

МОРФОЛОГИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И МОТОРНЫХ НЕЙРОНОВ, ФОРМИРУЮЩИХ СЕДАЛИЩНЫЙ НЕРВ В НОРМЕ И ПРИ ЕГО ПЕРЕРЕЗКЕ У ВЗРОСЛЫХ КРЫС

УДК 591.8:616.833.58.001.6

Поступила 19.04.2010 г.



Л.Б. Тимофеева, аспирант кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией¹;
Н.В. Благова, аспирант кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией¹;
А.Г. Величанская, к.б.н., старший преподаватель кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией¹;
И.В. Балалаева, к.б.н., зав. лабораторией клеточных технологий²;
И.Л. Ермолин, д.б.н., зав. кафедрой гистологии с цитологией и эмбриологией¹

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород

Цель исследования — изучение популяции чувствительных и моторных нейронов, участвующих в формировании седалищного нерва (СН) в норме и на 300-е сутки после его перерезки у взрослой крысы.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование выполнено на белых беспородных крысах-самцах (n=16) массой 200—250 г. У животных контрольной и экспериментальной групп перерезался правый СН на уровне верхней трети бедра. Для изучения популяций нейронов, формирующих СН, применен метод ретроградного маркирования флюоресцентным красителем Mini-Ruby. В контрольной группе маркирование проводилось через проксимальную культю СН, а в экспериментальной — отдельно, через проксимальную и дистальную культю. Продольно ориентированные серийные срезы спинномозговых узлов толщиной 25 мкм и продольные и поперечные серийные срезы спинного мозга толщиной 50 мкм приготавливались на замораживающем микротоме. Подсчет маркированных нейронов с видимыми ядрами осуществлялся на каждом срезе.

Результаты. В норме установлено, что популяция мотонейронов, формирующих СН, располагается в сегментах L₄—L₆, а чувствительных — в сегментах L₃—L₆. Соотношение моторных и чувствительных нейронов составляет 1:2,49.

В эксперименте (через 300 сут) выделены группы переживающих, регенерирующих и резервных нейронов. Группа переживающих мотонейронов составила 37,41%, а чувствительных — 15,34% от популяций в норме. Из числа переживающих рубец преодолели 50,64% моторных и 11,07% чувствительных нейронов. Группу резервных составили 49,36% моторных и 88,93% чувствительных нейронов.

Заключение. Количественно определены популяции моторных и чувствительных нейронов, формирующих СН в норме, и выявлен более высокий потенциал к регенерации у моторных по сравнению с чувствительными нейронами.

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

English

Morphology of the sensitive and motor neuron populations, forming a sciatic nerve in norm and at its cutting in adult rats

L.B. Timofeeva, post-graduate of the histology with cytology and embryology chair¹;
N.V. Blagova, post-graduate of the histology with cytology and embryology chair¹;
A.G. Velichanskaya, c.b.s., senior teacher of the histology with cytology and embryology chair¹

Для контактов: Тимофеева Лидия Борисовна, тел. раб. 8(831)438-02-05, тел. моб. +7 920-054-56-35; e-mail: bioli@mail.ru.

I.V. Balalaeva, c.b.s., head of the cellular technology laboratory²;
I.L. Ermolin, B.D., head of the histology with cytology and embryology chair¹

¹ Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod;

² N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod state university, N. Novgorod

Aim of investigation is a study of the sensitive and motor neuron population, participating in a sciatic nerve (SN) in norm forming and on the 300 days after its cutting in adult rat.

Materials and methods. Experimental investigation is accomplished on white breedless male-rats (n=16) with a mass of 200—250g. The right SN was cut at the upper third of a femur level in the control and experimental group animals. A method of retrograde marking with a Mini-Ruby fluorescent stain is used for a study of the neuron populations, forming a SN. A marking was made through a proximal SN stump in a control group, and separately, through a proximal and distal stump in experimental group. The longitudinally oriented serial sections of the cerebrospinal nodes with a 25 mkm thickness and longitudinal and transverse serial sections of the spinal cord with a 50 mkm thickness were prepared at a freezing microtome. A calculation of the marked neurons with the visible nuclei was made in each section.

Results. It is established in norm that a population of motoneurons, forming a SN, is located in segments L₄—L₆, and a population of the sensitive ones is located in segments L₃—L₆. A ratio of motor and sensitive neurons is 1:2.49.

The groups of surviving, regenerating and reserve neurons are distinguished in experiment (in 300 days). A group of surviving motoneurons was 37.41%, and a group of the sensitive ones was 15.34% of the populations in norm. More than 50.64% of the motor and 11.07% of the sensitive neurons were in those with a cicatrix. A group of reserve neurons included 49.36% of the motor and 88.93% of the sensitive neurons.

Conclusion. The motor and sensitive neuron populations, forming a SN in norm, are quantitatively defined, and a higher potential to regeneration in the motor neurons compared to sensitive ones is revealed.

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

Повреждения нервного ствола вызывают расстройство движений, чувствительности и вегетативно-трофические нарушения. Успех восстановления периферического нерва в значительной мере определяется выживаемостью после травмы нейронов, задействованных в его формировании. При оценке эффективности регенерации СН анализируются моторные нейроны спинного мозга (СМ) и чувствительные нейроны спинномозговых узлов (СМУ) одного или двух сегментарных уровней [1—3]. Между тем в литературе имеются сведения об участии в формировании СН трех или четырех сегментов поясничного отдела СМ и СМУ [4—9]. Предлагаемый метод ретроградного маркирования нейронов позволяет объективно оценить популяции моторных и чувствительных нейронов, формирующих СН крысы в норме и в эксперименте. Это имеет принципиальное значение для коррекции тактики лечения поврежденного периферического нерва.

Цель исследования — изучить популяции чувствительных и моторных нейронов, формирующих седалищный нерв в норме и на 300-е сутки после его перерезки.

Материалы и методы. Исследования проводились на самцах белых беспородных крыс (n=16) массой 200—250 г. Контрольную группу составили 7 интактных животных, экспериментальную — 9 животных. Эксперименты выполнены под нембуталовым наркозом (40 мг/кг), который вводился внутривенно. Для выявления нейронов, формирующих СН в норме и после его перерезки, был использован флуоресцентный краситель Mini-Ruby (dextran, tetramethylrhodamine and biotin 10,000 MW, lysine fixable; molecular probes).

У всех животных на уровне верхней трети бедра перерезался правый СН, после чего рана послойно ушивалась. В контрольной группе СН апплицировался

10,0% флуоресцентным красителем. У животных экспериментальной группы через 300 сут было проведено ретроградное маркирование через проксимальную (n=5) и дистальную (n=4) культю регенерировавшего нерва. Через 7 дней животные перфузировались раствором параформальдегида на фосфатном буфере.

Материалом для исследования послужили сегменты СМ L₃—L₆ и СМУ этих же сегментарных уровней. Материал помещался дополнительно в указанный фиксатор на 24 ч (при комнатной температуре), после чего переносился в 10,0% раствор сахарозы на фосфатном буфере на 24 ч и затем в 30,0% раствор сахарозы на фосфатном буфере на 72 ч в холодильник. После этого образцы ткани заключались в 1,0% раствор желатины на 0,1М фосфатном буфере с pH=7,2—7,4. Из подготовленных тканей в криостате (–25°C) приготавливались продольно и поперечно ориентированные срезы СМ толщиной 50 мкм и продольно ориентированные срезы СМУ толщиной 25 мкм. Срезы помещались на предметные стекла, покрытые желатиной, сушились, после чего заключались в равную смесь глицерина с фосфатным буфером.

Подсчет маркированных нейронов производился на флуоресцентном микроскопе Micros MC 200 F (Австрия) по ядрам, поскольку в литературе имеются сообщения о возможности использования этого метода наравне с методом объемной реконструкции перикарионов, который позволяет более точно определить количество нейронов, но является трудоемким [10]. Фоторегистрация производилась на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axiovert 200 камерой Carl Zeiss AxioCam MRc.

Статистический анализ проведен с помощью компьютерной программы Statistica 6.0. Достоверность различий оценивалась с использованием непарамет-

рического критерия Манна—Уитни. Достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Метод ретроградного транспорта флуоресцентного красителя позволил выявить популяции чувствительных и моторных нейронов, участвующих в формировании СН в норме и после перерезки.

В норме маркированные мотонейроны были выявлены в сегментах СМ L_4 — L_6 . Наибольшая плотность клеток прослеживалась в латеральных ядрах перед-

него рога, в центральном ядре их количество было незначительным. В сегменте L_4 большая плотность маркированных нейронов была характерна для переднего латерального ядра (рис. 1, а), а в сегментах L_5 и L_6 — для заднего латерального ядра (рис. 1, в, д). Количество и плотность мотонейронов увеличивались в местах выхода из спинного мозга вентральных корешков L_4 , L_5 и L_6 . На продольных срезах СМ сегментов L_4 — L_6 маркированные нейроны образуют непрерывный тяж клеток длиной около 8,5 мм (табл. 1).

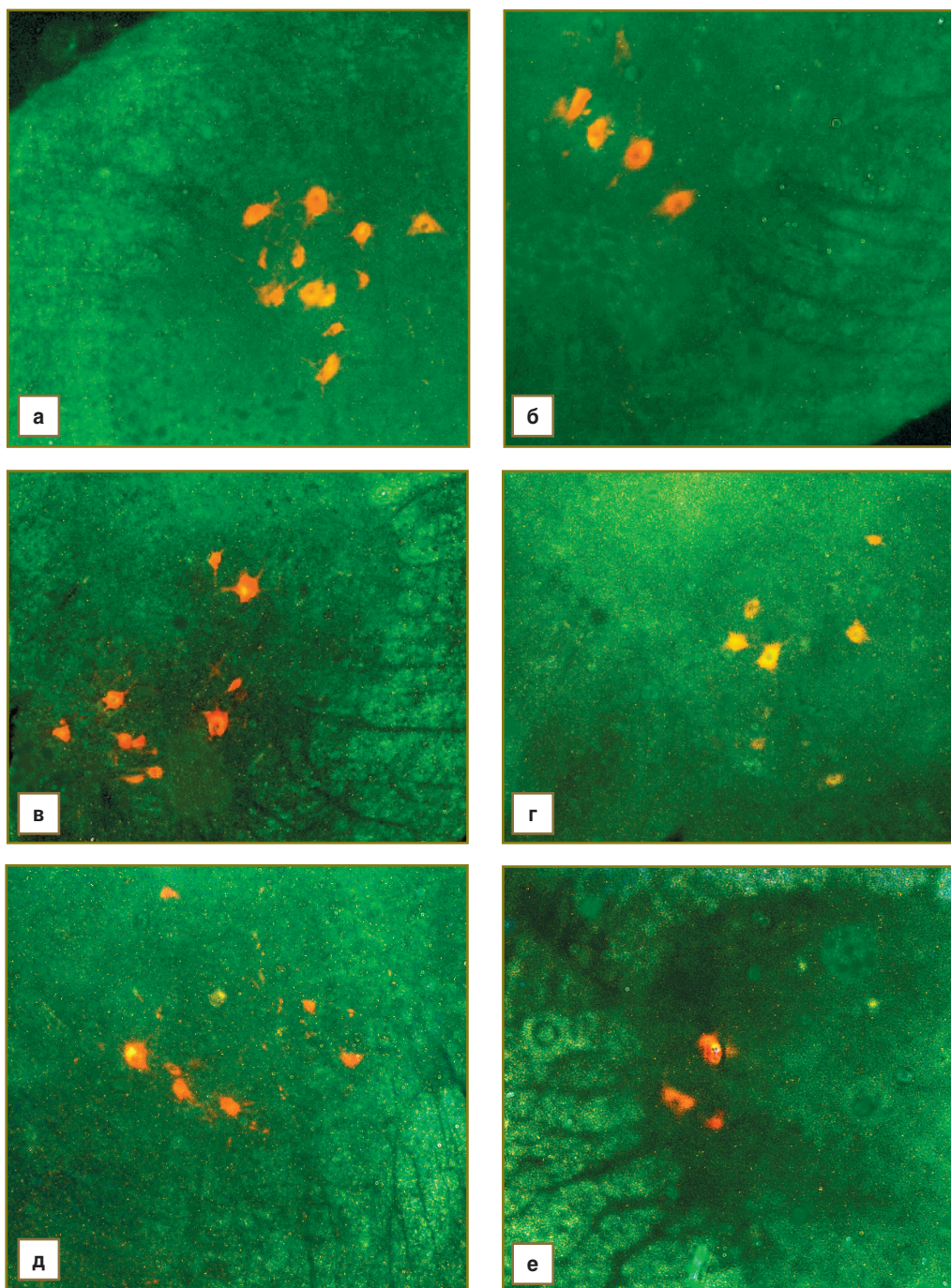


Рис. 1. Моторные нейроны СМ в норме (а — L_4 ; в — L_5 ; д — L_6) и через 300 сут после перерезки седалищного нерва (б — L_4 ; г — L_5 ; е — L_6). Ретроградное маркирование моторных нейронов, формирующих СН. Введение Mini-Ruby через проксимальную культю. Ув. 40

Таблица 1
 Распределение моторных и чувствительных нейронов, формирующих седалищный нерв в норме, %

Расположение нейронов	Сегментарный уровень			
	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆
СМ	0	31,56	43,81	24,63
СМУ	0,06	34,94	55,96	9,04

Маркированные чувствительные нейроны присутствовали в сегментах СМУ L₄ и L₅ у всех исследованных животных (рис. 2, а, в). В сегменте L₆ они были выявлены в меньшем количестве и не у всех животных (рис. 2, д). В сегменте L₃ у некоторых животных встречались единичные нейроны исследуемой популяции (см. табл. 1). Локализации нейронов в строме ганглия, отмеченной другими исследователями [11], не обнаружено. Полученные результаты соответствуют существу-

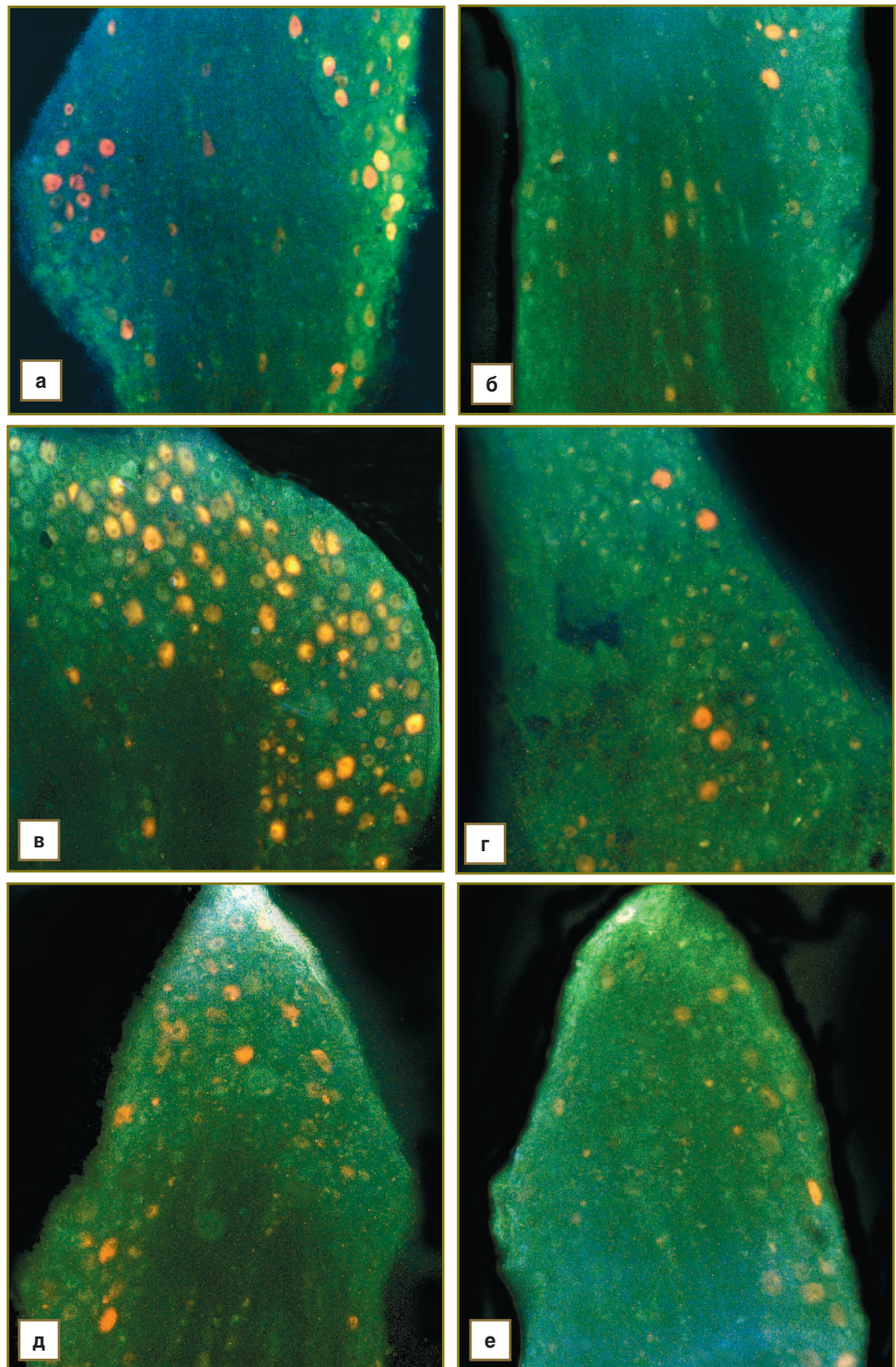


Рис. 2. СМУ в норме (а — L₄; в — L₅; д — L₆) и через 300 сут после перерезки седалищного нерва (б — L₄; г — L₅; е — L₆). Ретроградное маркирование чувствительных нейронов, формирующих СН. Введение Mini-Ruby через проксимальную культю. Ув. 40

ющим представлениям об источниках формирования СН, согласно которым оно осуществляется моторными и чувствительными нейронами сегментарных уровней L₃—L₆ [4—9]. Соотношение вклада СМУ в СН отличается от установленного ранее [7]. Расхождение результатов можно объяснить различием пород использованных животных [9].

Общее количество чувствительных нейронов, участвующих в формировании СН на уровне верхней трети бедра, в норме составило 2041,60±445,20, а количество моторных нейронов — 816,86±39,37. Установленные количественные данные значительно отличаются от приводимых в литературе [5—7], по-видимому, вследствие различий в использованных методах подсчета нейронов.

Через 300 сут после перерезки СН при маркировке проксимальной культы гибель нейронов была обнаружена в СМ и СМУ всех изученных сегментарных уровней. Маркирование проксимальной и дистальной культей позволило выделить популяции переживающих, регенерирующих и резервных нейронов [12].

Процентные показатели гибели моторных нейронов в сегментах СМ при анализе данных в случае введения красителя в проксимальную культю не имели больших различий. Гибель нейронов в сегменте L₄ составила 63,03%, в L₅ — 61,49%, в L₆ — 68,80% (рис. 1, б, г, е). В сегменте СМУ L₆ гибель нейронов была более значимой и достигла 99,30% (рис. 2, е). Процентные показатели гибели нейронов в сегментах СМУ L₅ и L₄ уменьшались в ростральном направлении, но были значительны (рис. 2, б, г). Так, гибель нейронов в сегменте

L₅ по сравнению с контрольными животными составила 87,24%, а в L₄ — 76,69%.

Таким образом, количество переживающих моторных нейронов составило 37,41%, а переживающих чувствительных нейронов — 15,34% от нормы. Эти данные подтверждают сведения о большей резистентности моторных нейронов при повреждении периферических отростков [2, 13—16].

Введение маркера в дистальную культю позволило выявить популяцию нейронов, периферические отростки которых преодолели рубец. Через 300 сут после пересечения СН количество моторных нейронов составило в сегменте L₄ — 51,30%; в L₅ — 43,00%; в L₆ — 65,28% от популяции переживающих клеток (табл. 2). Общее количество регенерирующих моторных клеток от всей популяции переживающих нейронов составило 50,64%.

Количество регенерирующих чувствительных нейронов составило 11,17% от количества переживающих. Соответственно, в сегменте L₄ их было 8,72%, в L₅ — 14,23%, а в L₆ не обнаружено вообще (табл. 3).

Полученные данные указывают на длительное переживание и большие потенциальные регенеративные возможности мотонейронов по сравнению с чувствительными, поскольку 50,64% из них оказались способными к преодолению соединительнотканного рубца. Среди переживающих чувствительных нейронов СМУ преодолеть рубец смогли 11,07%.

Заключение. Популяция мотонейронов, формирующих седалищный нерв, располагается в сегментах L₄—L₆ и составляет в норме 816,86±39,37, а популяция

Таблица 2

Количество мотонейронов седалищного нерва в сегментах СМ в норме и через 300 сут после перерезки при аппликации Mini-Ruby проксимальной и дистальной культей

Сегменты СМ	Норма (n=7)	300 сут, проксимальная культя (n=5)	300 сут, дистальная культя (n=4)
L ₄	271,57±82,55	100,40±9,61*	51,50±5,75**
L ₅	357,86±9,92	137,80±5,67*	59,25±4,99**
L ₆	216,00±22,56	67,40±8,20*	44,00±4,76**
Всего	816,86±39,37	305,60±16,83*	154,75±10,69**

* — статистически значимо отличается от нормы (p<0,05);

** — от данных в проксимальной культе (p<0,05).

Таблица 3

Количество чувствительных нейронов седалищного нерва в СМУ в норме и через 300 сут после перерезки при аппликации Mini-Ruby проксимальной и дистальной культей

Сегменты СМУ	Норма (n=5)	300 сут, проксимальная культя (n=5)	300 сут, дистальная культя (n=4)
L ₃	1,20±2,17	0	0
L ₄	713,40±399,52	166,20±152,30*	14,50±24,56**
L ₅	1142,40±498,99	145,80±156,70*	20,75±40,18**
L ₆	184,60±134,63	1,20±1,80*	0**
Всего	2041,60±445,20	313,20±309,62*	35,00±64,07**

* — статистически значимо отличается от нормы (p<0,05);

** — от данных в проксимальной культе (p<0,05).

чувствительных нейронов — в сегментах L₃—L₆ и составляет — 2041,6±445,2, т.е. соотношение моторных и чувствительных нейронов — 1:2,49.

Через 300 сут после перерезки СН группа переживающих мотонейронов составила 37,41%, а чувствительных — 15,34% от количества нейронов СН в норме. Из них преодолели рубец 50,64% мотонейронов и 11,07% чувствительных нейронов. В группу резервных вошли 49,36% моторных и 88,93% чувствительных нейронов. Потенциальные возможности к регенерации после перерезки периферических отростков у моторных выше, чем у чувствительных нейронов.

Литература

1. *Novikov L., Novikova L., Kellerth J.-O.* Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience* 1997 May 26; 79(3): 765—774.
2. *Novikova L., Novikov L., Kellerth J.-O.* Effects of neurotransplants and BDNF on the survival and regeneration of injured adult spinal motoneurons. *Neuroscience* 1997 Dec; 9(12): 2274—2777.
3. *Чельшев Ю.А., Рагинов И.С., Гусева Д.С., Масгутов Р.Ф.* Выживание и фенотипическая характеристика аксотомированных нейронов спинальных ганглиев. *Морфология* 2004; 125(3): 45—49.
4. *Horcholle-Bossavit G., Jami L., Thiesson D., Zytnicki D.* Motor nuclei of peroneal muscles in the cat spinal cord. *J Comp Neurol* 1988 Nov 15; 277(3): 430—440.
5. *Swett J.E., Wikholm R.P., Blanks R.H., Swett A.L., Conley L.C.* Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 1986 Jul; 93(1): 227—252.
6. *Negredo P., Castro J., Lago N., Navarro X., Avendano C.* Differential growth of axons from sensory and motor neurons through a regenerative electrode: a stereological, retrograde tracer, and functional study in the rat. *Spain Neuroscience* 2004; 128(3): 605—615.
7. *Swett J.E., Torigoe Y., Elie V.R.* Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 1991 Oct; 114(1): 182—103.
8. *Rigaud M., Gemes G., Barabas M.-E., Chernoff D.I., Abram S.E., Stucky C.L., Hoganad Q.H.* Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: Implications for studies of neuropathic pain. *Pain* 2008 May; 136(1—2): 188—201.
9. *Asato F., Butler M., Blomberg H., Gordh T.* Variation in rat sciatic nerve anatomy: implications for a rat model of neuropathic pain. *J Peripher Nerv Syst* 2000 Mar; 5(1): 19—21.
10. *Ma J., Novikov L.N., Wiberg M., Kellerth J.-O.* Delayed loss of spinal motoneurons after peripheral nerve injury in adult rats: a quantitative morphological study. *Exp Brain Res* 2001 Jul; 139(2): 216—223.
11. *Wessels W.J., Feirabend H.K., Marani E.* The rostrocaudal organization in the dorsal root ganglia of the rat: a consequence of plexus formation? *Anat Embryol (Berl)* 1994 Jul; 190(1): 1—11.
12. *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.
13. *Welin D., Novikova L.N., Wiberg M., Kellerth J.-O., Novikov L.N.* Effects of N-acetyl-cysteine on the survival and regeneration of sural sensory neurons in adult rats. *Brain Res* 2009 Sept 1; 1287(1): 58—66.
14. *Koliatsos V.E., Price W.L., Pardo C.A., Price D.L.* Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons. *J Comp Neurol* 1994 Apr 1; 342(1): 35—44.
15. *Li L., Houenou L.J., Wu W., Lei M., Prevet D.M., Oppenheim R.W.* Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. *J Comp Neurol* 1998 Jun 29; 396(2): 158—168.
16. *Welin D., Novikova L.N., Wiberg M., Kellerth J.-O., Novikov L.N.* Survival and regeneration of cutaneous and muscular afferent neurons after peripheral nerve injury in adult rats. *Exp Brain Res* 2008 Mar; 186(2): 315—323.