

Динамика структурных компонентов аксоплазмы, транспортируемых медленным и быстрым аксональным током в нервных волокнах пульпы в процессе органогенеза зубов

Чучкова Н.Н., Полякова О.Л., Чучков В.М., Сметанина М.В.

Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, г. Ижевск

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)», г. Москва

Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск

Цель исследования – выявить динамику количества органелл, транспортируемых медленным и быстрым аксональным транспортом в нервных волокнах пульпы в процессе прорезывания постоянных зубов (5-14 лет). **Материал и методы.** Проведено морфометрическое электронно-микроскопическое исследование органелл аксоплазмы в нервных проводниках (НВ) пульпы зубов, транспортируемых быстрым (митохондрии и везикулы) и медленным (нейрофиламенты) аксональным током в процессе прорезывания постоянных зубов. **Результаты.** В процессе органогенеза за период от 5 до 14 лет в НВ пульпы повышалось количество нейровезикул в безмиелиновых НВ в 2,27 раза ($p < 0,05$), в миелиновых НВ – в 2,0 раза ($p < 0,05$), темпы прироста между годами невелики – не более 10%. Число митохондрий в 1 $\mu\text{м}^2$ аксоплазмы повышалось в 1,77 раза в безмиелиновых, и 1,85 раза в миелиновых НВ ($p < 0,05$). Общий ежегодный прирост митохондрий составлял в среднем 5-10%. Увеличение количества нейрофиламентов в пульпе за период органогенеза наблюдалось только в возрасте 13-14 лет (на 10,8% в миелиновых, и на 12,3% в безмиелиновых НВ). **Заключение.** Процесс прорезывания постоянных зубов сопровождается постепенным и значимым увеличением количества органелл, входящих в состав нервных волокон пульпы, транспортируемых быстрым аксональным током, тогда как изменение числа нейрофиламентов, транспорт которых происходит с медленным аксональным током, увеличивается только в подростковом периоде, являясь наиболее стабильным структурным элементом аксоплазмы в процессе органогенеза.

Ключевые слова: безмиелиновые и миелиновые нервные проводники, пульпа зуба, органеллы, аксональный транспорт

Dynamics of the structural components of the axoplasm transported by slow and fast axonal current in the nerve fibers of the pulp during the organogenesis of teeth

Chuchkova N.N., Polyakova O.L., Chuchkov V.M., Smetanina M.V.

The **aim** of the study is to identify the dynamics of the number of organelles transported by slow and fast axonal transport in the nerve fibers of the pulp during the eruption of permanent teeth (5-14 years). **Material and methods.** Morphometric electron microscopic examination of axoplasmic organelles in the nerve conductors (NC) of dental pulp transported by fast (mitochondria and vesicles) and slow (neurofilaments) axonal current during the eruption of permanent teeth was carried out. **Results.** In the process of organogenesis, over a period of 5 to 14 years, the number of neurovesicles in myelin-free NC increased 2.27 times ($p < 0.05$), in myelin NC – 2.0 times ($p < 0.05$), the growth rate between the years is small – no more than 10%. The number of mitochondria in 1 mm² of axoplasm increased by 1.77 times in myelin-free, and 1.85 times in myelin NC ($p < 0.05$). The total annual growth of mitochondria averaged 5-10%. An increase in the number of neurofilaments in the pulp during the period of organogenesis was observed only at the age of 13-14 years (by 10.8% in myelin, and by 12.3% in myelin-free NC). **Conclusion.** The process of eruption of permanent teeth is accompanied by a gradual and significant increase in the number of organelles that make up the nerve conductors of the pulp transported by a fast axonal transport, whereas the change in the number of neurofilaments, the transport of which occurs with a slow axonal transport, increases only in adolescence, being the most stable structural element of the axoplasm in the process of organogenesis.

Keywords: myelin and myelin-free nerve conductors, tooth pulp, organelles, axonal transport

Прорезывание зубов человека – уникальный вариант органогенеза, происходящий и продолжающийся и в отдалённые сроки после рождения индивида [3]. Структурно-функциональная целостность пульпы обеспечивается ее полноценной иннервацией. По морфологическому строению пульпа представлена рыхлой соединительной тканью, которая содержит много клеток, межклеточного вещества, кровеносных сосудов и нервных волокон (НВ). Взаимодействия между НВ и их тканями-мишенями формируют основу для функциональной связи с центральной нервной системой. В процессе развития НВ и клетками пульпы существует тесная взаимосвязь и взаимовлияние [6, 10]. Правильное функционирование нейронов в значительной степени зависит от эффективного транспорта грузов по аксону. Наиболее уникальными морфологическими особенностями нейронов по сравнению с другими типами клеток являются их крайняя полярность и длинные аксоны [10]. Для оптимальной функции нейронов и гомеостаза различные грузы непрерывно транспортируются между сомой клетки и ее периферией. Митохондрии, везикулы, мРНК и различные факторы роста транспортируются посредством

быстрого аксонального транспорта, тогда как такие структуры, как нейрофиламенты, тубулин и цитозольные белки, транспортируются с более медленной скоростью [5, 8, 10].

Цель выявить динамику количества органелл, транспортируемых медленным и быстрым аксональным транспортом в нервных волокнах пульпы в процессе прорезывания постоянных зубов

Материалы и методы. В период прорезывания постоянных зубов (возраст от 5 до 14 лет) исследовали сосудисто-нервные пучки пульпы зубов, удаленных по медицинским показаниям. Забор зубов осуществляли с личного согласия обследуемого ребёнка и по письменному согласию его родителей (на основании приказа ФЗ «Основные законодательства РФ об охране здоровья граждан от 22.03.1993г.: информированность, конфиденциальность, безопасность, добровольность). Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (аппликационный №391 от 05.11.2013 г.). В каждой возрастной группе для изготовления гистологических препаратов использовали материал от 4-х удалённых постоянных зубов. Для электронномикроскопического исследования препараты пульпы фиксировали в 2,5% глутаральдегиде с дофиксацией по методике G. Millonig (1962). После промывки, обезжиривания в спиртах и ацетоне восходящей концентрации заключали в смесь смол эпон-аралдит. Срезы изучались в электронном микроскопе «НУ-7А». Фотографировали 10 случайно выбранных полей зрения, ультраструктурометрию проводили при стандартном увеличении 40 000. На 1мкм^2 подсчитывали количество нейрофиламентов, везикулярных элементов, митохондрий в миелиновых и безмиелиновых нервных волокнах. При подсчете учитывали диаметр нервных волокон (мкм): малый диаметр – до 0,2, средний – 0,21-0,6, большой – более 6 мкм.

В работе использовался статистический метод с применением программ «Statistica 10.0» с определением средней арифметической (M), ее ошибки (m). Результаты исследования были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Shapiro-Wilk's. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. В нервах пульпы у детей раннего и 1 детства преобладали волокна малого диаметра: $63,7 \pm 1\%$ и $57,6 \pm 8,1\%$, соответственно, для школьного и подросткового периода (8 – 14 лет) было характерно разнообразие форм и размеров нервных волокон: малого, среднего и больших диаметров, но всё же с преимуществом нервов большого диаметра: $33,0 \pm 2,3\%$, $21,1 \pm 1,6\%$, $49,9 \pm 5,7\%$ соответственно.

Процесс прорезывания постоянных зубов сопровождался постепенным и плавным увеличением количества органелл, входящих в состав НВ пульпы (таблица 1).

Таблица 1 – Количество органелл аксоплазмы, транспортируемых быстрым аксональным током в нервных волокнах пульпы в процессе органогенеза

Нервные волокна	Безмиелиновые нервные волокна пульпы		Миелиновые нервные волокна пульпы	
	митохондрии	везикулы	митохондрии	везикулы
5	3,5±0,5	2,2±0,2	3,4±0,5	2,0±0,2
6	3,6±0,3	2,3±0,3	3,4±0,5	2,1±0,1
7	4,3±0,5	3,3±0,3*	4,3±0,3*	3,2±0,3*
8	4,8±0,4*	3,6±0,1*	4,6±0,4*	3,4±0,3*
9	4,9±0,4*	3,6±0,3*	4,7±0,4*	3,6±0,5*
10	5,4±0,3*	3,9±0,5*	5,0±0,3*	3,7±0,6*
11	5,6±0,2*	4,2±0,4*	5,6±0,2*	4,0±0,5*
12	5,7±0,4*	4,5±0,4*	5,9±0,6*	4,0±0,6*
13	5,9±0,4*	4,5±0,3*	6,1±0,0,5*	4,1±0,5*
14	6,2±0,5*	5,0±0,4*	6,3±0,5*	4,0±0,5*

Примечание: * – различия достоверны при $p < 0,05$ с возрастом 5 лет

Наиболее значимо за период от 5 до 14 лет повышалось количество нейровезикул: в безмиелиновых НВ их количество увеличилось в 2,27 раза ($p < 0,05$), в миелиновых – в 2,0 раза ($p < 0,05$), хотя темпы прироста между годами невелики – не более 10%. Плотность расположения везикул не коррелировала с диаметром нервных проводников.

Число митохондрий, приходящихся на 1 $\mu\text{м}^2$ аксоплазмы нервных волокон пульпы в период органогенеза постоянных зубов повышалось в 1,77 раза в безмиелиновых и 1,85 раза в миелиновых НВ6 ($p < 0,05$). Общий ежегодной прирост этих органелл составлял в среднем 5-10%. Увеличение количества митохондрий наблюдалось в области перехватов Ранвье во всех нервных волокнах. Наиболее значимые изменения количества митохондрий (увеличение на 30–40%) выявлялись в НВ преимущественно малого диаметра в возрасте 9–10 лет, в дальнейшем в этот процесс вовлекались также и проводники среднего и большого размера. В целом количество митохондрий максимально к 14-летнему возрасту.

Количество нейрофиламентов (НФ), приходящихся на 1 $\mu\text{м}^2$ аксоплазмы НВ и транспортируемых медленным аксональным током со времени начала прорезывания постоянных зубов изменялось не столь выражено, как нейровезикул и митохондрий (таблица 2).

Таблица 2 – Количество нейрофиламентов аксоплазмы, транспортируемых медленным аксональным током в нервных волокнах пульпы в процессе органогенеза

Нервные волокна	Безмиелиновые нервные волокна	Миелиновые нервные волокна
Возраст		

5	117,01±6,1	116,0±5,3
6	117,7±7,8	117,27±5,5
7	118,47±7,5	118,37±6,8
8	120,0±2,5	119,5±3,9
9	120,67±8,6	120,0±7,3
10	122,23±5,2	123,6±5,6
11	123,53±6,2	122,43±3,4
12	128,10±6,2	124,10±2,5
13	130,4±5,4*	125,33±2,9*
14	131,36±6,9*	128,5±3,1*

Примечание: * – различия достоверны при $p < 0,05$ с возрастом 5 лет

Общее количество НФ (без учета диаметра нервных проводников) за весь период органогенеза повышалось на 10,8% в миелиновых, и на 12,3% в безмиелиновых НВ. Это наиболее стабильный показатель, также как число микротрубочек, что было выявлено ранее [2]. Значимые различия в сравнении с 5-летним возрастом были отмечены только при переходе от детства к подростковому периоду. Так, например, в безмиелиновых НВ количество НФ было стабильно в период от 5 до 11, в миелиновых НВ – с 5 до 10 лет.

Обсуждение. Внутриклеточный транспорт грузов является важным процессом для поддержания структуры и функционирования всех типов клеток млекопитающих, но особенно нейронов из-за их экстремальной поляризации аксонов/дендритов. Он опосредует перемещение таких грузов, как белки, мРНК, липиды, мембраносвязанные везикулы и органеллы, которые в основном синтезируются в теле клетки, но при этом отвечает за их правильное пространственно-временное распределение в аксоне [5]. Особенно важен этот процесс во время органогенеза, однако, как утверждают С.Р. Donnelly с соавт., 2019 [6], сроки и структура иннервации пульпы зуба, понимание сигнальных механизмов, регулирующих иннервацию зубов в процессе развития, остаются незначительными. Нами установлено, что наиболее значимые изменения характерны для органелл, транспортируемых быстрым транспортом, количество которых в процессе прорезывания зубов возрастает более, чем в 2 раза. Это положение является важным, т.к. нарушения эндосомного транспорта везикул было зарегистрировано в широкой группе нейродегенеративных заболеваний [8]. Митохондрии – высокодинамичные органеллы, участвующие во многих клеточных процессах, включая реакции на стресс и гибель клеток [11]. Нейроны с их чрезвычайно длинным аксоном критически зависят от функции и могут стать быть причиной дефектов аксонального транспорта, наблюдаемых при многих нейродегенеративных заболеваниях [8].

Стабильность количества НФ, транспортируемых медленным током аксоплазмы, обусловлена тем, что нейрофиламенты играют ключевую роль в формировании не только цитоархитектуры и формы клеток, защищают клетки от внешних воздействий, но также обеспечивают структурную поддержку аксонов, регулируют их диаметр, обеспечивая стабильность аксона [4, 7, 9].

Выводы. 1. Органогенез постоянных зубов сопровождается увеличением количества органелл в аксоплазме нервных волокон. 2. Постепенное и выраженное нарастание количества органелл характерно для нейровезикул (увеличение более, чем в 2 раза) и митохондрий (увеличение составило 77-85%), транспортируемых быстрым аксоплазматическим током, но не для нейрофиламентов, транспортируемых с медленным током аксоплазмы, увеличение которых отмечается на 10-12% только в подростковом периоде.

Список литературы

1. Окушко В.Р., Суетенков Д.Е., Чепендюк Т.А. Онтогенез стенки альвеолы зачатка зуба по данным ортопантомографии // Саратовский научно-медицинский журнал. 2015. Т. 11, № 4. С. 561-565.
2. Полякова О. Л., Чучкова Н.Н., Чучков В.М. Николенко В.Н. Количественный ультраструктурный анализ нейротубулярного аппарата миелиновых волокон пульпы зуба у детей, родившихся и проживающих в местах с повышенной эколого-техногенной нагрузкой // Вестник Удмуртского университета. Серия «Биология. Науки о Земле». 2019. Т. 29, № 2. С. 206-212.
3. Чепендюк Т.А. Морфо-топометрическая изменчивость лунки зубного зачатка и её структур: дис... канд. мед. наук: 14.03.01. Тирасполь, 2018, 140 с.
4. Boumil E. F., Vohnoutka R., Lee S., Pant H., Shea T.B. Assembly and turnover of neurofilaments in growing axonal neuritis // Biol. Open. 2018. Vol. 7, № 1. P. bio028795.
5. De Vos K.J., Hafezparast M. Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research? // Neurobiol. Dis. 2017. № 105. P. 283-299.
6. Donnelly C.R., Shah A.A., Suh E.B., Pierchala B.A. Ret Signaling Is Required for Tooth Pulp Innervation during Organogenesis // J. Dent. Res. 2019. Vol. 98, №6. P.705-712.
7. Etienne-Manneville S. Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology. // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2018. № 34. P. 1-28.
8. Guo W., Stoklund Dittlau K., Van Den Bosch L. Axonal transport defects and neurodegeneration: Molecular mechanisms and therapeutic implications // Semin. Cell Dev. Biol. 2020. № 99. P. 133-150.
9. Murillo B., Mendes Sousa M. Neuronal Intrinsic Regenerative Capacity: The Impact of Microtubule Organization and Axonal Transport // Dev. Neurobiol. 2018. Vol. 78, № 10. P. 952-959.
10. Nosrat I.V., Widenfalk J., Olson L., Nosrat C.A. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury // Dev. Biol. 2001. Vol. 238, № 1. P. 120-132.
11. Schwarz T.L. Mitochondrial trafficking in neurons // Cold. Spring. Harb. Perspect Biol. 2013. Vol. 5. № 6. P. a011304.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Контактная информация и сведения об авторах

*Чучкова Наталья Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой медицинской биологии, Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, г. Ижевск, Россия, email: mig05@inbox.ru

Полякова Ольга Леонтьевна, кандидат медицинских наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)», г. Москва, Россия

Чучков Виктор Михайлович, доктор медицинских наук, профессор кафедры физиологии, клеточной биологии и биотехнологии, Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия

Сметанина Марина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры медицинской биологии, Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, г. Ижевск, Россия

Информация о вкладе каждого автора

Чучкова Н.Н. – анализ данных, написание статьи

Полякова О.Л. – сбор данных, статистическая обработка

Чучков В.М. – концепция и дизайн исследования

Сметанина М.В. – статистическая обработка данных, интерпретация результатов