

© И.А. Одинцова, Д.Р. Слуцкая, 2009
УДК 611.82.018.8.013:636.57

И.А. Одинцова и Д.Р. Слуцкая

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА КУР В ЭМБРИОНАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ РАЗВИТИЯ

Кафедра гистологии и эмбриологии (зав. — проф. Р.К. Данилов) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Цель исследования — дать морфологическую характеристику нейронов спинного мозга куриных эмбрионов породы Хайсекс белый кросс Э-21 10, 12, 15, 17, 19 сут развития. Всего использовано 125 куриных зародышей. Изучение изолированных нейронов показало закономерное изменение соотношения ядра и цитоплазмы, а также содержания ДНК в ядрах. На основании объема перикариона, выделены 3 субпопуляции нейронов в эмбриогенезе: малые, средние и большие. Это свидетельствует о существовании гетероморфии. Дифференцировка нейронов характеризуется постепенным уменьшением среднего объема ядра и объема перикариона и возрастанием ядерно-цитоплазменного отношения. Начало дифференцировки в гистогенезе нервной ткани сопровождается массовой гибелью малодифференцированных нервных клеток, которая наиболее выражена на 10-е сутки эмбриогенеза, когда гибнут 58% нейронов, затем данный показатель снижается до 2–5% (на 17–19-е сутки эмбриогенеза).

Ключевые слова: эмбриогенез, спинной мозг, нейроны, щелочная диссоциация, морфометрия.

Изучение гистогенетических основ формирования нервно-мышечных взаимоотношений в эмбриональном развитии позвоночных и человека является актуальной проблемой современной биологии. Благодаря внедрению современных методов исследования выявлены ряд существенных закономерных процессов формирования двигательных (нейромоторных) единиц [1]. Однако большинство работ в этой области имеют преимущественно физиологический характер [11, 13].

Цель настоящей работы — морфологически охарактеризовать нейроны спинного мозга в эмбриогенезе.

Материал и методы. Изучены куриные эмбрионы породы Хайсекс белый кросс Э-21 10, 12, 15, 17, 19 сут развития. Всего использовано 125 куриных эмбрионов, по 25 каждого срока развития. Для инкубации отбирали яйца массой 50–60 г, которые помещали в лабораторный инкубатор, где поддерживалась температура 37,8°С и влажность воздуха 50–60%. Для исследования брали фрагменты спинного мозга в области плечевого сплетения, которые фиксировали в 4% растворе параформа 15 сут. С помощью метода щелочной диссоциации [3] готовили препараты изолированных нейронов (делали мазки, которые высушивали в термостате при температуре 37°С и окрашивали крезильным фиолетовым и по Фельгену в модификации де Томази [2]). На 5 мазках от эмбрионов каждого срока исследования измеряли большой и малый диаметр тел нейронов и их ядер, определяли их площади проекции, а также объем ядер и перикариона. На основании последнего, все нейроны были разделены на 3 группы (субпопуляции): малые — с объемом перикариона меньше 900 мм³, среднее — 900–1200 мм³ и большие с объемом перикариона больше 1200 мм³. Кроме того, подсчитывали количество всех нейронов и, учитывая их морфологические

признаки (структуру ядра и цитоплазмы), определяли долю гибнущих клеток. Помимо мазков из спинного мозга, после его фиксации в 10% формалине, стандартной проводки и заливки в парафин приготавливали срезы, которые окрашивали крезильным фиолетовым. На этих срезах, так же как на мазках, измеряли диаметры тел нейронов и их ядер и определяли площади их сечения, вычисляли объем ядер и перикарионов. Для проведения статистического анализа цифровых данных использовали измененные программы статистической обработки материала [2, 6, 7].

Для оценки пролиферативных процессов нервных клеток определяли среднее содержание ДНК в их ядрах, используя метод одноволновой цитофотометрии с помощью усовершенствованного лабораторного цитоспектрофотометра [2]. Фотометрию осуществляли при длине волны 546 нм, диаметр зонда — 1 мкм. По результатам измерений не менее 100 ядер у 10 эмбрионов каждого срока развития рассчитывали относительное содержание гиперплоидных ядер. Для исследования содержания ДНК в ядрах развивающихся нейронов отбирали клетки, относящиеся к субпопуляции больших нейронов. Стандартом диплоидности служили ядра эритроцитов петуха.

Из материала, фиксированного в 2,5% растворе глутарового альдегида в течение 2 ч с последующей дофиксацией 1% раствором OsO₄ и залитого в смесь эпона и аралдита на ультратоме ЛКВ-III (Швеция), готовили полутонкие срезы, которые окрашивали в 1% растворе толудинового синего на 0,1М фосфатном буфере.

Экспериментальные исследования выполняли в соответствии с Методическими указаниями по содержанию и использованию лабораторных животных [10].

Результаты исследования. На основании сопоставления морфологических характеристик различных субпопуляций нейронов на тканевых срезах спинного мозга и на мазках, к субпопуляции больших нейронов можно отнести

моторные нейроны, а к субпопуляции малых — нейроны собственного аппарата спинного мозга. На 10-е сутки эмбриогенеза в мазках преобладает субпопуляция малых нейронов с малым объемом ядра. Они составляют 60% от всех нейронов, средние нейроны — 12%, а большие — 28%. Тело больших нейронов имеет полигональную или овальную форму, большая его часть занята крупным светлым ядром с хорошо определяемым центрально расположенным крупным ядрышком. Цитоплазма больших нейронов заполнена равномерно распределенной пылевидной хроматофильной субстанцией.

На 15-е сутки эмбриогенеза наблюдается наибольшее разнообразие нейронов по объему их перикариона. При этом большая часть нейронов (45%) содержат ядра малого объема. Тела больших нейронов (их доля составляет 36%) имеют полигональную или круглую форму, цитоплазма заполнена мелкими глыбками хроматофильной субстанции.

У 17-суточных куриных эмбрионов ядра больших нейронов имеют круглую форму, в цитоплазме определяются мелкие глыбки хроматофильной субстанции. Степень гетероморфии нейронов снижается. Возрастает доля больших нейронов, которые вместе с малыми нейронами составляют около 90%.

У 19-суточных куриных эмбрионов ядра больших нейронов имеют овоидную (рис. 1) или круглую форму, чаще занимая центральное положение в теле нейрона. Цитоплазма заполнена крупными глыбками хроматофильной субстанции. В мазках преобладают мелкие нейроны (64%). Они характеризуются светлыми ядрами с хорошо различимыми ядрышками, цитоплазма заполнена мелкими глыбками хроматофильной субстанции. Морфологические показатели нейронов спинного мозга куриных эмбрионов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика нейронов спинного мозга кур в эмбриогенезе ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Сроки эмбриогенеза, сут	Объем ядра, мкм ³	Объем перикариона, мкм ³	Ядерно-цитоплазматическое отношение
10-е	142±5	1155±70	1 : 8
15-е	71,6±2,7	721±37	1 : 10
17-е	113±3	1450±99	1 : 13
19-е	70±3	665±52	1 : 10

В ходе эмбрионального развития среднее содержание ДНК в ядрах моторных нейронов уменьшается. Средняя площадь ядер нейронов

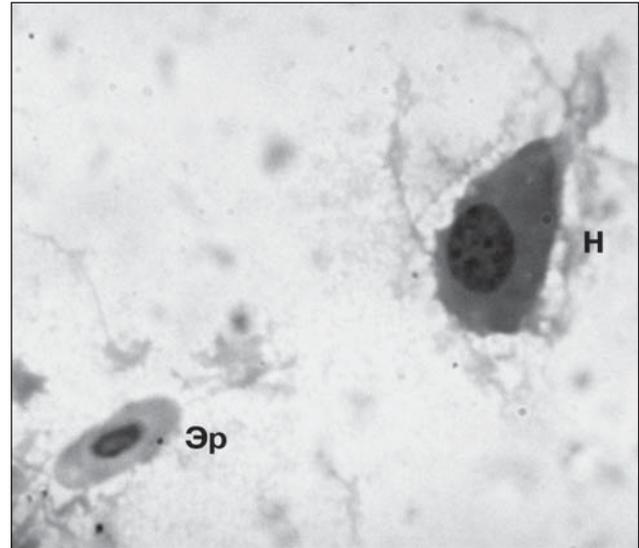


Рис. 1. Изолированный нейрон спинного мозга 19-суточного куриного зародыша.

Н — нейрон; Эр — эритроцит. Крезильовый фиолетовый. Ув. 700.

снижается с 10-х по 15-е сутки развития, далее этот показатель стабилизируется (табл. 2). На 10-е сутки развития количество ДНК в ядрах около 12% больших нейронов выше диплоидного.

Таблица 2

Цитофотометрическая характеристика оптической плотности ядра и содержание ДНК в развивающихся моторных нейронах ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Сроки эмбриогенеза, сут	Оптическая плотность ядра, усл. ед.	Содержание ДНК, усл. ед.	Площадь ядра, мкм ²
10-е	0,0502±0,0005	2,51±0,17	50±4
15-е	0,0502±0,0005	2,00±0,15	38,5±2,1
17-е	0,0502±0,0005	1,93±0,15	38,5±2,2

Результаты исследования свидетельствуют о том, что в эмбриогенезе кур гибель нейронов наиболее выражена на 10-е сутки (рис. 2). У зародышей кур этого срока развития гибнут 58% нейронов. На 15-е сутки эмбриогенеза доля гибнущих нейронов снижается до 40%. На 17–19-е сутки доля гибнущих клеток колеблется в пределах 2–5%.

Обсуждение полученных данных. Гистогенез нервной ткани включает в себя несколько важнейших этапов, одним из которых является дифференцировка. Многие исследователи подчеркивают, что начало специфической дифференцировки в гистогенезе нервной ткани сопровождается массовой гибелью малодифференцированных нервных клеток [12, 14]. В мазках

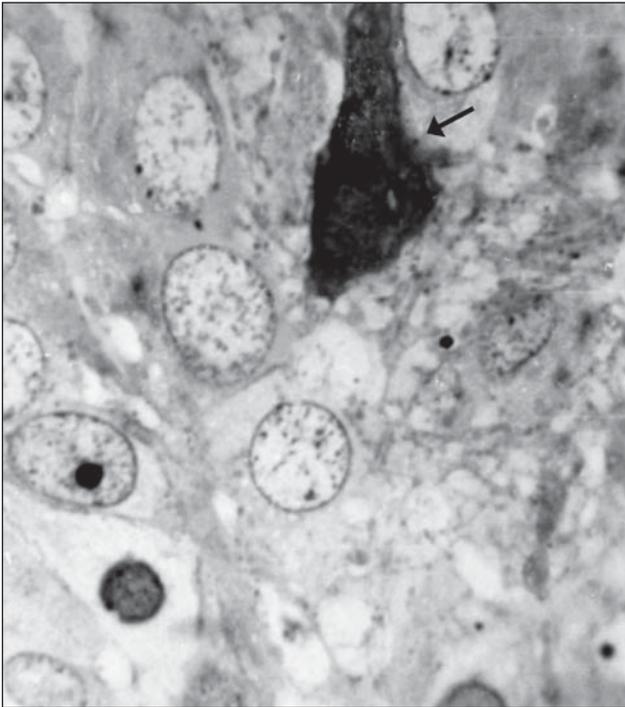


Рис. 2. Гибнущий нейрон (стрелка) 10-суточного куриного эмбриона. Полутонкий срез. Толуидиновый синий. Ув. 1000.

изолированных нейронов во все изученные сроки выявляются гибнущие клетки. Они характеризуются пикнотизированными ядрами, которые контурируются плохо.

Гибель моторных нейронов спинного мозга целесообразно рассматривать с учетом стадии развития скелетной мышечной ткани, особенностей прорастания аксонов в закладку скелетной мышцы и формирования нервно-мышечных контактов. Естественно возникающая гибель клеток является одним из важных компонентов развития тканей. В скелетной мышечной ткани гибель мышечных трубочек рассматривается как составная часть гистогенеза соматической мышечной ткани [2]. Начало формирования двигательной единицы, т.е. установление связи моторного нейрона с мышечной структурой, происходит на стадии мышечной трубочки [1]. Поэтому, вероятно, одной из возможных причин эмбриональной гибели мышечных трубочек и двигательных нейронов является отсутствие структурной связи между ними. Гибель проявляется по завершении пролиферативной фазы гистогенеза и соотносится по времени с началом дифференциации нейроblastов в нейроны, прорастания аксонов в закладку мышцы [1].

В период раннего развития нервной системы позвоночных разные типы нейронов образуются в избыточном количестве, а затем 50% и более ней-

ронов, не установивших контактов с их клетками-мишенями, гибнут [8, 9, 13]. Ряд авторов [11, 12, 14] приписывают обеспечение выживания нейронов в период естественной запрограммированной гибели клеток действию нейротрофических факторов. Считается, что ткани-мишени синтезируют вещества, поступающие к иннервирующим их нейронам.

Выявленные отличия в количестве ДНК отдельных субпопуляций нервных клеток, вероятно, связаны с неодинаковым содержанием в них тетраплоидных клеток.

Анализируя и сопоставляя эмбриональное развитие нейронов спинного мозга куриных зародышей и скелетной мышечной ткани, можно отметить наличие закономерных изменений соотношения процессов пролиферации, дифференциации и клеточной гибели. Клеточная гибель существенно выше в развивающейся нервной ткани по сравнению с гибелью мышечных элементов в развитии скелетной мышечной ткани на сопоставимых стадиях развития [1]. Процессы дифференциации тканей по показателю ядерно-цитоплазменного отношения в мышечных и нервных элементах взаимосвязаны и протекают параллельно. Существует и другая точка зрения, согласно которой в развитии двух тканевых систем существует гетерохрония [1]. В эмбриогенезе по темпам прохождения пролиферативной фазы гистогенеза нервная ткань передних рогов спинного мозга позвоночных и, в частности дифференция нейронов, значительно опережает по времени ту же фазу миогистогенеза. Существованием этой гетерохронии можно объяснить часть явлений, лежащих в основе гибели нейронов. На определенном этапе эмбриогенеза опережающая дифференцировка элементов нервной ткани не получает поддержки со стороны малодифференцированной скелетной мышечной ткани и возникает элиминация нейронов [1].

Анализ результатов, характеризующих закономерность изменения ядерно-цитоплазменного отношения как в миогенезе, так и в нейрогенезе, показал, что на сопоставимых стадиях гистогенеза двух тканей — нервной и скелетной мышечной — процессы дифференциации протекают параллельно [4, 5]. Сказанное выше необходимо учитывать при изучении формирования двигательных единиц в эмбриогенезе позвоночных и человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данилов Р.К. Гистогенетические основы нервно-мышечных взаимоотношений. СПб., изд. ВМедА, 1996.
2. Данилов Р.К. Раневой процесс: гистогенетические основы. СПб., изд. ВМедА им. С.М.Кирова, 2008.

3. Данилов Р.К., Маннапов А.Г. и Ишмеева З.Б. Выявление нервно-мышечных синапсов на изолированных мышечных волокнах. *Арх. анат.*, 1989, т. 96, вып. 4, с. 81–83.
4. Данилов Р.К., Мурзабаев Х.Х., Одинцова И.А. и Елагина Э.А. Миосателлитоциты как источник регенерации скелетной мышечной ткани. *Успехи соврем. биол.*, 2002, т. 122, № 3, с. 272–280.
5. Одинцова И.А., Слуцкая Д.Р. и Чепурненко М.Н. Дифференцировка мышечных волокон в ходе формирования нервно-мышечных взаимоотношений. *Морфология*, 2008, т. 133, вып. 2, с. 98–99.
6. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., МедиаСфера, 2006.
7. Юнкеров В.И. и Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб., изд. ВМедА, 2002.
8. Anlar B., Sullivan K.A. and Feldman E.L. Insulin-like growth factor-I and central nervous system development. *Horm. Metab. Res.*, 1999, v. 31, № 2, p. 120–125.
9. Eberhart C.G. In search of the medulloblast: neural stem cells and embryonal brain tumors. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 2007, v. 18, № 1, p. 59–69.
10. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C. National Academy press, 1996.
11. Korsching S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J. Neurosci.*, 1993, v. 13, № 7, p. 2739–2748.
12. Oppenheim R.W. Cell death during development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.*, 1991, v. 14, № 2, p. 453–501.
13. Raff M. C., Barres B.A., Bume J.F. et al. Programmed cell death the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, 1993, v. 262, № 5291, p. 695–700.
14. Sedel F., Bechadde C., Vyas S. and Triller A. Macrophage-derived tumor necrosis factor α , an early developmental signal for motoneuron death. *J. Neurosci.*, 2004, v. 24, № 9, p. 2236–2246.

Поступила в редакцию 30.09.08
Получена после доработки 26.03.09

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF SPINAL CORD NEURONS IN CHICK EMBRYO DEVELOPMENT

I.A. Odintsova and D.R. Slutskaya

The objective of this study was to characterize morphologically the spinal cord neurons in Highsex-White Cross E-21 chick embryos at developmental days 10, 12, 15, 17 and 19. The total of 125 chick embryos were used. The study of the isolated neurons demonstrated the consistent changes of nucleocytoplasmic ratio and nuclear DNA content. Based on the perikaryon volume, three subpopulations of neurons were distinguished during the embryogenesis: small, medium, and large. This is indicative of heteromorphism. The differentiation of the neurons was characterized by a gradual reduction of the nuclear and perikaryon volumes and by the increase of nucleocytoplasmic ratio. The beginning of the differentiation in the histogenesis of the nervous tissue was accompanied by the massive death of undifferentiated nervous cells, which was most pronounced at developmental day 10, when 58% of neurons were eliminated; later this parameter was reduced to 2–5% (embryonic days 17–19).

Key words: *embryogenesis, spinal cord, neurons, alkaline dissociation, morphometry.*

Department of Histology and Embryology, Military Medical Academy, St. Petersburg