

УСТОЙЧИВОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И МОТОРНЫХ НЕЙРОНОВ ПРИ ПЕРЕРЕЗКЕ ИХ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ОТРОСТКОВ В СЕДАЛИЩНОМ НЕРВЕ

УДК 591.8:612.014.2

Поступила 2.02.2011 г.



Л.Б. Тимофеева, ассистент кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией;
Н.В. Благова, аспирант кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией;
А.Г. Величанская, к.б.н., старший преподаватель кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией;
И.Л. Ермолин, д.б.н., зав. кафедрой гистологии с цитологией и эмбриологией

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Цель исследования — изучить посттравматическую выживаемость в популяциях чувствительных (ЧН) и моторных (МН) нейронов и их размерных групп в течение 30—300 сут после перерезки седалищного нерва в динамике.

Материалы и методы. Для количественного выявления переживающих нейронов в популяциях ЧН и МН, формирующих седалищный нерв крысы, применен метод ретроградного маркирования флюоресцентным красителем **Mini-Ruby**. **Материалом для исследования** послужили спинномозговые узлы (СМУ) и сегменты спинного мозга (ССМ) L₄—L₆.

Заключение. Посттравматическая гибель в популяциях ЧН и МН после перерезки седалищного нерва протекает асинхронно, при этом чувствительное звено, как менее устойчивое, является ведущим, поскольку подвергается более ранней дегенерации. Гибель ЧН на всех сроках эксперимента опережает элиминацию МН, а стабилизация в соотношении чувствительного и моторного звеньев возникает только на 150-е сутки. Впоследствии в этом соотношении вновь возникает дисбаланс, который влечет за собой новую волну дегенерации среди МН, что указывает на незавершенность посттравматического процесса к 300-м суткам. В итоге в популяции ЧН переживают только 31,47%, а в популяции МН — 40,41% нервных клеток.

Ключевые слова: чувствительные нейроны, моторные нейроны, седалищный нерв, **Mini-Ruby**.

English

Stability of sensory and motor neurons in transection of their peripheral processes in sciatic nerve

L.B. Timofeeva, Tutor, the Department of Histology with Cytology and Embryology;
N.V. Blagova, Postgraduate, the Department of Histology with Cytology and Embryology;
A.G. Velichanskaya, PhD, Senior Teacher, the Department of Histology with Cytology and Embryology;
I.L. Ermolin, D.Bio.Sc., Head of the Department of Histology with Cytology and Embryology

Nizhny Novgorod State Medical Academy, N. Novgorod

The aim of the investigation is to study posttraumatic survival in population of sensory (SN) and motor (MN) neurons and their size groups within 30—300 days after sciatic nerve transection in dynamics.

Materials and Methods. There was used a method of retrograde marking by fluorescent dye Mini-Ruby for quantitative detection of survival neurons in SN and MN populations forming rat's sciatic nerve. Research materials were spinal ganglions (SG) and spinal segments (SS) L₄—L₆.

Conclusion. Posttraumatic death in SN and MN populations after sciatic nerve transection is asynchronous, a sensory part, as a less stable, being a leading one since subjected to earlier degeneration. The death of SN within all periods of the experiment goes before the elimination of MN, and the stabilization of sensory-motor neuron ratio occurs only on the 150th day. Later the imbalance in the relationship appears resulting in a new wave of degeneration among MN indicating incompleteness of a posttraumatic process by the 300th day. As a result, in SN population only 31.47% of nerve cells survive, and in MN population — 40.41%.

Key words: sensory neurons, motor neurons, sciatic nerve, Mini-Ruby.

Для контактов: Тимофеева Лидия Борисовна, тел. раб. (831)438-02-05, тел. моб. +7 920-054-56-35; e-mail: bioli@mail.ru.

Успех регенерации седалищного нерва в значительной мере определяется посттравматической выживаемостью нейронов, принимающих участие в его формировании. Однако не существует единого мнения о размерах гибели как чувствительных (ЧН), так и моторных нейронов (МН), а также их размерных групп при перерезке этого нерва. Сроки наблюдений часто ограничены 30 сут [1—4]. Вместе с тем гибель и переживание нейронов, а также изменение соотношения их размерных групп в отдаленные сроки имеют важное значение для определения времени реабилитации поврежденного нерва. Кроме того, отсутствует оценка ЧН и МН как звеньев одной рефлекторной дуги в посттравматическом процессе после перерезки периферического нерва.

Цель исследования — изучить посттравматическую выживаемость в популяциях чувствительных и моторных нейронов и их размерных групп в период от 30 до 300 сут после перерезки седалищного нерва в динамике.

Материалы и методы. Исследования проводились на 27 самцах белых беспородных крыс массой 200—250 г. Для выявления популяций нейронов, формирующих седалищный нерв, был использован флюоресцентный краситель Mini-Ruby (10 000, dextran, tetramethylrhodamine and lysine; Molecular Probes). В норме (n=7) у животных под нембуталовым наркозом (40 мг/кг) на уровне верхней трети бедра перерезался правый седалищный нерв и апплицировался 10,0% флюоресцентным красителем. У животных экспериментальной группы (n=20) седалищный нерв пересекался на том же уровне, после чего рана послойно ушивалась. Маркирование нейронов производилось на 30, 90, 150 и 300-е сутки после операции. Нерв апплицировался проксимальнее места перерезки.

Через 7 сут после маркирования нейронов красителем животное перфузировалось 4% параформальдегидом на 0,1M фосфатном буфере. Материалом для исследования послужили спинномозговые узлы (СМУ) и сегменты спинного мозга (ССМ) L₄—L₆, обработанные по стандартной методике [5], после чего на криостате изготавливались продольные срезы СМУ L₄—L₆ толщиной 25 мкм и поперечные срезы ССМ L₄—L₆ толщиной 50 мкм. Идентификация и подсчет маркированных нейронов с одновременным определением их размерных групп проводились на флюоресцентном мик-

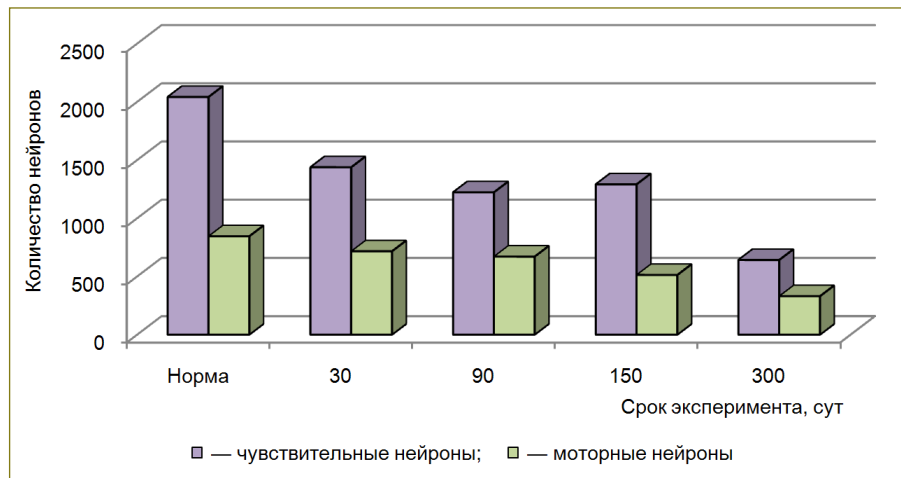
роскопе Micros MC 200 F (Австрия). В СМУ были выделены мелкие (d<20 мкм), средние (20<d<35 мкм) и большие нейроны (d>35 мкм), среди нейронов ССМ — мелкие (d<35 мкм) и большие (d>35 мкм) клетки.

Статистический анализ проведен с помощью компьютерной программы Statistica 6.0. Для выявления достоверности различий между группами использовался непараметрический критерий Манна—Уитни. Достоверными считались результаты при p<0,05.

Результаты. Подсчет маркированных нейронов через 30 сут после перерезки седалищного нерва показал, что количество переживающих ЧН в популяции составляет 70,42% от нормы (см. рисунок). Число мелких нейронов сократилось до 33,55%, средних — до 81,90%, больших — до 57,09% от нормы (см. таблицу).

На 30-е сутки после перерезки седалищного нерва МН демонстрируют более высокую устойчивость к повреждению, чем ЧН. Так, количество переживающих МН составляет 87,62% от нормы. При этом значительно изменяется соотношение размерных групп. Количество мелких клеток увеличивается и достигает 406,63%, а количество больших — уменьшается до 66,00% от нормы.

На 90-е сутки происходит статистически незначимое уменьшение количества нейронов обеих популяций по сравнению с предыдущим сроком. Однако число пере-



Динамика общего количества чувствительных и моторных нейронов в популяциях, участвующих в формировании седалищного нерва, в норме и после его перерезки

Размерные группы в популяциях чувствительных и моторных нейронов в норме и в эксперименте

Сроки эксперимента	Количество ЧН			Количество МН	
	большие	средние	мелкие	большие	мелкие
Норма	638,8±209,7	1245,80±272,25	157,0±34,5	765,00±33,19	51,86±8,63
30 сут	364,67±99,43*	1020,33±99,01	52,67±27,61*	504,88±62,21*	210,88±41,58*
90 сут	249,00±71,39*	921,33±147,89*	52,00±20,95*	430,60±64,44*	239,40±45,36*
150 сут	401,33±16,56*#	845,67±33,31*	44,00±32,42*	362,60±113,69*	137,60±19,48*#
300 сут	216,67±40,07*	406,67±73,17*	18,00±12,16*	292,50±26,37*	37,63±23,74+

* — статистически значимые различия по сравнению с нормой (p<0,05); # — по сравнению с 90-ми сутками (p<0,05); + — по сравнению со 150-ми сутками (p<0,05).

живающих ЧН достигает уже 59,87% от нормы. Количество больших и средних нейронов сокращается до 38,98 и 73,95% от нормы соответственно, а мелких — почти не изменяется по сравнению с предыдущим сроком и составляет 33,12% от нормы.

На данном этапе популяция МН достоверно уменьшается до 82,02% от нормы. Следует отметить продолжающееся увеличение количества мелких нейронов до 461,63% и уменьшение больших нейронов до 56,29% от нормы.

К 150-м суткам в популяции ЧН по сравнению с предыдущим сроком гибель нейронов приостанавливается. В результате количество переживающих нейронов составляет 63,23% от нормы. Вместе с тем происходит достоверное увеличение количества больших нейронов по сравнению с предыдущим сроком — до 62,82% от популяции в норме. Число средних и мелких нейронов продолжает незначительно снижаться и составляет соответственно 67,88 и 28,03% от нормы.

Общее количество МН в популяции на 150-е сутки уменьшается до 61,23% от нормы. Мелкие нейроны составляют 265,33% от нормы, что указывает на тенденцию к снижению их количества по сравнению с предыдущим сроком, а число больших нейронов продолжает уменьшаться и составляет 47,40% от нормы.

На 300-е сутки эксперимента продолжается гибель нейронов в обеих популяциях. При этом количество переживающих ЧН уменьшается до 31,41%, а МН — до 40,41% от нормы.

Среди переживающих ЧН в популяции остается 11,46% от нормы мелких, 32,64% — средних и 33,91% — больших нейронов. В числе переживающих МН на этот срок в популяции остается 72,56% мелких и 38,24% больших нейронов.

Обсуждение. Согласно имеющимся в литературе данным, после перерезки седалищного нерва крысы гибель ЧН составляет от 7 до 50% [2, 6]. Исследователи, оценивая тотальное количество нейронов в СМУ, отмечают отсутствие значительной гибели ЧН через 2 мес после перерезки нерва [2]. Факт незначительного уменьшения ЧН в двухмесячный период можно объяснить и возможностью нейрогенеза в СМУ взрослых крыс [7]. По нашим данным, гибель мелких ЧН развивается более стремительно и достигает больших показателей, чем гибель нейронов других размерных групп. На 30-е и 90-е сутки нейроны среднего размера демонстрируют наибольшую устойчивость к повреждению, а через 150 и 300 сут показатели гибели в размерных группах больших и средних нейронов отличаются незначительно. Тот факт, что количество больших нейронов на 150-е сутки значимо увеличивается по сравнению со сроком 90 сут, позволяет предположить, что повреждение периферических отростков нейронов может привести к уменьшению объема их клеточных тел, на что указывают другие исследователи [8]. Вследствие этого возможен переход больших нейронов в размерную группу средних.

По данным разных авторов, выживание общего количества МН на ранних сроках (до 30 сут) составляет от 79,12 до 93,65% [3, 9]. Эти авторы делают

вывод об устойчивости МН к повреждению их периферических отростков. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что основное количество МН способно переживать повреждение периферических отростков длительное время, однако, начиная с 90-х суток, их численность уменьшается, на 150-е сутки гибель становится значимой и достигает 59,59% к концу эксперимента.

На протяжении всего эксперимента наблюдаются изменения и в соотношении размерных групп МН. Так, количество больших МН равномерно уменьшается, а число мелких нейронов, начиная с 30-х суток, резко увеличивается в 4 раза. Подобное увеличение количества мелких нейронов на ранних постоперационных сроках отмечали и некоторые исследователи [9]. Этот факт они объясняют значительными дегенеративными изменениями перикарионов крупных МН после повреждения их аксонов. По результатам наших исследований, со 150-х суток количество мелких нейронов начинает уменьшаться и к 300-м суткам становится ниже нормы на фоне статистически достоверного уменьшения больших МН. Данных по соотношению размерных групп МН в отдаленные сроки в литературе не найдено. Однако можно предположить, что большие МН, которые в ранние постоперационные сроки перешли в категорию мелких, на отдаленных этапах не восстановили исходный размер своих перикарионов и подверглись элиминации.

Заключение. Посттравматическая гибель в популяциях чувствительных и моторных нейронов после перерезки седалищного нерва характеризуется периодичностью, что выражается в чередовании временных промежутков со значительной степенью гибели нервных клеток с периодами устойчивости нейронов. Данный процесс протекает асинхронно в обеих популяциях, при этом чувствительное звено, как менее устойчивое, является ведущим, поскольку подвергается более ранней дегенерации. Гибель ЧН на всех сроках эксперимента опережает МН, а стабилизация в соотношении чувствительного и моторного звена возникает только на 150-е сутки. Впоследствии вновь возникает дисбаланс в соотношении между ЧН и МН, который влечет за собой новую волну дегенерации среди МН, что указывает на незавершенность посттравматического процесса к 300-м суткам. В итоге в популяции ЧН переживают только 31,47%, а в популяции МН — 40,41% нервных клеток.

Литература

1. *Tandrup T., Woolf C., Coggeshall R.* Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. *J Comp Neurol* 2000; 422(2): 172—180.
2. *McKay Hart A., Brannstrom T., Wiberg M., Terenghi G.* Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination. *Exp Brain Res* 2002; 142(3): 308—318.
3. *Saxena K., Patro N., Patro I.* FK506 protects neurons following peripheral nerve injury via immunosuppression. *Cell Mol Neurobiol* 2007; 27(8): 1049—1057.

4. *Liss A.G., Ekenstam F.W., Wiberg M.* Cell loss in sensory ganglia after peripheral nerve injury. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg* 1994; 28: 177—187.
5. *Ермолин И.Л.* Количественная оценка маркированных нейронов спинномозгового узла T₁₃ в условиях регенерации периферического нерва у взрослой крысы. *Нижегородский мед журнал* 2006; 2: 24—29.
6. *Ygge J.* Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared with distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. *Brain Res* 1989; 478: 193—195.
7. *Groves M.J., Schänzer A., Simpson A.J., An S.-F., Kuo L.T.* Profile of adult rat sensory neuron loss, apoptosis and replacement after sciatic nerve crush. *J of Neurocytol* 2003; 32: 113—122.
8. *Brushart T.M., Gerber J., Kessens P., Chen Y.-G., Roy R.M.* Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. *The Journal of Neuroscience* 1998; 18(21): 8674—8681.
9. *Novikov L.N., Novikova L.N., Kellerth J.-O.* Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion. *Neuroscience Letters* 1995; 10: 45—48.