

МОЛЕКУЛЯРНАЯ НЕЙРОМОРФОЛОГИЯ

Нейродегенерация и оценка реакции нервных клеток на повреждение

Под редакцией Д. Э. Коржевского

Санкт-Петербург
СпецЛит
2015

УДК 576.08
М75

Рецензент:

Иванов Игорь Николаевич — доктор медицинских наук, профессор кафедры судебной медицины ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И. И. Мечникова

Молекулярная нейроморфология. Нейродегенерация М75 и оценка реакции нервных клеток на повреждение / Д. Э. Коржевский, И. П. Григорьев, Е. А. Колос [и др.] ; под ред. Д. Э. Коржевского. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2015. — 110 с. : ил. — ISBN 978-5-299-00752-7

В книге в краткой и доступной форме изложен материал, касающийся проблемы морфологической оценки повреждения нервных клеток и выявления молекулярных маркеров нейродегенерации. Эта проблема приобретает особую актуальность при проведении диагностических исследований с использованием современных иммуноцитохимических подходов, преимущества и недостатки которых еще не отражены должным образом в специальной литературе.

В работе представлены новые данные о молекулярных механизмах гибели клеток и ранних цитохимических признаках нейродегенерации. Детально рассмотрены и изменения нервных клеток, которые могут быть зарегистрированы при использовании классической нейростологической методики — окраски по Нисслю. Обращено внимание на артефакты и возможные ошибки в трактовке результатов, полученных при использовании различных методов исследования органов нервной системы. В главах 5 и 6 представлены подробные описания современных иммуноцитохимических методик, применяемых при экспериментальном моделировании и при диагностике нейродегенеративных заболеваний.

Издание адресовано широкому кругу специалистов, использующих морфологические подходы при оценке состояния органов нервной системы как в клинике, так и при проведении экспериментальных исследований (неврологам, нейробиологам, фармакологам, патологоанатомам, судебно-медицинским экспертам).

Издание подготовлено при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00014).

УДК 576.08

ISBN 978-5-299-00752-7

© ООО «Издательство “СпецЛит”», 2015
© Д. Э. Коржевский, И. П. Григорьев,
Е. А. Колос [и др.], 2015

Коллектив авторов

Коржевский Дмитрий Эдуардович — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины (ФГБНУ «ИЭМ»);

Григорьев Игорь Павлович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Колос Елена Андреевна — младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Сухорукова Елена Геннадьевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Кирик Ольга Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Алексеева Ольга Сергеевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН);

Гусельникова Валерия Владимировна — аспирант кафедры цитологии и гистологии биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета (СПбГУ)

*Посвящается 125-летию
со дня основания
Императорского Института
экспериментальной медицины*

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	8
<i>Литература</i>	10
Глава 1. Современные взгляды на гибель клеток (молекулярные механизмы и морфологические проявления)	
<i>(Коржевский Д. Э., Колос Е. А.)</i>	11
1.1. Краткая история изучения вопроса о клеточной гибели	11
1.2. Морфологическая классификация типов клеточной гибели	14
1.3. Биохимическая классификация типов клеточной гибели.	19
1.4. Рекомендации по использованию терминологии, относящейся к клеточной гибели.	25
<i>Литература</i>	27
Глава 2. Признаки повреждения нервной клетки	
<i>(Коржевский Д. Э., Григорьев И. П.)</i>	30
2.1. Техника окраски по методу Ниссля	31
2.2. Оценка результатов окраски	34
2.3. Морфологические изменения ядра и ядрышка нервной клетки	36
2.4. Изменения цитоплазмы нервных клеток, выявляемые при окраске основными анилиновыми красителями по методу Ниссля	38
<i>Литература</i>	41
Глава 3. Нейромеланин (<i>Сухорукова Е. Г., Алексеева О. С., Коржевский Д. Э.</i>)	42
3.1. Структура и биосинтез нейромеланина	43
3.2. Функциональная роль нейромеланина	44
<i>Литература</i>	46
Глава 4. Внутриядерные и цитоплазматические включения нервных клеток (<i>Григорьев И. П., Коржевский Д. Э.</i>)	50
4.1. Тельца Маринеско — распространенность, структура и состав.	50
4.2. Тельца Маринеско при патологии.	54
4.3. Внутриядерные палочковидные включения (тельца Ронкорони)	57
4.4. Тельца Леви	58
4.5. Тельца Буниной — включения, характерные для бокового амиотрофического склероза	61
4.6. Тельца Пика	62
4.7. Другие включения, характерные для нейродегенеративных заболеваний	63
<i>Литература</i>	66

Глава 5. Использование реакции на ядерный белок NeuN для выявления повреждения нервной клетки (Коржевский Д. Э., Алексеева О. С., Гусельникова В. В., Кирик О. В.)	72
5.1. Предполагаемые функции белка NeuN	72
5.2. Использование реакции на NeuN в нейрофизиологических исследованиях	75
5.3. Особенности пробоподготовки и постановки реакции на белок NeuN	79
<i>Литература</i>	84
Глава 6. Дополнительные гистологические и иммуноцитохимические методы, используемые при изучении нейродегенерации (Сухорукова Е. Г., Григорьев И. П., Кирик О. В., Коржевский Д. Э.)	87
6.1. Окраска по методу Клювера — Барреры	87
6.2. Реакция на α -тубулин	88
6.3. Выявление нейрофиламентов	90
6.4. Реакция на τ -белок	92
6.5. Выявление синуклеинов	95
6.6. Окраска бета-амилоида	98
6.7. Выявление включений, содержащих убиквитин	101
6.8. Метод одновременной окраски амилоидных телец и астроцитов	104
<i>Литература</i>	106

ВВЕДЕНИЕ

Проблема нейродегенеративных заболеваний имеет огромное значение не только как чисто медицинская, но и как большая проблема экономического характера. Число пожилых пациентов, страдающих нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорея Гентингтона, боковой амиотрофический склероз и другими, неуклонно растет во всем мире. Так, например, число страдающих болезнью Альцгеймера в мире составляло 35,6 млн в 2010 г. По расчетам, их число должно возрасти к 2030 г. до 65,7 млн чел., к 2050 г. — до 115,4 млн (Pouryamout L. [et al.], 2012). Соответственно, растут и расходы, связанные с лечением и уходом за больными старческой деменцией. В 2010 г. расходы, связанные с этим заболеванием, составляли в мире 604 млрд долл. (Ibid.). В США 5,4 млн чел. страдают болезнью Альцгеймера и, по расчетам, в ближайшие 40 лет число их утроится, достигнув 14,5 млн чел. (Lopez O. L., 2011).

Второе после болезни Альцгеймера по распространенности нейродегенеративное заболевание — это болезнь Паркинсона, которая диагностирована в США у 630 тыс. чел. в 2010 г. Национальные экономические потери от этого заболевания превышают 14,4 млрд долл., без учета не прямых потерь (снижение занятости), которые оцениваются в 6,3 млрд долл. в 2010 г. (Kowal S. L. [et al.], 2013).

Рост заболеваемости болезнями, в основе которых лежит нейродегенеративный процесс, заставляет искать новые пути профилактики и лечения этой патологии нервной системы. Однако следует признать, что успехи в этом направлении не настолько значительны, как можно было бы ожидать. В первую очередь это связано с недостаточным пониманием причин, инициирующих начало нейродегенеративного процесса. Отсутствие необходимых знаний об этиологии и патогенезе заболеваний не позволяет добиться успеха в разработке адекватных биологических моделей для нейродегенеративных процессов, не имеющих четко установленной генетической обусловленности. Все это ведет к необходимости разработки новых экспериментальных подходов, которые позволили бы на клеточном и молекулярном уровне проследить

всю последовательность событий, ведущих к необратимому повреждению нервных клеток и блокировке тканевых репарационных механизмов в нервной системе.

В большинстве экспериментальных и клинических исследований для оценки нейродегенерации используются методы определения ранних структурных и молекулярных изменений в пораженных участках мозга. От адекватного использования нейроморфологических методов и правильной интерпретации полученных данных во многом зависит результативность научной работы и точность клинико-морфологической диагностики. Применение нейроморфологических методов и корректная интерпретация их результатов всегда представляли значительные сложности. Поэтому и существовала всегда потребность в руководствах, содержащих данные о новых методах изучения структур нервной системы, их технических особенностях, преимуществах и недостатках.

В отечественной научной литературе существуют две уникальные книги, написанные сотрудниками Института экспериментальной медицины АМН СССР — «Нормальная и патологическая морфология нейрона» — автор Юлий Михайлович Жаботинский, заведующий лабораторией патологии нервной системы, и «Источники ошибок при морфологических исследованиях» — он же в соавторстве с Михаилом Валентиновичем Войно-Ясенецким, заведующим отделом патологической анатомии. Первая из этих книг вышла в свет ровно 50 лет назад (Жаботинский Ю. М., 1965), а вторая — спустя пять лет после первой (Войно-Ясенецкий М. В., Жаботинский Ю. М., 1970). В них содержатся бесценные для начинающего нейроморфолога сведения об использовании классических нейрогистологических методов и об опасностях, которые подстерегают недостаточно опытного исследователя при интерпретации полученных данных. Эти книги не потеряли своего значения и сейчас. Однако методическая база в нейробиологии за прошедшие годы развивалась стремительно. Методы иммуноцитохимии из разряда раритетных и дискуссионных (в плане специфичности) давно перешли в группу рутинных. Современные методы флуоресцентной микроскопии позволили преодолеть дифракционный барьер. Знания о молекулярных механизмах, определяющих запуск и реализацию программы клеточной гибели, с каждым годом увеличиваются и усложняются. Все это побудило авторов к написанию данной работы, цель которой состоит в освещении ряда сложных вопросов, связанных с морфологической оценкой функционально-

го состояния нервных клеток как в условиях нормального функционирования, так и при развитии нейродегенеративного процесса.

При подготовке данной книги был использован многолетний опыт сотрудников лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины (ранее — Императорского Института экспериментальной медицины, ИЭМ АМН СССР, НИИЭМ СЗО РАМН). Особое внимание уделено структурным и цитохимическим изменениям ядра и цитоплазмы нервной клетки, наблюдаемым при реакции на повреждающие воздействия. Наряду с классическими нейрогистологическими методами в последней главе представлены сведения, необходимые для освоения современных иммуноцитохимических способов определения молекулярных маркеров нейродегенерации.

Научные исследования авторского коллектива, результаты которых представлены в этой книге, выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00014).

Литература

Войно-Ясенецкий М. В., Жаботинский Ю. М. Источники ошибок при морфологических исследованиях. — Л. : Медицина, 1970. — 319 с.

Жаботинский Ю. М. Нормальная и патологическая морфология нейрона. — Л. : Медицина, 1965. — 329 с.

Pouryamatout L., Dams J., Wasem J. [et al.]. Economic evaluation of treatment options in patients with Alzheimer's disease: a systematic review of cost-effectiveness analyses // *Drugs*. — 2012. — Vol. 72. — № 6. — P. 789—802.

Lopez O. L. The growing burden of Alzheimer's disease // *Am. J. Manag. Care*. — 2011. — Suppl. 13. — P. 339—345.

Kowal S. L., Dall T. M., Chakrabarti R. [et al.]. The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States // *Mov. Disord.* — 2013. — Vol. 28. — № 3. — P. 311—318.

СОВРЕМЕННЫЕ ВЗГЛЯДЫ НА ГИБЕЛЬ КЛЕТОК (молекулярные механизмы и морфологические проявления) (Д. Э. Коржевский, Е. А. Колос)

При развитии процесса нейродегенерации происходит гибель преимущественно нервных клеток и активация глиального компонента нервной ткани. Вопрос о том, каким образом гибнут клетки при нейродегенеративных заболеваниях, издавна привлекал внимание исследователей, поскольку в понимании причин повреждения и гибели нейронов лежит ключ к решению проблемы выяснения этиологических факторов нейродегенерации. Очевидно, что подавляющее большинство нейронов при развитии нейродегенеративного процесса погибает не от прямого воздействия летального фактора (хотя действие подобных факторов на начальных этапах нейродегенеративного процесса не исключено), а в результате постепенного истощения защитных механизмов и активации программы самоуничтожения. Поэтому для нейроморфолога важно не только зарегистрировать повреждение нервной клетки, но и оценить состояние ее репаративного потенциала.

Проблема выяснения причины и правильной оценки механизмов гибели клеток не является сугубо нейробиологической проблемой. В той или иной степени она затрагивает все области биологии и медицины. Поэтому в данной главе будут рассмотрены общие вопросы, связанные с классификацией типов клеточной гибели и особенностями различных механизмов самоликвидации жизнеспособных и поврежденных клеток в организме млекопитающих и человека. Во многом современные достижения по анализу механизмов клеточной гибели применимы и к нейронам, однако для гибели нервных клеток характерны и некоторые своеобразные черты. Типичные морфологические проявления повреждения и гибели нейронов будут рассмотрены в следующих главах.

1.1. Краткая история изучения вопроса о клеточной гибели

Первые исследования необратимых деструктивных изменений, происходящих в клетках, начали проводиться вскоре после разра-

ботки клеточной теории М. Schleiden, Т. Schwann (1838). В 1842 г. С. Vogt впервые описал процесс клеточной гибели при метаморфозе амфибий. Вскоре при исследовании клеточной гибели в нервной системе R. Virchow (1858) выделил два типа дегенеративных процессов: пассивный «некроз» и активный процесс уничтожения клеток в «живущих тканях» — «некробиоз» (Clarke P. G., 2012). Классификация Р. Вирхова в определенной мере соответствует современным представлениям о некрозе и апоптозе.

В 1885 г. W. Flemming впервые описал характерные для апоптоза изменения ядра и цитоплазмы гранулезных (фолликулярных) клеток яичников, назвав данный процесс «хроматолизом». Несмотря на столь ранний интерес к вопросам клеточной гибели, первые специальные работы, касающиеся детального анализа этого процесса и его классификации, относятся ко второй половине XX в. J. F. Kerr [et al.] (1972) выделили две формы клеточной гибели: апоптоз (запрограммированная гибель клеток) и некроз — акцидентальная и незапрограммированная гибель клеток. В 1973 г. J. U. Schwichel и Н. J. Merker описали три основных варианта клеточной смерти: гибель, ассоциированная с гетерофагией, аутофагией, и гибель, не связанная с этими процессами. Эти формы соответствуют ныне известным понятиям: апоптоз, аутофагия и некроз (Schweichel J. U., Merker H. J., 1973; Galluzzi L. [et al.], 2012). В 1990 г. P. G. Clarke предложил классификацию, актуальную до настоящего времени. Им было определено три типа клеточной гибели: I — апоптоз, II — аутофагия, III — нелизосомальная клеточная гибель — тип, который соответствует в общих чертах известному понятию «некроз» (Clarke P. G., 1990). Лишь в 2005 г. Номенклатурным комитетом по клеточной гибели (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) была рекомендована классификация, в которой кроме трех классических типов клеточной смерти охарактеризованы некоторые новые варианты гибели клеток. Также были предложены критерии, которые позволяют определить, какую клетку следует считать погибшей и к какому типу относится регистрируемая гибель клетки. Согласно выработанным правилам клетка может считаться мертвой в случае выявления любого из трех морфологических и молекулярных критериев: потери целостности цитоплазматической мембраны, полной фрагментации клетки (в том числе ее ядра) с формированием отдельных апоптозных телец (см. цв. вклейку, рис. 1) и поглощения погибшей клетки (или ее фрагментов) другой клеткой (Kroemer G. [et al.], 2005).

В основу современной классификации клеточной гибели положены морфологические проявления гибели клетки (апоптоз,

некроз, аутофагия, митотическая катастрофа), молекулярные (биохимические) критерии (внутриклеточные процессы, протекающие с участием или без участия различных протеаз и нуклеаз), функциональные аспекты (регулируемая или акцидентальная гибель, физиологическая или патологическая) и иммунологическая характеристика процесса (иммуногенная и неиммуногенная клеточная смерть).

Данные о механизмах клеточной гибели весьма многообразны и отчасти противоречивы. Тем не менее все варианты клеточной гибели укладываются в две основные неперекрывающиеся группы: **регулируемая клеточная гибель** и **акцидентальная (случайная) клеточная гибель** (Galluzzi L. [et al.], 2015). Случайная гибель клеток происходит в результате физических (повышенная температура, высокое давление), химических (экстремальные колебания уровня pH) и механических повреждающих факторов. Такой тип клеточной гибели протекает немедленно и нечувствителен к фармакологическим и генетическим вмешательствам. Понятие «акцидентальная клеточная гибель» близко к более широко используемому понятию «некроз».

Регулируемая клеточная гибель подразумевает реализацию генетически закодированного молекулярного механизма гибели клеток и может модулироваться посредством фармакологических или генетических воздействий. Регулируемая гибель происходит в период эмбрионального развития, иммунного ответа и при других физиологических процессах. Такие случаи клеточной смерти, как правило, называют программируемой (запрограммированной) гибелью клеток. В общем плане этот вариант клеточной гибели близок к группе вариантов объединяемых термином «апоптоз».

В соответствии с последующими рекомендациями NCCD (Kroemer G. [et al.], 2009) для точного определения типа клеточной смерти необходимо использовать морфологические методы, в первую очередь электронную микроскопию. Рекомендуется рациональное сочетание по крайней мере двух методов исследования: метода визуализации морфологических изменений и метода, направленного на определение биохимических внутриклеточных изменений. В дальнейшем NCCD пересмотрел свои рекомендации в пользу биохимических методов диагностики типов клеточной гибели (Galluzzi L. [et al.], 2012).

Для того чтобы внести ясность в понимание современного состояния вопроса о классификации типов клеточной гибели, следует заметить, что морфологические признаки гибели клетки хо-

рошо поддаются систематизации, но не всегда однотипно воспроизводятся при реализации конкретных биохимических программ клеточной гибели. Поэтому для морфолога наиболее важными являются критерии, которые позволили бы четко разграничить регулируемую и акцидентальную клеточную гибель. Более детальное разграничение вариантов регулируемой клеточной гибели выходит за рамки компетенции морфолога, за исключением тех типов клеточной гибели, которые имеют однозначно определяемые специфические морфологические признаки. Существенная терминологическая проблема заключается в том, что рекомендации Номенклатурного комитета по клеточной гибели не обязательны для всех исследователей. Кроме того, они не лишены недостатков и противоречий. К сожалению, NCCD мало внимания уделяет вопросам нейродегенерации, поэтому специфика гибели нервных клеток не достаточно полно отражена в опубликованных рекомендациях.

1.2. Морфологическая классификация типов клеточной гибели

Очень важным для корректной оценки признаков повреждения и дезинтеграции клеток является понимание современных принципов морфологической классификации вариантов клеточной гибели. Большинство биохимических разновидностей акцидентальной и регулируемой клеточной гибели укладываются в рассмотренные далее четыре морфологических типа.

1. **Апоптоз.** Термин введен в 1972 г. J. F. Kerr [et al.] (1972). Эта форма клеточной смерти была отождествлена с ранее описанной программированной гибелью клеток: разница в обозначениях отражает способы идентификации гибели — морфологический и биохимический. Несмотря на критику, использование двух терминов как равнозначных сохраняется до настоящего времени. Однако G. Kroemer [et al.] (2009) отмечают, что термины «программируемая гибель клеток» и «апоптоз» не являются синонимичными, так как гибель клеток, происходящая во время физиологического развития, может протекать и без морфологических признаков апоптоза.

Апоптоз — энергозависимый тип клеточной гибели, сопровождающийся округлением клеток, втягиванием отростков, потерей микроворсинок, утратой складчатости цитоплазматической мембраны (ЦПМ), конденсацией хроматина, фрагментацией ДНК и распадом ядра (кариорексис), выпячиванием участков наружной цитоплаз-

матической мембраны (блеббинг), которое нередко заканчивается образованием мембранных микрочастиц. Характерно поддержание целостности ЦПМ до поздних стадий процесса, уменьшение клетки в объеме и ее последующая фрагментация на мембранные везикулы с внутриклеточным содержимым, так называемые апоптотические тельца, фагоцитируемые в дальнейшем макрофагами и клетками-соседями. Термин «апоптоз» рекомендуется применять исключительно в случае выявления нескольких из перечисленных морфологических особенностей (Kroemer G. [et al.], 2009).

При иммуногистохимических исследованиях наиболее часто используют маркеры апоптоза — белки семейства bcl, которые относятся к индукторам апоптоза (Bad, Bax, Bak) или к ингибиторам апоптоза (Bcl-2, Bcl-XL) (Маркова А. А. [и др.], 2012). Также часто применяют антитела к белку p53, расщепленному (cleaved) цитокератину-18 (C-CK18), расщепленной (активированной) каспазе-3, каспазе-1 и -7, расщепленному ламину А (C-LAM-A), фосфорилированному гистону H2AX (gammaH2AX), расщепленной поли(АДФ-рибоза)-полимеразе (PARP-C), фактору, индуцирующему апоптоз (AIF). Кроме того, для определения апоптоза применяют способ выявления участков связывания аннексина V (Holubec H. [et al.], 2005; Bressenot A. [et al.], 2009; Madeo F. [et al.], 1997).

2. На основании морфологических особенностей **аутофагическая гибель** в настоящее время выделяется в качестве второго типа запрограммированной гибели клеток. Данный тип клеточной гибели проявляется деградацией органелл и цитоплазматического материала, которая происходит при участии внутриклеточных мембранных структур.

При аутофагии *de novo* формируются специализированные структуры — аутофагосомы. Это двухмембранные образования, окружающие клеточные органеллы или часть цитозоля, подлежащие разрушению. При слиянии аутофагосом с лизосомами образуются аутофаголизосомы. Процесс аутофагии стимулируют отсутствие факторов роста, наличие в цитоплазме поврежденных органелл, в клеточных культурах — возникновение монослоя и существование контактного торможения. Аутофагия как механизм реутилизации внутриклеточных структур при неблагоприятных условиях может способствовать выживанию клеток. В некоторых патологических ситуациях гиперактивация аутофагии может вызывать специфическую форму клеточной смерти — аутофагическую клеточную гибель. Таким образом, понятия «аутофагия» и «аутофагическая гибель» не идентичны.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ НЕЙРОМОРФОЛОГИЯ

Нейродегенерация и оценка реакции нервных клеток на повреждение

Под редакцией Д. Э. Коржевского

Редактор *Е. Г. Закревская*

Корректор *Т. А. Дич*

Дизайн и компьютерная верстка *И. Ю. Илюхиной*

Подписано в печать 20.10.2015. Формат 60 × 80^{1/16}.

Печ. л. 7 + 0,75 л. цв. вкл. Тираж 500 экз. Заказ №

ООО «Издательство „СпецЛит“».

190103, Санкт-Петербург, 10-я Красноармейская ул., 15,

тел./факс: (812) 495-36-09, 495-36-12,

<http://www.speclit.spb.ru>.

Отпечатано в типографии «L-PRINT»,

192007, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 201, лит А, пом. 3Н.

ISBN 978-5-299-00752-7



9 785299 007527