИМУШКИНА Н.А.¹, КОСАРЕВА П.В.¹, ХОРИНКО В.П.¹, КАРНАУХОВА Н.В.²

NEUROGENESIS IN THE RAT'S BRAIN OF DIFFERENT AGES SUBJECTED TO THE GRADUATED EXERCISE TREATMENT (EXPERIMENTAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

ZIMUSHKINA N.A., KOSAREVA P.V., KHORINKO V.P., KARNAUKHOVA N.B.

¹Кафедра нормальной, топографической и клинической анатомии и оперативной хирургии (зав. кафедрой профессор И.А. Баландина), отдел морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ (зав. д.м.н. П.В. Косарева) ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, г.Пермь; ²патологоанатомическое отделение №2 (зав. отделением – Н.В.Карнаухова) ГАУЗ ПК «Клиническое патологоанатомическое бюро», г. Пермь.

В работе представлены результаты гистохимической оценки экспрессии белков GFAP, CD56 (NCAM) и Cyclin D1 в ткани мозга у крыс разного возраста при воздействии регулярной дозированной физической нагрузки. В результате установлено, что нейрогенез как у старых, так и у молодых животных стимулируется дозированной физической нагрузкой, в большей степени – у самок. У молодых животных контрольной группы и группы, получавшей дозированную физическую нагрузку, нейрогенез отмечался в субэпендимной области, при физической нагрузке – и в гиппокампе (у самок). У старых животных контрольной группы нейрогенез выявлен в субэпендимной области у небольшого количества самок. У старых животных, получавших дозированную физическую нагрузку, образование новых нервных клеток выявлено в субэпендимной области – у всех животных, как у самцов, так и самок, а также в эпендиме – у самок. При этом у старых животных определенная часть новообразованных клеток (в зубчатой фасции и гиппокампе), по-видимому, все же дифференцируется в направлении глиального фенотипа.

Ключевые слова: нейрогенез, гиппокамп, зубчатая фасция, эпендима, субэпендимная область, нелинейные белые крысы, старые и молодые животные, дозированная физическая нагрузка.

The results of histochemical evaluation of protein expression of GFAP, CD56 (NCAM) and Cyclin

D1 in the brain tissue in rats of different ages when exposed to a regular physical activity are presented. Results. It is found that the exercise stress stimulated the neurogenesis in old and young animals, to a greater extent - in females. In young animals in control as well as in experimental group the neurogenesis was observed in the subependymal zone. During exercise neurogenesis was also observed in the hippocampus (in females). In the control group of old animals the neurogenesis was detected in the hippocampus in a small number of females. In older animals treated graduated physical stress, the new nerve cells formed in the subependymal zone - both in males and females, and in the ependyma - in females. However in older animals a certain part of the newly formed cells (in the dentate gyrus and hippocampus), is (можно was) apparently still differentiated towards in glial phenotype.

Key words: neurogenesis, hippocampus, dentate gyrus, ependyma, subependymal zone, nonlinear white rats, young and old animals, graduated exercise.

Введение. В клинических исследованиях установлено, что физическая активность может быть использована как терапевтическое средство при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера [1, 2]. В эксперименте продемонстрировано влияние физических упражнений на процессы обучения и памяти, улучшение кровотока в ткани мозга и устойчивости нейронов к травмам, интенсификацию нейрогенеза, в частности, в гиппокампе и моторной коре [3].

Вместе с тем, предполагается, что сохранение таких эффектов, как увеличение скорости походки и восстановление ее ритма у пациентов с болезнью Паркинсона при занятиях на беговой дорожке в течение нескольких недель после окончания упражнений обусловлено скорее изменением нейропластичности, нежели эффективным нейрогенезом [4].

Цель исследования - изучить процессы

нейрогенеза в ткани мозга у животных разного возраста при воздействии регулярной дозированной физической нагрузки.

Материал и методы исследования. Исследования выполнены на 80 интактных животных (неинбредных белых крысах). Животные разделены на 4 группы по 20 особей в каждой (10 самцов и 10 самок): молодые (4 мес) – контроль и опыт (дозированная физическая нагрузка), и старые (24-26 мес) – контроль и опыт. Для дозированной физической нагрузки (ДФН) продолжительностью 17 дней, 20 мин/занятие [5] использовали аппаратно-программный комплекс «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», 124498 Москва, Зеленоград, 2013). Эксперименты проведены в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств Минздрава и социального развития РФ (2012 г.), с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г. №755). Материал для исследования получали от животных после завершения поведенческой части исследования - спустя 21 день от начала эксперимента.

Анализ моторной коры (FrPaM) проводили на уровне (-0,3)-(-3,3) мм, структур гиппокампа - (-2,8)-(-3,8) мм от брегмы [6]; при микроскопии

препаратов в гиппокампе выделяли 4 области - поля гиппокампа – CA1, CA2, CA3, CA4 [7]. С целью изучения нейрогенеза у животных разного возраста при физической нагрузке проведено иммуногистохимическое исследование гиппокампов с использованием антител к белкам GFAP (Monoclonal Mouse Antibody; Clone GA5, Diagnostic BioSystems, USA), CD56 – NCAM (123C3.D5; Mouse Monoclonal Antibody; The Hague, Netherlands) и Cyclin D1 (Rabbit Monoclonal Antibody; Clone SP4; LabVision Corporation, USA). При выполнении иммуногистохимических исследований применяли универсальный иммунопероксидазный метод с использованием полимерной системы детекции «Histofine» (Япония; «Микротесты»). Статистическая обработка полученных данных проводилась вычислением критерия χ^2 с использованием программы Biostat.

Результаты исследования и их обсуждение. При проведении иммуногистохимических исследований экспрессия GFAP определялась у молодых животных контрольной и опытной группы в зрелых астроцитах мозга, в том числе, локализованных в гиппокампе, двигательной коре и зубчатой фасции (рис. 1).

Клетки эпендимы в группе контроля были иммунопозитивны в отношении циклина у 60%

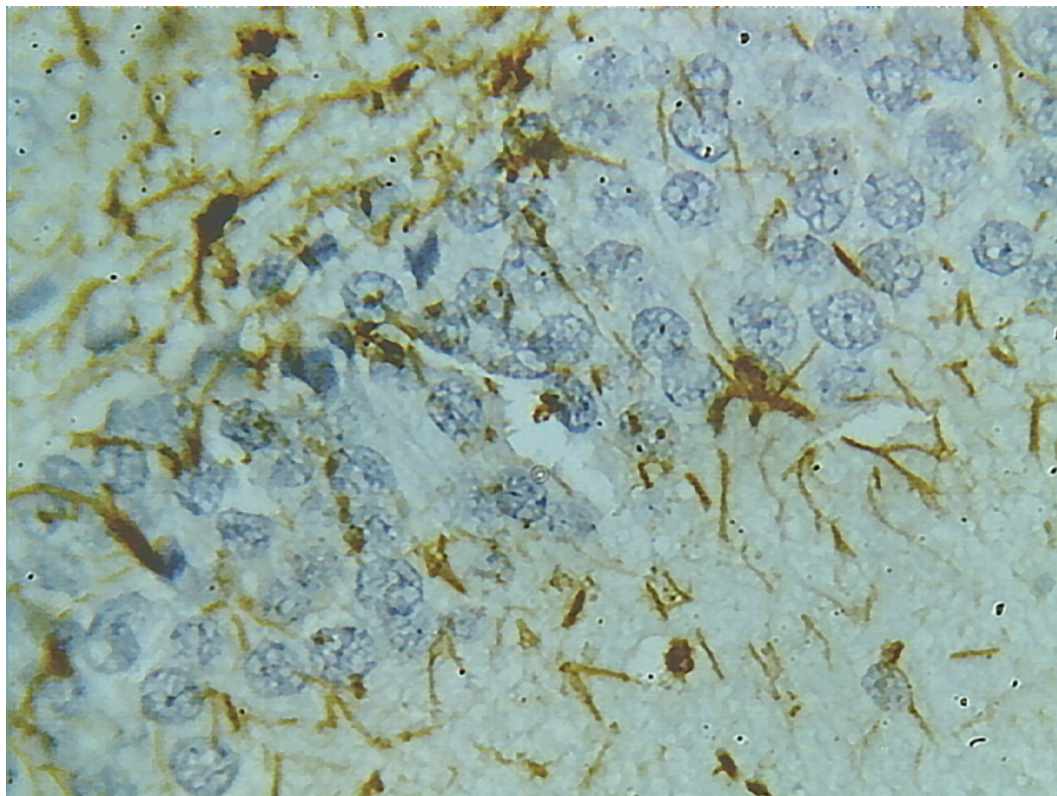


Рис. 1. Экспрессия GFAP в астроцитах зубчатой фасции в мозге молодой самки контрольной группы. Ув. 600.

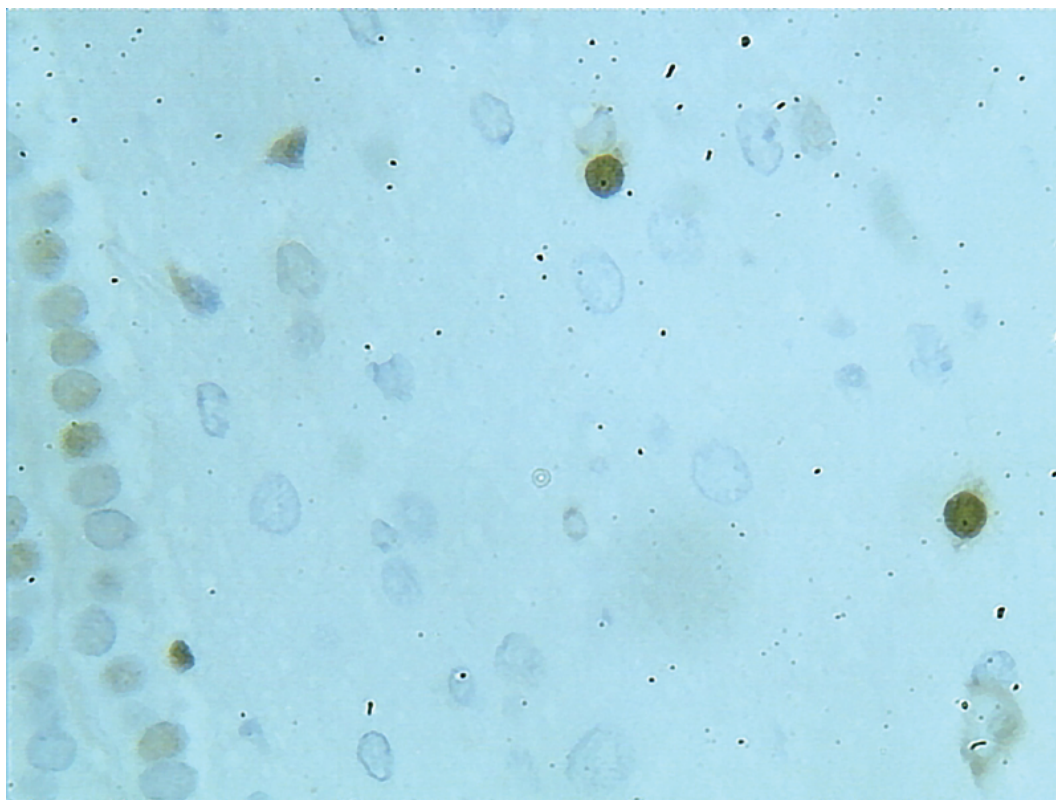


Рис. 2. Экспрессия циклина в ядрах клеток в субэпендимной области СВЗ молодой самки контрольной группы. Ув. 600.

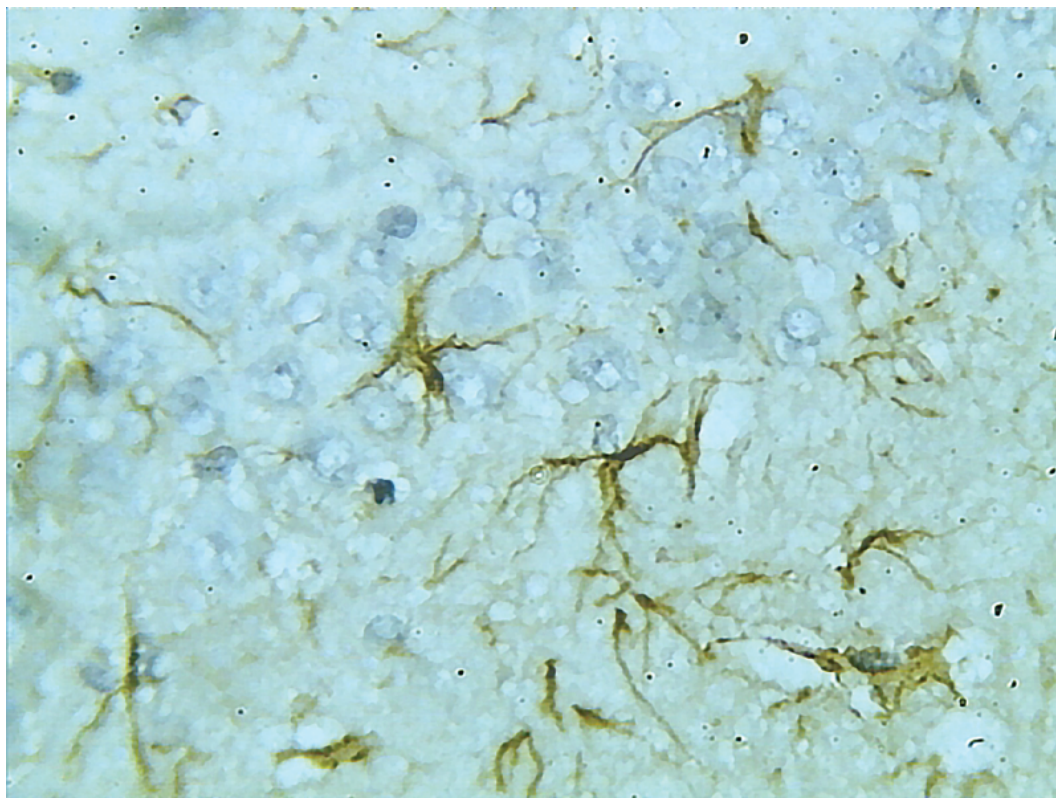


Рис. 3. Экспрессия GFAP в астроцитах зубчатой фассии старой самки крысы контрольной группы. Ув. 600.

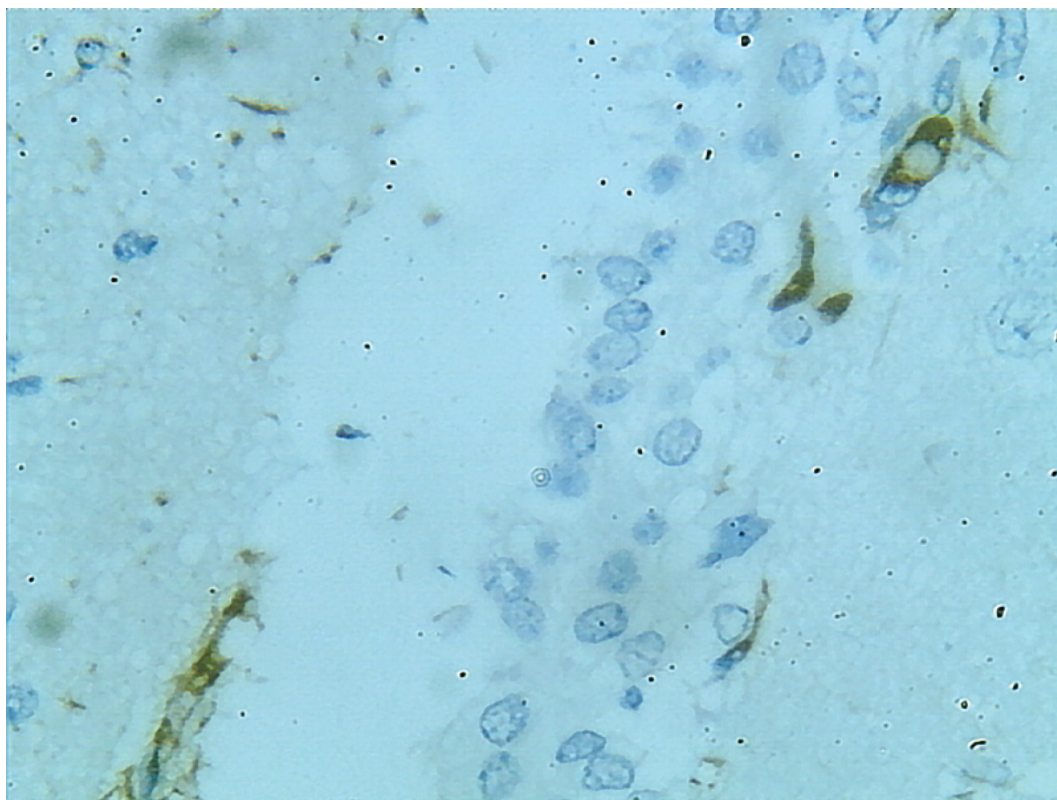


Рис. 4. Отдельные GFAP-позитивные клетки в эпендиме желудочка старого самца крысы, получавшего физическую нагрузку. Ув. 600.

самок. У всех животных, как группы контроля, так и у животных, получавших дозированную физическую нагрузку (100%; самцов и самок) отдельные иммунопозитивные к циклину ядра выявляли в субэпендимной области (рис. 2) и моторном поле коры головного мозга (FrPam). Также в опытной группе положительную реакцию на циклин наблюдали во всех полях гиппокампа у 40% самок.

У всех молодых самцов и самок во всех экспериментальных группах в субэпендимной области визуализировались единичные NCAM окрашенные клетки (100%; самцы и самки). Кроме того слабopоложительную реакцию на NCAM выявляли в гиппокампах всех самок после дозированной физической нагрузки, преимущественно в поле СА4.

Таким образом, у молодых животных группы контроля отмечается неинтенсивный нейрогенез в субэпендимной области и эпендиме; в то время как у молодых животных, получавших дозированную физическую нагрузку, нейрогенез, судя по экспрессии циклина и CD56, отмечался не только в субэпендимной области, но и у самок – в гиппокампе. То есть, у молодых животных контрольной и опытной групп наблюдались одни и те же закономерности – новообразованные клетки выявлены преимущественно в субэпендимной области, что не противоречит существующим представлениям,

учитывая возраст животных [8].

При микроскопии гиппокампа старых животных во всех экспериментальных группах экспрессия GFAP определялась в астроцитах мозга (рис. 3). Единичные окрашенные клетки морфологически не относящихся к астроцитам были выявлены в эпендиме и субэпендимной области (рис. 4).

Экспрессия циклина. В ткани мозга старых животных выявлялась слабоинтенсивная экспрессия в эпендиме у самок как в контрольной, так и в опытной группах. Во всех экспериментальных группах у 100% животных экспрессию умеренной интенсивности мы наблюдали в субэпендимной области и в моторном поле коры. Также, выраженную экспрессию отмечали у всех животных во всех полях гиппокампа, слабоинтенсивную в зубчатой фасции у 50% самцов контрольной группы и 80% самок, получавших физическую нагрузку.

Экспрессия CD56 (NCAM). Единичные окрашенные клетки мы наблюдали только у самок обеих групп в субэпендимной области и в эпендиме в опытной группе.

Таким образом, у старых животных, получавших дозированную физическую нагрузку, образование новых клеток отмечается в субэпендимной области, у всех животных, как у самцов, так и самок, о чем свидетельствуют результаты исследования экспрессии циклина. В эпендиме

экспрессия циклина выявлена только у самок. Вместе с тем, экспрессия CD56 выявлена в эпендиме и субэпендимной области у ограниченного числа особей (самки), а экспрессия GFAP выявлена в субэпендимной области в клетках, морфологически не относящихся к астроцитам, у всех животных. Также в зубчатой фасции и гиппокампе в этой экспериментальной группе отмечалась экспрессия циклина, без экспрессии NCAM.

Согласно литературным данным, находящиеся в субвентрикулярной и субгранулярной зонах нейральные стволовые клетки (НСК) являются прямыми потомками фетальных астроцитобластов, и, также как последние, характеризуются наличием в цитоплазме специфических фибриллярных белков класса III – нестина, GFAP и виментина, а также экспрессией ядерных факторов транскрипции Sox1, Sox2 и Musashi-1 [9]. Кроме того, экспрессия GFAP характерна для НСК на продвинутых стадиях нейрогенеза [10, 11]. Соответственно, экспрессия GFAP недифференцированными клетками, не относящимися морфологически к астроцитам, может трактоваться (при наличии экспрессии циклина) как маркер нейрогенеза в этих зонах. Известно также, что для нейробластов характерна экспрессия NCAM и даблкортина [9], поэтому, учитывая также ранее приведенные сведения, клетки СВЗ и СГЗ, дающие экспрессию на GFAP и Cyclin D1, могут быть отнесены нами не к нейробластам, а к НСК, а экспрессирующие Cyclin D1 и CD56 (NCAM) – к нейробластам.

То есть, у старых животных, получавших физическую нагрузку, выявлен нейрогенез в субэпендимной области и у самок также в эпендиме и в пролиферативной зоне гиппокампа. Вместе с тем, нельзя исключать в этих возрастных группах и, преимущественно, в группе контроля того, что часть новообразованных клеток дифференцируется в сторону глиального фенотипа, о чем свидетельствует интенсивная экспрессия GFAP, не сопровождающаяся экспрессией NCAM (CD56).

Известно, что возрастные процессы в мозге сопровождаются ослаблением нейрогенеза и проявляется это уменьшением числа нейрональных предшественников, снижением их пролиферативной активности, удлинением клеточного цикла трансформации, нарушением пропорции выживших клеток к общему числу трансформирующихся нейробластов, дифференцировкой клеток преимущественно в сторону глиального фенотипа [12]. С другой стороны, скорость нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа и в субвентрикулярной зоне модулируется различными стимулами окружающей среды, в частности, физическая нагрузка активирует нейрогенез в зубчатой извилине [12].

Таким образом, в наших исследованиях установлено, что нейрогенез как у старых, так и у моло-

дых животных стимулируется дозированной физической нагрузкой, в большей степени – у самок. У молодых животных контрольной группы и группы, получавшей дозированную физическую нагрузку, нейрогенез отмечался в субэпендимной области, при физической нагрузке – и в гиппокампе (у самок). У старых животных контрольной группы нейрогенез выявлен в субэпендимной области у небольшого количества самок. У старых животных, получавших дозированную физическую нагрузку, образование новых нервных клеток выявлено в субэпендимной области – у всех животных, как у самцов, так и самок, а также в эпендиме – у самок.

При этом у старых животных определенная часть новообразованных клеток (в зубчатой фасции и гиппокампе), по-видимому, все же дифференцируется в направлении глиального фенотипа.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Chen H, Zhang SM, Schwarzschild MA. Physical activity and the risk of Parkinson's disease. // *Neurology* - 2005. - 64:664-9.
2. Ellis T, de Goede CJ, Feldman RG, et al. Efficacy of physical therapy program in patients with Parkinson's disease: a randomized controlled trial. // *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* – 2005 - № 86 - pp. 626-32.
3. Hillman C.H., Erickson K.I., Kramer A.F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. // *"Neuroscience: Nature Reviews"* 2008. - pp. 59-65.
4. Herman T, Giladi N, Hausdorff JM. Treadmill training for the treatment of gait disturbances in people with Parkinson's disease: a mini-review. // *Journal of Neural Transmission* 2009. - № 116. - pp. 307-318.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012; 944.
6. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* — San Diego: Academic Press, 1998.
7. Lodge D.J., Grace A.A. Aberrant hippocampal activity underlies the dopamine dysregulation in an animal model of schizophrenia. // *J. Neurosci.* 2007 Oct. 17. № 27(42). pp. 11424-30.
8. Гиляров А.В. Нестин в клетках головного мозга крыс (иммуногистохимическое исследование): Автореф. дис. канд. мед. наук. СПб, 2008. 26 с.
9. Ярыгин К.Н., Ярыгин В.Н. Нейрогенез в центральной нервной системе и перспективы регенеративной неврологии // *Журнал неврологии и психиатрии.* 2012. № 1. С. 4-13.
10. Вердиев Б.И. Исследование молекулярно-генетических механизмов нейрогенеза неокортекса и сетчатки человека *in vivo* и *in vitro*. Автореф. дисс... канд. биол. наук. Москва 2010; 22

11. Chojnacki A, Mak G, Weiss S. *PDGFR α Expression Distinguishes GFAP-Expressing Neural Stem Cells from PDGF-Responsive Neural Precursors in the Adult Periventricular Area.* // *The Journal of Neuroscience*, 29 June 2011. № 31(26). pp. 9503-9512; doi: 10.1523/JNEUROSCI.1531-11.2011.

12. Гомазков О.А. *Нейрогенез как адаптивная функция мозга.* Москва 2014; 85.

REFERENCES:

5. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv.* Pod red. Mironova A.N. *CHast' pervaya.* M.: Grif i K, 2012; 944.

8. Gilyarov A.V. *Nestin v kletkakh golovnogogo mozga krysa (immunogistokhimicheskoe issledovanie): Avtoref. dis. kand. med. nauk. SPb, 2008. 26 s.*

9. Yarygin K.N., Yarygin V.N. *Nejrogenez v tsentral'noj nervnoj sisteme i perspektivy regenerativnoj nevrologii* // *Zhurnal nevrologii i psikiatrii.* 2012. № 1. S. 4-13.

10. Verdiev B.I. *Issledovanie molekulyarno-geneticheskikh mekhanizmov nejrogeneza neokorteksa i setchatki cheloveka in vivo i in vitro.* Avtoref. diss... kand. biol. nauk. Moskva 2010.

12. Gomazkov O.A. *Nejrogenez kak adaptivnaya funktsiya mozga.* Moskva 2014; 85.

Авторская справка:

Зимушкина Нина Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной,

топографической и клинической анатомии и оперативной хирургии ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь, Россия (614000, Пермь, ул. Петропавловская, д.26), тел. +7 9082719075; e-mail: zimushkina59@mail.ru

Косарева Полина Владимировна, доктор медицинских наук, заведующая отделом морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ, заведующая курсом клинической лабораторной диагностики, доцент кафедры микробиологии и вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь, Россия (614000, Пермь, ул. Петропавловская, д.26), тел. +79504643291, E-mail: perm-bagira@narod.ru

Хоринко Виталий Петрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь, Россия (614000, Пермь, ул. Петропавловская, д.26), тел. + 79127846891

Карнаухова Наталья Валерьевна, заведующая патологоанатомическим отделением № 2 ГАУЗ ПК «Клиническое патологоанатомическое бюро», г. Пермь, Россия (614057, Пермь, ул. Автозаводская – 82), тел. +79028387633