

РЕГЕНЕРАЦИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ: ОТ ТЕОРИИ К ЭКСПЕРИМЕНТУ

¹Обухов Д.К., ²Пущина Е.В., ²Вараксин А.А.

¹Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург;

²Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского
ДВО РАН, Владивосток,
e-mail: dkobukhov@yandex.ru

Введение. Проблема физиологической и репаративной регенерации нервной системы всегда была в центре внимания нейробиологов и неврологов. В конце XX века большое количество исследований было посвящено исследованию трансплантации нервной ткани. (Полежаев и др., 1993; Семченко и др., 2000). Однако, несмотря на определенные достижения, полноценного приживания нервной ткани и восстановления функциональных связей при разного видах алло- и ксенотрансплантациях достигнуть не удалось.

Открытие нейрональных стволовых клеток (НСК), их обнаружение во взрослой нервной системе позвоночных животных и человека и развитие клеточных технологий позволило по новому взглянуть на эту проблему (Семченко и др. 2012; К.Н. Ярыгин, В.Н. Ярыгин, 2012; Ярыгин и др., 2015). В данной работе приводится краткий обзор собственных и имеющихся в литературе данных по регенерации нервной ткани в норме и в условиях эксперимента.

Нейрональные стволовые клетки (НСК) относятся к группе тканеспецифичных или региональных стволовых клеток. Они обладают характеристиками самоподдерживающейся популяции клеток, которые при дифференцировке способны давать нейроны, астроциты и олигодендроциты в развивающемся и взрослом мозге. Впервые они были обнаружены в ЦНС человека в 1995 году при анализе посмертных срезов мозга, окрашенных иммуногистохимически на BrdU (бромдезоксисуридин) (Gage et al., 1995). В настоящее время найден целый ряд нейрональных маркеров, которые позволяют более или менее надежно идентифицировать НСК и их потомки. Среди них следует отметить: ядерный антиген нервных клеток – NeuN; маркер нейробластов – даблкортин (DCX); нейрон-специфическую энolahузу – NSE; молекулы адгезии нервных клеток – PSA-NCAM; цитоскелетные белки – нестин, β -тубулин III; транскрипционные факторы – Sox-1, Sox-2, Dlx2, Pax 6 и ряд других. Часть из этих маркеров специфична для клеток нервной ткани, другие направлены на выявление свойств, характерных для разных популяций стволовых клеток. (Гомазков, 2014; Коржевский и др., 2010, 2015).

Обнаружение НСК как в развивающемся, так и во взрослом мозге поставило вопрос об их происхождении. В ранний период эмбрио-

нального развития НСК происходят из клеток нейроэпителлия, которые путем симметричного и асимметричного деления дают начало нейронам, глиальным клеткам и клеткам-предшественникам, которые включаются в процессы нейрогенеза на более поздних этапах развития, включая постнатальный период. Характер деления клеток – один из механизмов выбора НСК путей развития. В случае симметричного митоза образуются две одинаковые дочерние клетки, которые либо сохраняют пролиферативный потенциал – т.е. остаются стволовыми, либо могут уйти на путь нейрогенеза или глиогенеза – опять же обе. При втором варианте симметричного деления популяция стволовых клеток может потерять способность к самообновлению и истощится. При асимметричном делении одна клетка остается пролиферативной (стволовой), другая выходит в дифференцировку. При этом пул НСК сохраняется.

Популяция нейрональных клеток – предшественников достаточно гетерогенна. На основную роль предшественника в позднем пренатальном и в постнатальном периодах претендует т.н. «радиальная глия – RG». Она выполняет двоякую роль – ее отростки, пронизывающие всю толщу развивающейся стенки нервной трубки, служат направляющими для миграции молодых нейробластов, а также обладает потенциальными НСК, давая начало новым популяциям нейронов и глии. Особо необходимо отметить, что именно из потомков радиальной глии формируются основная масса интернейронов коры головного мозга млекопитающих животных и человека. Иммунологически в клетках радиальной глии помимо маркеров, традиционных для глиальных клеток (ГКФБ, виментин, нестин), выявляются специфические маркеры радиальной глии: фермент ароматаза-B (Aro-B), BLBP (brain lipid binding protein) и GLAST – глутаматный транспортер. Фермент **ароматаза-B** (Aro-B) связан с синтезом ароматизированных стероидов и синтезируется в клетках радиальной глии мозга молодых и взрослых позвоночных животных. Для них также характерна экспрессия полисахаридной молекулы адгезии нервных клеток (PSA-NCAM), транскрипционного фактора Sox-2 и фактора RG2. Важно подчеркнуть, что в клетках радиальной глии обнаруживаются маркеры и нейрональной линии дифференцировки (ТН- тирозингидроксилаза, ГАМК и NADP – диафороза). (Обухов, Пущина, 2011). На роль нейрональных предшественников также претендуют клетки эпандимы, астроциты, NG2 клетки и танициты (Гомазков, 2014; Pinto, Götz. 2007).

Таким образом, во взрослом мозге позвоночных животных и человека сохраняются группы клеток-предшественников, которые обладают свойствами НСК и способны в течение длительного периода обновлять популяции нейронов и глии.

Нейрогенные ниши. Нейрональные стволовые клетки и их потомки находятся в тесном взаимодействии со многими элементами окружающей их структуры мозга, формируя вместе с ними своеобразную – **нейрогенную нишу (stem niche)**. В ее состав входят НСК и их потомки, клетки эпендимы, астроциты, олигодендроциты, эндотелий капилляров мозга и компоненты межклеточного матрикса (Обухов и др., 2015). Клетки «ниши» способны экспрессировать целый ряд факторов, необходимых для сохранения популяции НСК и регуляции нейро- и глиогенеза. Среди факторов, влияющих на нейрогенез следует отметить группу транскрипционных факторов (Shh, Sox1, Sox2, Tbr1, Wnt, BMP, Notch1, Pax6 и др). Они действуют на разные стадии нейро- и глиогенеза, причем часто прямо противоположно. Например: транскрипционные факторы Notch1 и BMP подавляют нейрогенную дифференцировку, направляя развитие клеток предшественников в глиальный направлении, а фактор Trb2 наоборот – стимулирует нейрогенез. Фактор Shh (sonic hedgehog) и транскрипционные факторы из семейства Sox регулируют процесс пролиферации клеток-предшественников. Эти факторы могут влиять и на другие этапы нейро- и глиогенеза, проходящие в пролиферативных зонах (миграцию нейробластов, образование определенных типов клеток, формирование отростков у нейронов, развитие синаптических связей). Разнообразные ростовые факторы (эпидермальный фактор роста – EGF, трансформирующий фактор роста – TGF α , основной фактор роста фибробластов – bFGF, инсулиноподобный ростовой фактор – IGF1, фактор роста эндотелия – VEGF; интерферон гамма – IFN- γ и др.) также влияют на пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников. Особое место среди сигнальных молекул занимают нейромедиаторы и нейромодуляторы. В настоящее время установлено, что нейроны вскоре после образования из клеток-предшественников и задолго до начала миграции и формирования межнейрональных связей начинают секретировать молекулы нейромедиаторов, которые оказывают существенное влияние на развитие клеток в течение эмбриогенеза, а также в ходе постэмбрионального нейрогенеза. В последнее время особое внимание уделяется роли газообразных посредников (NO, H₂S, CO) в регуляции процессов нейрогенеза в пре- и постнатальном периодах развития ЦНС. Было показано, что они существенно влияют на процесс миграции нейробластов, рост аксонных и дендритных ветвлений, пролиферацию и апоптоз НСК и их потомков в нейрогенных нишах и за их пределами (Пушина и др., 2012; Яковлев, Ситдикова, 2014; Puschina et al., 2011, 2014).

Особо следует отметить, что сами НСК способны синтезировать и секретировать подобные

вещества, действующие в данном случае по типу пара- или аутокринной регуляции.

Организация пролиферативных зон в мозге млекопитающих. Зоны взрослого нейрогенеза у млекопитающих, включая приматов, обнаружены в **субвентрикулярной зоне (SVZ) латеральных мозговых желудочков конечного мозга** и в **субгранулярной зоне (SGZ) зубчатой фации гиппокампа**. Наличие подобных зон в других отделах ЦНС млекопитающих в настоящее время не доказано, а имеющиеся данные носят крайне противоречивый характер. (Ярыгин и др., 2014; Ярыгин, Ярыгин, 2012). **Субвентрикулярная зона (SVZ)** образована несколькими слоями клеток (от двух до пяти), в составе которых выделяют несколько типов клеток. Скорость увеличения числа новых клеток в зубчатой извилине гиппокампа (SGZ) взрослого мозга определяется как 9000 единиц в течение суток, что составляет примерно 6% от общего количества нейронов в зубчатой фации гиппокампа крысы.или около 250 тысяч в месяц. (Cameron, McKay, 2001). Вновь образованные нервные клетки мигрируют на места своей локализации в данной структуре мозга, формируют систему отростков и синапсов и встраиваются в функциональные нейронные сети. Следует отметить, что, хотя факт интеграции новых нейронов в существующие нейронные сети доказан, функциональные аспекты этого процесса во многом еще неясны.

В этом плане весьма интересным является обнаружение подобных пролиферативных зон в разных отделах головного мозга у представителей других групп позвоночных животных (рыб, амфибий, птиц). Взрослый нейрогенез у этих животных идет более интенсивно и дольше, чем у млекопитающих. (Обухов и др., 2015; Puschina et al., 2014; Grandel, Brand, 2013).

Взрослый нейрогенез и перспективы репаративной регенерации нервной ткани. Исследование последствий ишемии мозга показали, что она сопровождается усилением нейрогенеза в пролиферативных зонах и миграцией молодых клеток в зону повреждения. (Гомазков, 2014; Solway et al., 1998). Эти данные вызвали целую серию работ, направленных на изучение возможности использования НСК и их потомков для трансплантации в поврежденный мозг, а также поиска модельных объектов для экспериментальных работ (Григорьян, Кругляков, 2008; Семченко и др., 2012). Одной из удачных моделей явились рыбы разных видов. В серии работ с помощью иммуногистохимического маркирования PCNA (пролиферативного ядерного антигена), ядерного маркера нейрональной дифференцировки (NuCD), транскрипционного фактора Pax6 и серии других маркеров, в разных отделах мозга рыб был идентифицирован ряд пролиферативных зон (ПВЗ), свидетельствующих о наличии постоянного постнатального нейрогенеза в ЦНС рыб. (Обухов и др.,

2015; Zupanc, 2009; Zupanc, Sîrbulescu, 2013; Puschina, Obukhov, 2012; Pushchina et al., 2014 a, b). Однако, в настоящее время неизвестно как этот процесс связан с нейрогенезом во взрослом мозге, и какие элементы матричных зон мозга рыб участвуют в репаративном нейрогенезе.

Были поставлены эксперименты на молодых нескольких видов рыб, которым наносили механическую травму в разные структуры мозга (зрительный нерв, крыша среднего мозга, полушария конечного мозга). При механическом повреждении разных отделов мозга молодых рыб (сетчатки, среднего мозга и мозжечка) было выявлено усиление пролиферативной активности как в традиционных пролиферативных зонах нейрогенеза (перивентрикулярные области), так зафиксировано появление новых нейрогенных участков. Процесс репарации после нанесения механической травмы глаза начинается с апоптоза поврежденных элементов. Апоптотический ответ наблюдается уже через полчаса после нанесения повреждающего воздействия и продолжается до 21 дня после нанесения травмы. Эти данные подтверждены результатами маркирования TUNEL-позитивных фрагментов ДНК в зоне повреждения (зрительного нерва), а также данными электронно-микроскопического анализа. Ультраструктурные изменения ядра свидетельствуют о различных стадиях процесса апоптоза в поврежденных клетках. Апоптоз, как механизм элиминации поврежденных в результате травмы клеток мозга рыб существенно отличается от такового у млекопитающих. У последних, основным способом элиминации поврежденных клеток в зоне травмы является некроз. Апоптоз же затрагивает незначительный объем клеток в прилегающих к травме областях. Наличие некроза в зоне травмы млекопитающих является одной из причин развития последующего вторичного воспаления в зоне повреждения, что в свою очередь вызывает дальнейшее нарастание некротического ответа в области травмы, в результате которого формируются большие полости, лишённые клеток. Эти полости, как правило, ограничены зоной реактивных астроцитов, создающих как механический, так и биохимический барьеры, затрудняющие рост нервных волокон и миграцию клеток в зону повреждения. В отличие от некроза при апоптозе отсутствуют признаки воспалительной реакции, а сами клетки впоследствии уничтожаются с помощью макрофагов/микроглии. Прижизненный мониторинг клеток в зоне повреждения с помощью мультифотонной конфокальной микроскопии показал, что уже через час после повреждающего воздействия наблюдается физиологический ответ со стороны макрофагов и микроглии, которые мигрируют в область нанесения механической травмы и активно участвуют в элиминации поврежденных клеток с помощью фагоцитоза. Дифференцировка кле-

ток в нейрональном направлении, обнаруженная при помощи маркирования клеток антителами против белка HuC/D, происходила в пролиферативных зонах теленцефалона, зрительного тельца, мозжечка и продолговатого мозга форели уже через 2 дня после травмы (Пушина и др., 2016; Puschina et al., 2014).

Таким образом, показано, что после механической травмы в мозге экспериментальных животных источником новых нейронов являются появляющиеся в пролиферативных областях мозга новые зоны индуцированного нейрогенеза: **нейрогенные ниши и участки вторичного нейрогенеза**. (Пушина и др., 2016). Полученные данные послужат основой для дальнейших исследований особенностей постнатального нейрогенеза в ЦНС животных и человека в норме и при патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (МД 4318.2015.04) и Программы фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» (проект № 15-1-6-116).

Список литературы

1. Гомазков О.А. Нейрогенез, как адаптивная функция мозга. – М.: И-т биомедицинской химии, 2014. – 85 с.
2. Григорян А.С., Кругляков П.В. Клеточная терапия при травме мозга // Клет. трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. Т.4, № 1. – С. 35–42.
3. Коржевский Д.Э. Петрова Е.С., Кирик О.В., Безлин Г.В., Сухорукова Е.Г. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток // Клет. трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т.5, № 3. – С. 57–63.
4. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Григорьев И.П., Сухорукова Е.Г. Сырцова М.А. Маркирование дифференцирующихся нервных клеток при изучении развития и патологии головного мозга // Вопросы морфологии XXI века. – 2015. – Вып. 4. – С. 34–36.
5. Обухов Д.К., Пушина Е.В. Радиальная глия – как источник новых нейронов в постнатальном развитии ЦНС // Межд. журн. exper. обр. – 2011. – № 6. – С. 10–11.
6. Обухов Д. К., Пушина Е. В., Вараксин А. А. Структура пролиферативных зон в ЦНС взрослых позвоночных животных // Вопросы морфологии XXI века. – 2015. – Вып. 4. – С. 43–51.
7. Полежаев Л.В., Александрова М.А., Витвицкий В.Н. Трансплантация ткани мозга в биологии и медицине. – М.: Наука, 1993. – 239 с.
8. Пушина Е.В., Вараксин А.А., Обухов Д.К. Газообразные посредники в головном мозге симы // Журн.эвол. физиол. и биох. – 2012. – Т. 48. – С. 85–96.
9. Пушина Е.В., Вараксин А.А., Обухов Д.К. Репаративный нейрогенез в мозге и изменения в зрительном нерве взрослой форели после механического повреждения глаза // Онтогенез. – 2016. – Т. 47, № 1. – С. 1–24.
10. Семченко В.В., Еринеев С.И., Степанов С.С. Сергиенко Г.Г. Трансплантация незрелой нервной ткани в экспериментальной и клинической неврологии. – Омск: Омский дом печати, 2000. – 340 с.
11. Семченко В.В. и др., Регенеративная биология и медицина. Книга I. Генные технологии и клонирование / под ред. В.П. Пузырева и др. – Омск. 2012. – 296 с.
12. Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф. Физиологическая роль сероводорода в нервной системе // Гены и клетки. – 2014. – Т.9, № 3. – С. 34–44.
13. Ярыгин К.Н., Ярыгин В.Н. Нейрогенез в центральной нервной системе и перспективы регенеративной неврологии // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2012. – Т. 112, № 1. – С. 4–13.
14. Ярыгин К.Н. и др., Регенеративная биология и медицина Книга II. Клеточные технологии в терапии болезней нервной системы / под ред. В.Н. Ярыгина и др. – Екатеринбург-Омск, 2015. – 360 с.

15. Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus // *J Comp Neurol.* – 2001. – Vol. 435. – P. 406–417.
16. Grandel H, Brand M. Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates // *Dev. Genes Evol.* – 2013. – Vol. 223. – P. 131–147.
17. Pinto L., Götz M. Radial glial cell heterogeneity—The source of diverse progeny in the CNS // *Progress in Neurobiology.* – 2007. – Vol. 83. – P. 2–23.
18. Pushchina E.V., Obukhov D.K., Varaksin A.A., Shukla S. Neurochemical signaling and participation of H₂S and NO in fishes adult neurogenesis // *Nitric Oxide.* – 2014. – Vol. 39 (Suppl). – P. 41–43.
19. Pushchina E.V., Obukhov D.K., Varaksin A.A. Structure, chemoarchitectonics and postembryonic histogenesis of a central nervous system in a teleost fish // In book: *Teleosts: Evolutionary Development, Diversity and Behavioral Ecology* / Ed. Carone S. New York: – Nova Science Publishers Inc. – USA, 2014. – Ch. 5. – P. 97–152.
20. Pushchina E. V., Varaksin A. A., Obukhov D. K. Participation of neurochemical signaling in adult neurogenesis and differentiation // In book: *Neurochemistry* (ed. Th.Heinboocken). 2014. – Intech Corp. USA. Ch.8. – P. 225–255.
21. Pushchina E. V., Varaksin A. A., Obukhov D. K. Cystathionine β-Synthase in the CNS of Masu Salmon *Oncorhynchus masou* (Salmonidae) and Carp *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) // *Neurochemical Journal.* – 2011. – Vol. 5. – P. 24–34.
22. Pushchina E.V., Obukhov D.K. Is the brain of cherris salmon a new model for investigation of postembryonic neurogenesis? // *Engineering. Supplement.* – 2012. – P. 76–79.
23. Solway L., Messing K., Sharp F.R. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. // *J. Neurosci.* – 1998. – Vol. 18(19). – P. 7768–7778.
24. Zupanc G Towards brain repair: insights from teleost fish // *Seminars in Cell & Developmental Biology.* – 2009. – Vol. 20. – P. 683–690.
25. Zupanc G.K.H., Sîrbulescu R.F. Teleost Fish as a Model System to Study Successful Regeneration of the Central Nervous System // *Current Topics in Microbiology and Immunology.* – 2013. – Vol. 367. – P. 193–233.

РЕПРОДУКТИВНЫЕ УСТАНОВКИ СТУДЕНТОК

¹Осыкина А.С., ¹Шкатова Е.Ю.,
²Еловикова О.Н.

¹ГБОУ ВПО «Ижевская государственная
медицинская академия Министерства
здравоохранения и социального развития РФ»,
Ижевск, e-mail: artyu@igta.udm.ru;

²Южный отдел Центрального территориального
управления по организации медицинской помощи
населению Министерства здравоохранения
Пермского края, Чайковский,
e-mail: olga-elovikova@yandex.ru

Введение. В современном мире, в связи с явлением акселерации, меняется репродуктивное поведение девушек. В настоящее время у них велика приверженность к курению, употреблению алкоголя, раннему началу половой жизни на фоне низкого уровня знаний о контрацепции и профилактике заболеваний, передающихся половым путем [1]. Первая беременность у 24,0% женщин наступает в ювенильном возрасте, ее исходом у 18,4% юных женщин является деторождение, в 81,6% – аборт [2]. Именно поэтому большое внимание уделяется сексуальному образованию с предоставлением молодому поколению достоверной и научно-обоснованной информации по воспитанию позитивных установок и ценностей (самоуважения,

открытости) [3]. В США и Европе создаются программы сексуального образования, направленные на воздержание, ознакомление с практиками «безопасного секса», включающее не только физические аспекты сексуальности, но и понятия дружбы, чувства уверенности в себе и привлекательности [3].

Цель исследования – оценить репродуктивные установки студенток вузов Удмуртии.

Материал и методы. В программе исследования участвовали 469 студенток: Ижевской государственной медицинской академии, Удмуртского государственного университета, Ижевского государственного технического университета в возрасте от 18 до 26 лет. Средний возраст респонденток составил $20,1 \pm 0,2$ года. Изучение репродуктивных установок проводилось по специально разработанной социально-гигиенической анкете, включающей вопросы отношений с противоположным полом, готовности к созданию семьи, планируемого количества детей, желаемой помощи при рождении ребенка во время обучения в вузе. Опрос проводили с информированного согласия респонденток при соблюдении этических норм.

Математический аппарат включал традиционные методики: вычисление относительных (Р) и средних величин (М) с определением их ошибок ($\pm m$). Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с использованием программ *MS Excel 7.0* и *Statistica 6.0*.

Результаты исследования. Большинство $76,8 \pm 2,7$ из 100 респонденток родились в малодетных семьях: в семьях с двумя детьми – $51,1 \pm 3,2$, были единственным ребенком – $25,7 \pm 2,8$ опрошенных. В многодетных семьях выросла четверть ($23,2 \pm 2,7\%$) студенток. Вероятно, учитывая опыт родителей, $58,2 \pm 2,3$ из 100 девушек планируют рождение в своих семьях двоих детей, и только $28,6 \pm 2,1$ – троих. Наименее популярны установки на рождение одного ребенка ($8,5 \pm 1,3$), четверых и более детей ($4,7 \pm 1,0$). Имели опыт сексуальных отношений с одним партнером $31,9 \pm 2,3$ из 100 девушек, с двумя – $11,4 \pm 1,6$. У каждой шестой ($17,8 \pm 2,9$) студентки было от 3 до 7 партнеров. Каждая десятая ($11,73 \pm 2,4$) в анамнезе отметила искусственное прерывание беременности.

Треть студенток ($36,3 \pm 2,9$) хотела бы создать семью и родить ребенка во время обучения в вузе. Большинство опрошенных считают, что брак обязательно должен быть зарегистрирован органами ЗАГСа ($63,3 \pm 3,1$), треть ($28,7 \pm 2,9$) видят незарегистрированный брак, как этап, предшествующий регистрации отношений, согласны на сожительство – $8,1 \pm 1,8$. При рождении ребенка во время обучения каждая пятая ($22,7 \pm 1,9\%$) студентка хотела бы получать дополнительную материальную, психологическую и социальную поддержку от вуза. Главным условием рождения ребенка во время обучения