

© В.В. Порсева, В.В. Шилкин, 2011
УДК 611.8

В.В. Порсева и В.В. Шилкин

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ И ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛАСТЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ НЕЙРОНОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО УЗЛА СПИНОМОЗГОВОГО НЕРВА И ШЕЙНО-ГРУДНОГО УЗЛА СИМПАТИЧЕСКОГО СТВОЛА КРЫСЫ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.В. Шилкин), Ярославская государственная медицинская академия,
e-mail: vvporseva@mail.ru

Проведено исследование характера топографии нейронов в шейном чувствительном узле спинномозгового нерва и шейно-грудном узле симпатического ствола у взрослых крыс ($n=12$). Результаты работы показали, что этим органам свойственна неоднородность нейронов по морфометрическим (окраска тионином по Нисслю) и гистохимическим (определение активности ацетилхолинэстеразы, NADPH-диафоразы) параметрам. Выявлена общность организации узлов, которая проявилась кластерным характером топографии нейронов. Кластеры формируются по принципу разнородности, объединяя от 3–4 до 9–10 нейронов. Использование комбинированного гистохимического метода позволило идентифицировать гистофункциональные особенности нейронов в составе кластеров изученных узлов, выявляемые и обычными гистологическими методами.

Ключевые слова: чувствительный узел спинномозгового нерва, узел симпатического ствола, нейроны, кластеры, гистохимия

При использовании различных методов исследования в узлах периферической нервной системы отмечена неоднородность нейронов по размерам, числу отростков, их диаметру, характеру хроматофильного вещества, по содержанию различных белков, липидов, ферментов, медиаторов [1, 5, 12–14]. При изучении топографии нейронов показано, что для части узлов типичным является топический принцип их локализации, т.е. топографическая общность нейронов, отростки которых формируют конкретную ветвь узла и связаны с общей мишенью иннервации [3, 10, 11]. В то же время установлено, что ацетилхолинэстеразопозитивные и адренергические нейроны шейно-грудного узла симпатического ствола, NADPH-диафороазо-позитивные нейроны интрамуральных узлов, спинного мозга [5–8] образуют кластеры, объединяющие нейроны с различными морфофункциональными характеристиками.

К сожалению, разные объекты и задачи исследований не дают возможности обобщить имеющиеся данные и сопоставить нейроны выявляемых кластеров по морфологическим и гистофункциональным параметрам.

Цель данного исследования — выявление характера топографии нейронов по морфометрическим и гистохимическим характеристикам в чувствительном шейном узле (ШУ) спинномозгового нерва и шейно-грудном узле (ШГУ) симпатического ствола.

Материал и методы. Для исследования были использованы половозрелые белые крысы-самки линии Вистар в возрасте 90 сут ($n=12$), находившиеся в стандартных условиях клеточного содержания. Животных выводили из опыта с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Изучали гистохимические особенности нейронов ШГУ симпатического ствола и 6-го ШУ спинномозгового нерва. Использовали следующие методы: окраску тионином по Нисслю; выявление активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) методом с тиюксусной кислотой [4]; выявление активности NADPH-диафоразы тетразолиевым методом [2]. Кроме того, применяли комбинированный метод выявления в нейронах активности АХЭ и NADPH-диафоразы. Для определения сочетанной локализации АХЭ и NADPH-диафоразы выделенные узлы фиксировали в 4% растворе параформальдегида на 0,1 молярном фосфатном буфере (рН 7,4) при 4 °С в течение 2 ч, после чего промывали в 15% растворе сахарозы (рН 7,4) в течение 24 ч. Из фиксированного материала с помощью криостата готовили срезы толщиной 20 мкм, которые инкубировали в средах, предусмотренных указанными выше методиками. Инкубированные срезы промывали двукратно в дистиллированной воде и обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа МБИ-15У4.2 (ЛОМО, Россия) с установленной цифровой фотокамерой Olympus Camedia C4000 Zoom с фотоадаптером Olympus C3040-ADUS (Olympus, Япония). На цифровых изображениях гистологических препаратов узлов при увеличении 400 с использованием программы Image J (НИН, США) оценивали максимальный диаметр тел нейронов и оптическую плотность окраски среза, которую выражали в условных единицах (усл. ед.). Анализу подлежали только те нейроны,

у которых срез прошел через ядро, а окраска превышала фоновую в 1,5 раза.

Нейроны узлов по их максимальным диаметрам разделяли на следующие размерные классы: 10–29 мкм (очень малые), 30–39 мкм (малые), 40–49 мкм (средние), 50–59 мкм (крупные), 60 — более 70 (очень крупные).

Полученные количественные данные обрабатывали, используя программу STATISTICA® (Data analysis software system, StatSoft, Inc. 2007), версия 8.0. Вычисляли медианы и квартильные отклонения — $Me (Q_1-Q_{99})$. При сравнении независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна — Уитни. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. При сравнении нейронов чувствительного и симпатического узлов при окраске по Ниссли выявлена неоднородность клеточного состава по размерам. При этом в ШУ спинномозгового нерва нейроны были крупнее — в среднем 30,2 мкм (22,5–36,8 мкм), чем в ШГУ симпатического ствола — в среднем 20,8 мкм (17,1–23,2 мкм). В ШУ крупные нейроны составили 9%, нейроны средних размеров — 32%, малых размеров — 42%. Часть нейронов ШУ были очень крупного размера и составили 4% или очень малого размера — 13%. В ШГУ нейроны средних размеров составили 8%, малых размеров — 47%, очень малого размера — 45%, при этом нейронов крупных размеров не было.

Таким образом, в ШУ преобладали нейроны малых и средних размеров, тогда как в ШГУ нейроны были представлены малыми и очень малыми. Общим для обоих узлов явилось различное сродство нейронов к красителю, а также очаги их «выпадения», т.е. невосприятие красителя (рис. 1, а, б). Существенным для нейронов ШУ и ШГУ оказалось их групповое, кластерное расположение. Состав кластеров был различен как по числу, так и по размерам клеток. На сопоставимой площади среза в каждой группе можно насчитать от 3–4 до 9–10 нейронов различной величины, от малых до крупных размеров (см. рис. 1, в).

Гистохимическое выявление АХЭ и NADPH-диафоразы подтвердило описанные выше особенности топографии нейронов в изученных узлах и позволило дать им функциональную характеристику.

В ШУ активность АХЭ в части нейронов, особенно в крупных, не отличалась от фоновой или была даже слабее нее — в среднем 50,9 усл. ед. (46,2–52,3 усл. ед.) Часть нейронов средних и малых размеров (7–8%) обладали активностью АХЭ — в среднем 60,7 усл. ед. (58,4–63,7 усл. ед.) (рис. 2, а). Гистохимическое выявление NADPH-диафоразы в ШУ также показало различие нейронов по её активности: только часть клеток (4–5%) имели высокую ферментативную активность,

которая составила в среднем 67,0 усл. ед. (64,7–69,0 усл. ед.) Как правило, диафоразо-позитивные нейроны имели средние и малые размеры (см. рис. 2, б).

Как видно, применяемые гистохимические методы позволили выявить в чувствительном ШУ спинномозгового нерва АХЭ-негативные клетки, NADPH-диафоразо-негативные клетки, АХЭ-позитивные клетки, NADPH-диафоразо-позитивные клетки.

Комбинированный метод позволил определить сочетанную локализацию активности АХЭ и NADPH-диафоразы и показать (см. рис. 2, в), что в части нейронов, как правило, в крупных, не определялись активность ни АХЭ, ни NADPH-диафоразы, в других нейронах — обычно малых и средних выявлялась только активность АХЭ или NADPH-диафоразы, либо определялась активность как АХЭ, так и NADPH-диафоразы. Независимо от метода выявления ферментативной активности в нейронах ШУ проявлялась отчетливая их группировка. При этом в состав кластера включались нейроны, разные по размерам и ферментативной активности.

В ШГУ активностью АХЭ обладали 10–12% нейронов. Как правило, они относились к клеткам малого и среднего размеров и располагались группами по 5–6 клеток, обладающих различной ферментативной активностью. Активность NADPH-диафоразы в нейронах ШГУ не выявлялась. Результаты применения комбинированной методики определения активности АХЭ и NADPH-диафоразы воспроизводят картины, практически аналогичные таковым при изолированном выявлении АХЭ (рис. 3, а–в).

Таким образом, в ШГУ выявлялись нейроны, обладающие активностью АХЭ, и нейроны, не обладающие активностью ни АХЭ, ни NADPH-диафоразы, что подтверждается и использованным комбинированным методом.

Обсуждение полученных данных. Исследование строения, гистохимической характеристики нейронов чувствительного ШУ спинномозгового нерва и ШГУ симпатического ствола показало, что в обоих органах они неоднородны по тинкториальным свойствам, мерным параметрам, ферментативной активности.

Примененный метод Ниссли выявил различное сродство нейронов к красящему веществу, вплоть до его невосприятия — «выпадения» части клеток [9]. Исползованные гистохимические методы и избранный подход к оценке результатов позволили показать, что активностью АХЭ в ШУ спинномозгового нерва обладают 7–8% клеток, активностью NADPH-диафоразы — 4–5% клеток.

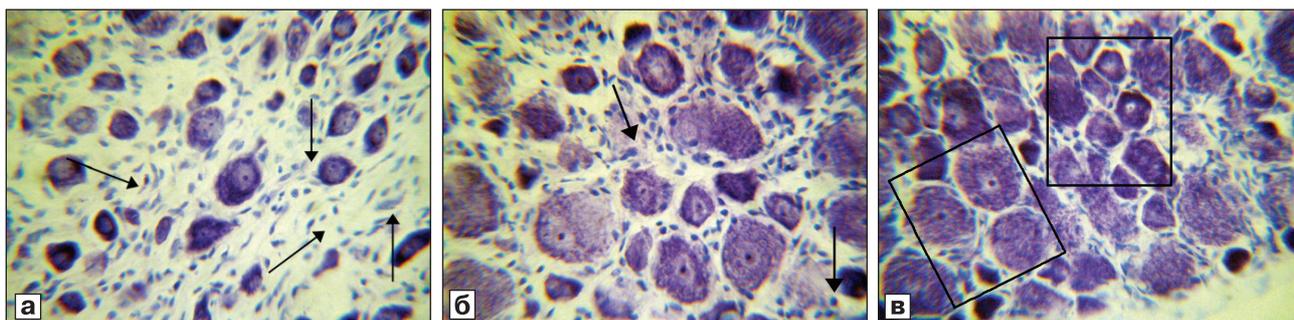


Рис. 1. Нейроны шейно-грудного узла симпатического ствола (а) и шейного чувствительного узла спинномозгового нерва крысы (б, в).

Стрелки — места «выпадения» нейронов. Здесь и на рис. 2, 3: квадратами очерчены кластеры нейронов. Окраска тионином по Нисслю. Об. 40, ок. 7.

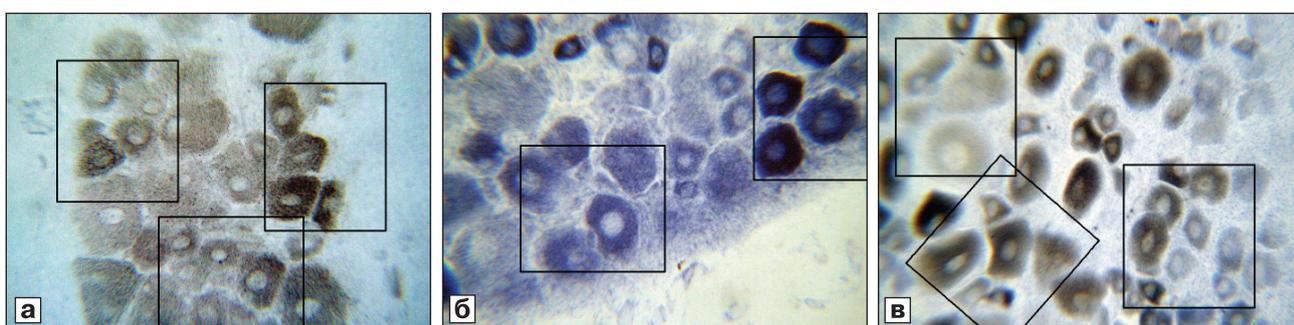


Рис. 2. Нейроны шейного чувствительного узла спинномозгового нерва крысы.

а — реакция на ацетилхолинэстеразу; б — реакция на NADPH-диафорузу; в — комбинированная гистохимическая реакция. Об. 40, ок. 7.

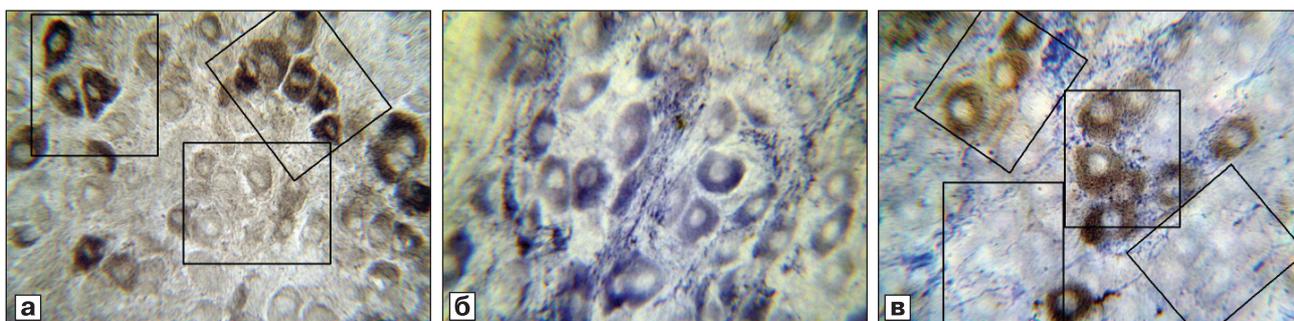


Рис. 3. Нейроны шейно-грудного узла симпатического ствола крысы.

а — реакция на ацетилхолинэстеразу; б — реакция на NADPH-диафорузу; в — комбинированная гистохимическая реакция. Об. 40, ок. 7.

При этом для части клеток характерна сочетанная локализация АХЭ и NADPH-диафоразы. Факт сочетанной локализации различных ферментов, нейромедиаторов, нейромодуляторов в настоящее время известен и не вызывает сомнений, но сочетанная локализация АХЭ и NADPH-диафоразы отсутствует в ШГУ симпатического ствола, где 10–12% нейронов обладают активностью АХЭ, а активность NADPH-диафоразы отсутствует. Возможно, это подтверждает мнение, что адре-

нергические структуры лишены NO-синтазной активности [5, 15].

Существенным является общность нейронной организации чувствительных и симпатических узлов, которая проявляется в кластерном характере их топографии. Кластерный принцип топографии нейронов в узлах отмечался и ранее. Так, описана кластерная локализация АХЭ-позитивных нейронов в ШГУ у различных животных и человека [4, 10], исследования сочетанной локализа-

ции нейропептидов в пара-, превертебральных и чувствительных узлах также свидетельствуют о кластерном характере топографии нейронов [13, 16, 17]. Проведенное исследование свидетельствует о том, что кластеры формируются по принципу разнородности: в обоих исследованных узлах кластеры образуют ферменто-негативные нейроны, ферменто-позитивные нейроны средних и малых размеров, а в ШУ спинномозгового нерва — нейроны, в которых выявляется как активность АХЭ, так и NADPH-диафоразы.

С позиций функции неоднородный состав кластеров может служить иллюстрацией надежности биологической системы, обладающей максимальной степенью свободы изменения своего состояния. Не случайно морфологически выделяются продольно ориентированные пластины серого вещества спинного мозга, колонки коры большого мозга, ядра ствола головного мозга.

Работа поддержана РФФИ, гранты 08-04-00470, 10-04-00509; ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

ЛИТЕРАТУРА

- Берсенев В.А. Нейронный состав шейных спинномозговых узлов. В кн.: Шейные спинномозговые узлы. М., Медицина, 1980, с. 34–73.
- Лилли Р. Ферменты. В кн.: Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., Мир, 1969, с. 349–354.
- Маслюков П.М., Корзина М.Б., Емануйлов А.И. и Шилкин В.В. Нейромедиаторный состав нейронов краниального шейного и чревного симпатических узлов в постнатальном онтогенезе. Морфология, 2009, т. 135, вып. 1, с. 30–34.
- Николаев Г.М. и Шилкин В.В. Опыт определения активности ацетилхолинэстеразы в структурах периферической нервной системы. В кн.: Проблемы морфогенеза периферических нервов. Ярославль, изд. ЯГМИ, 1983, с. 64–72.
- Ноздрачев А.Д. и Фатеев М.М. Морфология звездчатого ганглия. Нейронная организация звездчатого ганглия. В кн.: Звездчатый ганглий. Структура и функция. СПб., Наука, 2002, с. 12–73.
- Порсева В.В. и Шилкин В.В. NADPH-диафороазо-позитивные структуры спинного мозга и спинномозговых узлов. Морфология, 2010, т. 137, вып. 2, с. 13–17.
- Пущина Е.В., Варакин А.А. и Калинина Г.Г. Цитоархитектоника и особенности нитроксидагической организации спинного мозга костистых рыб. Цитология, 2007, т. 49, вып. 6, с. 460–469.
- Чусовитина С.В. и Варакин А.А. Нитроксидагическая иннервация пищеварительного тракта японского анчоуса. Морфология, 2003, т. 123, вып. 3, с. 50–52.
- Шуклин А.В. и Швалев В.Н. NO-синтаза во внутрисердечных ганглиях человека в норме и при ишемии миокарда. Морфология, 2006, т. 129, вып. 3, с. 34–36.
- Anderson R., Morris J. and Gibbins I. Neurochemical differentiation of functionally distinct population of autonomic neurons. J. Comp. Neurol., 2001, v. 429, p. 419–435.
- Emanuilov A.I., Shilkin V.V., Nozdrachev A.D. and Masliukov P.M. Afferent innervation of the trachea during postnatal development. Auton. Neurosci., 2005, v. 120, p. 68–72.
- McLain R.F. and Weinstein J.N. Morphometric model of normal rabbit dorsal root ganglia. Spine, 1993, v. 1, №18, p. 1746–1752.
- Miyata H., Jozaki A., Tokuriki M. and Kawai Y. Metabolic properties of the sensory neurons in the rat dorsal root ganglion. Arch. Ital. Biol., 1997, v. 135, № 3, p. 263–271.
- Rybarova S., Kluchova D., Schmidtova K. and Lovasova K. Nitregicke struktury v spinalnych gangliach Kralika. Bratisl. Lek Listy, 1999, v. 100, № 10, p. 537–540.
- Santer R.M. and Symons D. Distribution of NADPH-diaphorase activity in rat paravertebral, prevertebral and pelvic sympathetic ganglia. Cell Tissue Res., 1993, v. 271, № 1, p. 115–121.
- Smith G.D., Seckl J.R. and Harmar A.J. Distribution of neuropeptides in dorsal root ganglia of the rat; substance P, somatostatin and calcitonin gene-related peptide. Neurosci. Lett., 1993, v. 16, № 153, p. 5–8.
- Zhou X.F., Cameron D. and Rush R.A. Endogenous neurotrophin-3 supports the survival of a subpopulation of sensory neurons in neonatal rat. Neuroscience, 1998, v. 86, № 4, p. 1155–1164.

Поступила в редакцию 14.10.10

MORPHOMETRIC AND HISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF CLUSTER ORGANIZATION OF THE NEURONS OF RAT SPINAL NERVE SENSORY GANGLION AND OF SYMPATHETIC TRUNK CERVICOTHORACIC GANGLION

V.V. Porseva and V.V. Shilkin

The topographic pattern of neurons in spinal nerve sensory ganglion and of sympathetic trunk cervicothoracic ganglion was investigated at adult rats (n=12). Results of the work have shown, that these organs are characterized by a heterogeneity of the neurons according to their morphometric (Nissl's stain) and histochemical (acetylcholinesterase and NADPH-diaphorase activity) parameters. The common feature of ganglia organization was demonstrated by the clustered pattern of neuron topography. Clusters were formed on a principle of heterogeneity, uniting from 3–4 to 9–10 neurons. The application of a combined histochemical method has allowed to identify the histo-functional characteristics of neurons within the clusters of the ganglia studied, which were also detected by standard histological methods.

Key words: *spinal nerve sensory ganglion, sympathetic trunk cervicothoracic ganglion, neurons, clusters, histochemistry*

Department of Human Anatomy, Yaroslavl State Medical Academy