

Н.Ю. Васягина, О.С. Сотников и Е.А. Гендина

СОКРАЩЕНИЕ ТРАВМИРОВАННЫХ ОТРОСТКОВ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона (зав. — проф. О.С. Сотников),
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: sotnikov@kolt.infran.ru

Исследования проводили на живых изолированных нейронах моллюска (*Limnaea stagnalis*). Целью исследования было изучение сократительной активности травмированных отростков нейронов. Ретракция последних в растворе Рингера была обнаружена в 90% случаев. Маркером сокращения служило характерное булавовидное образование, колба ретракции. Скорость сокращения отростков колебалась у разных нейронов от 0,03 до 9 мкм/мин. Увеличение диаметра отростка при обычном линейном сокращении происходило в среднем на 35%, а увеличение объема тела клетки — в среднем на 30%. Были выделены 3 формы сократительной активности: линейное сокращение, изометрическое сокращение (уменьшение толщины отростка при неизменной его длине) и смешанная форма сокращения. Высказано предположение, что механизм ретракции участвует в формировании диастаза при перерезке нервов и при повреждении проводящих путей мозга. Диастаз нерва формируется не только за счёт эластических свойств его соединительнотканых оболочек и глии, но и за счёт ретракции нервных волокон.

Ключевые слова: *изолированные живые нейроны, отростки, ретракция, Limnaea stagnalis*

Последнее время двигательная активность отростков нервных клеток привлекает все большее внимание как с теоретических позиций, так и с точки зрения практической неврологии. Описаны двухфазность развития отростков нейронов [9, 17], ретракция нервных волокон в норме и при всевозможных химических воздействиях [1, 15, 19]. Различные способы предотвращения ретракции центральной культи прерванного отростка нервной клетки [2, 6] становятся актуальной темой нейробиологических исследований. Имеются работы, посвященные изучению коллапса и ретракции конуса роста [16, 18]. Отмечено, что ретракция дендритов тормозит образование синапсов [11]. Некоторые авторы считают, что сокращение отростков нервных клеток — решающий процесс во время развития нервной системы и при патологии [14].

Показано, что движущей силой ретракции отростка нервной клетки является активация коркового актина миозином II [8, 12]. Известно, что морфологическими индикаторами ретракции являются грушевидные расширения терминалей прерванных волокон, «колбы ретракции» [3, 5, 6].

Исследуются механизмы сокращения и его регуляции [7, 10]. Однако некоторые детали описания феномена по-прежнему отсутствуют. Высказано предположение, что механизм ретракции участвует в формировании диастаза при перерезке нервов и при повреждении проводящих путей мозга. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение особенностей сократительной активности травмированных живых отростков нейронов.

Материал и методы. Исследования проведены на живых нейронах 60 моллюсков *Limnaea stagnalis*, взятых из пруда. Перед выделением ганглиев разрушали раковину животного и фиксировали его иглами. Для извлечения мозга бранши глазных ножиц вводили в ротовое отверстие, вскрывали пищевод, окружающие ткани, расположенные дорсальнее, и обнажали окологлоточное нервное кольцо. Нервы, идущие от ганглиев кольца, тщательно обрезали. Кольцо переносили в раствор Рингера для моллюсков, который содержал: 90 ммоль NaCl, 5 ммоль KCl, 2 ммоль CaCl₂, 1,5 ммоль MgCl₂. Ганглии помещали в 0,4% раствор лиофилизированной проназы (Serva, США) на 40 мин, затем отмывали от протеолитического фермента в растворе Рингера.

После ферментативной обработки оболочки ганглия удаляли тонкими препаровальными иглами под микроскопом МБС-1 (ЛОМО, СССР). Затем ганглии помещали на часовое стекло в небольшое количество раствора Рингера и проводили пипетирование с помощью Г-образных стеклянных микропипеток разного диаметра. Выделенную таким способом суспензию нейронов и погибших глиоцитов много раз промывали раствором Рингера для моллюсков. В результате выделялось много одиночных нейронов с отростками, длина которых достигала 300 мкм и более.

Вокруг капли с нейронами смесью вазелина и парафина делали валик. Полученную камеру сверху покрывали прозрачным стеклом. Такая камера защищала раствор Рингера от испарения и обеспечивала хороший фазовый контраст для наблюдения.

Живые изолированные нейроны исследовали в фазовом контрасте с помощью компьютерной микровидеоустановки. Поведение нейронов регистрировали с помощью видеокамеры DCM300 (Shangarao TeleView Optical Instruments Co., Ltd., Китай), присоединенной к кинотубусу инвертированного микроскопа БИОМЕД-3И ФК (БИОМЕД, Россия).

Принимая общее количество исследованных нейронов за 100%, определяли долю нейронов, у которых происходило сокращение отростков. Длину аксонов и их диаметр измеряли с помощью программы для анализа изображений Image J. Далее изменяющуюся длину отростка сравнивали

покадрово. Затем по формуле ($v = \Delta L_n / \Delta T_n$, мкм/мин) высчитывали скорость в данный небольшой промежуток времени. Далее определяли среднюю скорость ретракции отростка в течение всего опыта. Также были определены изменения объема тела нейронов в процессе сокращения их отростков, в зависимости от формы тела клеток использовали формулы: для вычисления объема эллипсоида: $V = \frac{4}{3} \pi abc$ (мкм³), для вычисления объема шара: $V = \frac{4}{3} \pi R^3$ (мкм³).

Результаты исследования. Среди одиночных нейронов выявлялось много клеток с поврежденными отростками, которые обнаруживали способность к ретракции (рис. 1). Эти клетки имели эллипсоидную форму, четкий, ровный, высококонтрастный контур тела. Они оценивались как жизнеспособные. Однако встречались клетки, имеющие угловатый слабоконтрастный контур, которые являлись нежизнеспособными (рис. 2).

У выделенных нейронов иногда отмечалось ветвление основных отростков. Длина исследованных отростков обычно была не менее 200 мкм. Активнее и быстрее сокращались более тонкие вторичные отростки (рис. 3).

Место разрыва отростка нейрона имело ровный вид, вытянутую (см. рис. 2, а) или овальную форму. Часть клеток были полностью лишены отростков. Такие нейроны имели шаровидную форму. Эллипсоидная форма тела клеток определялась отходящими от него отростками.

При наблюдении за поведением отростков нервных клеток в течение 3–10 мин была обнаружена их сократительная активность. При ретракции отростка эллипсоидная форма тела клетки менялась на шаровидную. В растворе Рингера сократительная активность отростков нервных клеток отмечена в 90% случаев. Вначале обычно происходило постепенное округление концевого отдела отростка. В дальнейшем здесь формировалось булавовидное образование, колба ретракции (рис. 4).

Она является маркером места сокращения и характеризует начало ретрактивной активности отростка. Отсутствие ретракции у 10% отростков, видимо, объясняется значительной травмой препарата.

Скорость сокращения отростков резко колебалась у разных нейронов от 0,03 до 9 мкм/мин. Поэтому можно было выделить три группы нейронов, отличающихся по скорости сокращения: 1-я группа — с минимальной скоростью 0,01–0,09 мкм/мин — 15,7%; 2-я группа — со средней скоростью 0,1–0,9 мкм/мин — 55%; 3-я группа — с максимальной скоростью 1,0–9 мкм/мин — 29,3%. Скорость сокращения отростков до полного втягивания в тело нейрона не зависела от их исходной длины. Скорость изменялась и в ходе одного опыта: сокращение происходило с замедлениями, остановками и небольшими ускорениями. У двухотростчатых нейронов сокращение отростков начиналось неодновременно, протекало асинхронно и имело различную скорость (см. рис. 1). Скорость сокращения не зависела от начального диаметра отростка.

Чаще всего отросток полностью втягивался в тело клетки (см. рис. 1). Такое сокращение мы называем линейным сокращением (см. рис. 4). Уменьшение длины отростка сопровождалось его утолщением. Увеличение диаметра отростка на 9–66% (в среднем на 35%) в процессе его сокращения происходило в 82,4% случаев, а в 17,6% случаев оно отсутствовало. В процессе сокращения отростка отмечалось увеличение объема тела клетки на 2–57% (в среднем на 30%).

Нередко сокращение отростка проявлялось своеобразным способом, когда его длина оставалась почти неизменной, но резко уменьшалась масса его нейроплазмы, которая перемещалась в тело клетки. Отросток истончался, объем его уменьшался, т.е. наблюдалось объемное сокращение, которое мы называем изометрическим сокращением (рис. 5). Ярким показателем сокращения таких волокон было также перемещение цитоплазматических варикозностей по направлению к телу нейрона.

Изометрическое сокращение отростков наиболее наглядно прослеживалось в том случае, когда отросток и тело клетки были прикреплены к субстрату. По всей видимости, вначале перемещаются поверхностные, более жидкие, слои нейроплазмы. Наружные слои отростка перемещаются

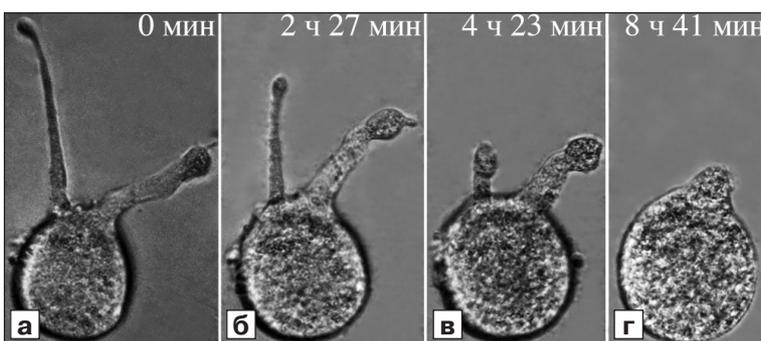


Рис. 1. Медленная сократительная реакция травмированных отростков нейрона моллюска. а–г — стадии процесса (видны утолщение ретрагирующих отростков и плотная осевая структура отростка, сокращение которой задерживается). Время — от начала наблюдения. Об. 40ФК, ок. 10.

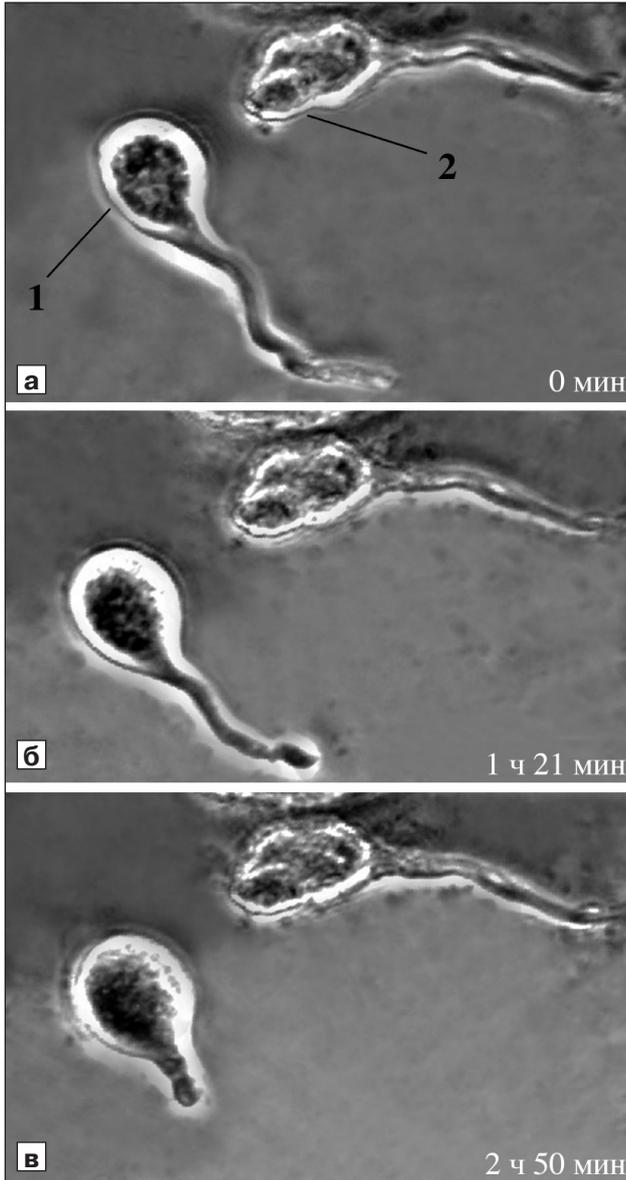


Рис. 2. Различия формы и поведения живого (1) и мертвого (2) изолированных нейронов.

а-в — стадии ретракции живого отростка и отсутствие сокращения у сильно поврежденного нейрона. Время — от начала наблюдения. Об. 40ФК, ок. 10.

быстрее центральных. При этом на конце отростка (см. рис. 1, б) обнажается более устойчивый, по-видимому, цитоскелетный, филаментозно-тубулярный аксиальный тяж. Также можно выделить смешанный тип сокращения, при котором происходит диффузное перемещение массы нейроплазмы в тело клетки с уменьшением диаметра отростка и изменяется его длина (рис. 6).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, проведенные прижизненные исследования позволили нам выделить три формы сокращения нервных отростков. Помимо обычного линейного сокращения, которое сопрово-

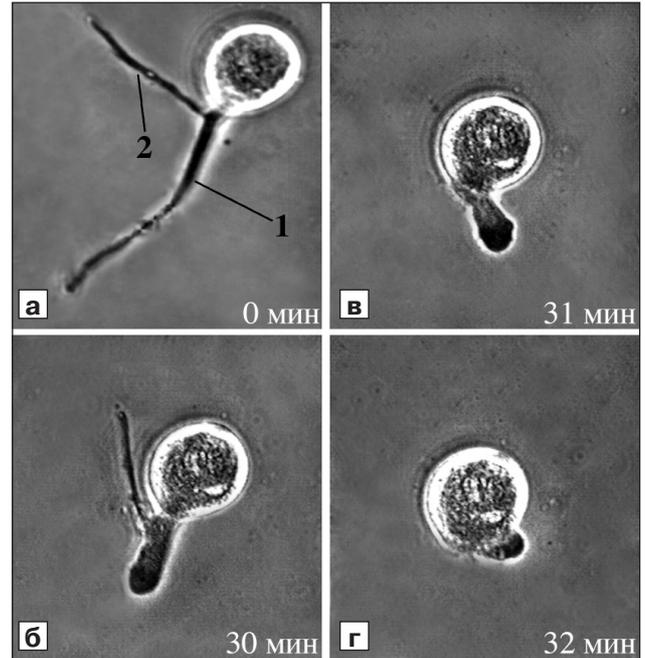


Рис. 3. Неравномерная скорость сокращения первичного (1) и вторичного (2) отростков одного и того же нейрона.

а-г — стадии процесса быстрого сокращения отростков. Время — от начала наблюдения. Об. 40ФК, ок. 10.

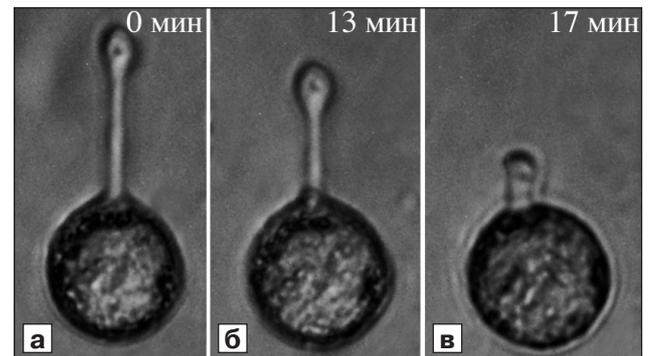


Рис. 4. Колба ретракции при быстром сокращении отростка нейрона.

а-в — стадии процесса. Время — от начала наблюдения. Об. 40ФК, ок. 10.

ждается изменением длины отростка, нами выявлено своеобразное изометрическое сокращение, которое характеризуется изменением его объема при сохранении длины, а также смешанная форма сокращения. При многочисленных исследованиях валлеровской дегенерации неоднократно отмечалась так называемая ретроградная дегенерация отдельных нервных волокон центральной культуры перерезанного нерва или нервного тракта ЦНС [4, 6, 13]. Разные авторы именовали этот вид дегенерации по-разному: «факультативная дегенерация», «первичная дегенерация», «травмирующая дегенерация», ретроградная атрофия, «axon die-back» и др. [4, 6].

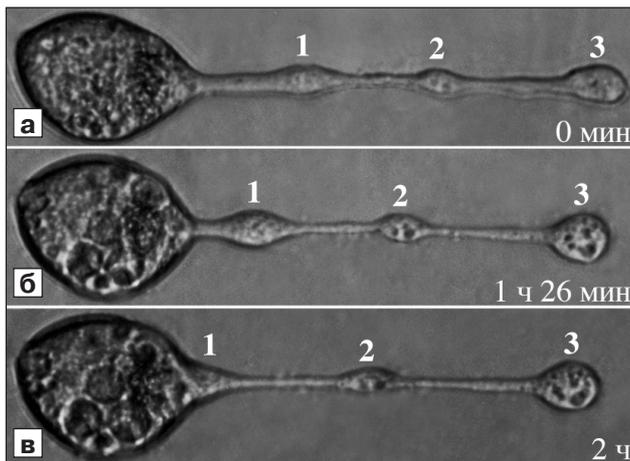


Рис. 5. Изометрическая форма сокращения отростка нейрона (уменьшение объема при неизменной длине).

а-в — стадии процесса. 1, 2 — перемещающиеся цитоплазматические варикозности; 3 — изменяющаяся форма колбы ретракции. Время — от начала наблюдения. Об. 40ФК, ок. 10.

Отмеченный нами процесс ретроградного сокращения существенно отличается от ретроградной дегенерации. Во-первых, он протекает в первые десятки минут после травмирования отростка нейрона, тогда как ретроградная дегенерация отмечается не ранее 10–20-х суток после операции, уже после полного развития валлеровской дегенерации в периферической части нерва. Во-вторых, ретроградная дегенерация сопровождается атрофией волокон с уменьшением их диаметра. В-третьих, механизм ретроградной дегенерации связывают с реакцией поврежденного тела нейрона, а ретракция отростков нейрона может развиваться и независимо от его тела в изолированных отростках. Скорее всего, это совершенно разные независимые процессы. Ретракция происходит, видимо, всех травмированных волокон, а ретроградная дегенерация — только некоторых, и в случае, если травма волокна располагается вблизи от тела нейрона.

В наших опытах сокращение терминальных отделов прерванных отростков с образованием колб ретракции начиналось почти сразу после начала опыта, через 10–15 мин после выделения

нейронов с отростками. По данным Т.С. Dickson и соавт. [5], колбы ретракции в коре большого мозга взрослого млекопитающего развивались спустя 2–3 ч после ее поперечного сечения, что также не совпадает по срокам с ретроградной дегенерацией. Таким образом, процесс ретракции с образованием колб ретракции не может рассматриваться, вопреки мнению Р. Freund и соавт. [6], как ретроградная дегенерация.

Мы полагаем, что проведенные исследования ретракции отростков нейронов при их травме у моллюсков позволяют предположить наличие подобного процесса у позвоночных, что представляется весьма важным для объяснения механизмов формирования диастаза между центральной и периферической частями нервов или проводящих трактов мозга при их пересечении. Есть надежда, что поиски фармакологических препаратов, блокирующих ретракцию прерванных отростков нейронов, могут помочь в практике уменьшения диастазов и облегчении процессов регенерации.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 10-04-90000-Bel_a и № 11-04-0093.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сотников О.С. Статика и структурная кинетика живых асимпатических дендритов. СПб., Наука, 2008.
2. Сотников О.С., Васягина Н.Ю., Рыбакова Г.И. и Челур С.В. Попытка ингибирования сокращения нервных отростков в среде, лишенной ионов кальция. Бюл. exper. биол., 2010, т. 149, № 2, с. 232–235.
3. Сотников О.С., Рыбакова Г.И., Арчакова Л.И. и Лукашин В.Г. Индикаторы роста и ретракции нейритов в культуре ткани и на гистологических препаратах. Бюл. exper. биол., 2006, т. 142, № 8, с. 227–232.
4. Cole M. Retrograde degeneration of axon and soma in the nervous system. In: The Structure and Function of Nervous Tissue. v. 1, New York, London, Acad. Press, 1968, p. 269–300.
5. Dickson T.C., Chung R.S., McCormack G.H. et al. Acute reactive and regenerative changes in mature cortical axons following injury. Neuroreport, 2007, v. 18, № 3, p. 283–288.
6. Freund P., Wannier T., Schmidlin E. et al. Anti-NogoA antibody treatment enhances sprouting of corticospinal axons rostral to a unilateral cervical spinal cord lesion in adult macaque monkey. J. Comp. Neurol., 2007, v. 502, № 4, p. 644–659.
7. Fukushima N., Weiner J.A., Kaushal D. et al. Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic

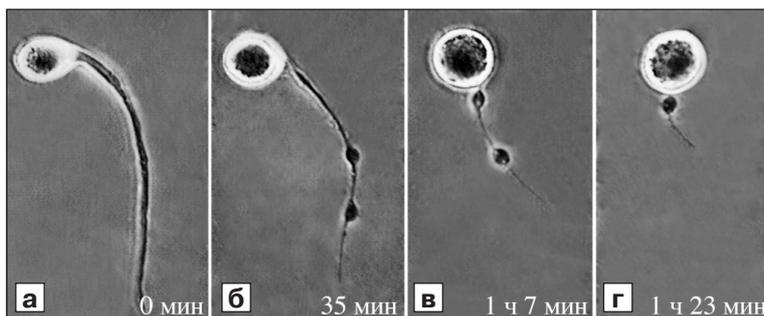


Рис. 6. Смешанная форма сокращения отростка нейрона с уменьшением и толщины, и длины отростка.

а-г — стадии процесса. Время — от начала наблюдения. Об. 40ФК, ок. 10.

- cortical neurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2002, v. 20, № 2, p. 271–282.
8. Galo G. Myosin II activity is required for severing-induced axon retraction in vitro. *Exp. Neurol.*, 2004, v. 189, p. 112–121.
 9. Hebbar S. and Fernandes J.J. A role for FasII in the stabilization of motor neuron branches during pruning in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 2005, v. 285, № 1, p. 185–199.
 10. Hu T., Shi G., Lacrose L. et al. Regulation of process retraction and migration by EphA3 is mediated by the adaptor protein Nck1. *Biochemistry*, 2009, v. 48, № 27, p. 6369–6378.
 11. Kim I.J., Beck H.N., Lein P.J. et al. Interferon gamma induces retrograde dendritic retraction and inhibits synapse formation. *J. Neurosci.*, 2002, v. 22, № 11, p. 4530–4539.
 12. Myers K.A., Tint J., Nadar C.V. et al. Antagonistic forces generated by cytoplasmic dynein and myosin II during growth cone turning and axonal retraction. *Traffic*, 2006, v. 7, № 1, p. 1333–1351.
 13. Ramon y Cajal S. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. New York, Hafner, 1959.
 14. Sayas C.L., Avila J. and Wandosell F. Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3. *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, v. 1582, № 1–3, p. 144–153.
 15. Tamiji J. and Crawford D.A. Prostaglandin E (2) and misoprostol induce neurite retraction in Neuro – 2a cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, v. 398, № 3, p. 450–456.
 16. To K.C., Loh K.T., Roskelley C.D. et al. The anti-invasive compound motuporamine C is a robust stimulator of neuronal growth cone collapse. *Neuroscience*, 2006, v. 139, № 4, p. 1263–1274.
 17. Williams D.W. and Truman J.W. Remodeling dendrites during insect metamorphosis. *J. Neurobiol.*, 2005, v. 64, № 1, p. 24–33.
 18. Xu F., Luc C., Richard M.P. et al. Antidepressant flouxetine suppresses neuronal growth from both vertebrate and invertebrate neurons and perturbs synapse formation between *Lymnaea* neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 2010, v. 31, № 6, p. 994–1005.
 19. Zacharias U. and Rauch U. Competition and cooperation between tenascin-R, lecticans and contactin 1 regulate neurite growth and morphology. *J. Cell Sci.*, 2006, v. 119, Pt. 16, p. 3456–3466.

Поступила в редакцию 11.11.10
Получена после доработки 13.02.11

CONTRACTION OF THE INJURED NEURONAL PROCESSES

N.Yu. Vasyagina, O.S. Sotnikov and Ye.A. Gendina

The investigation was performed on the isolated living neurons of a mollusk (*Lymnaea stagnalis*). The purpose of this study was to examine the contractile activity of the injured neuronal processes. Retraction of latter in Ringer's solution was found in 90% of the cases. The specific club-shaped structure (retraction bulb) served as a marker of contraction. The speed of process contraction fluctuated in different neurons from 0.03 to 9 $\mu\text{m}/\text{min}$. As a result of usual linear contraction, the process diameter was increased on the average by 35%, while the cell body volume was increased on the average by 30%. The three forms of contractile activity were distinguished: linear contraction, isometric contraction (reduction of a process thickness with no change in its length) and mixed form of contraction. It is suggested that the mechanism of retraction takes part in the formation of diastasis after nerve sectioning and injury of the brain conducting pathways. Diastasis in the nerve is formed not only due to the elastic properties of its fibrous sheath and glia, but also as a result of nerve fiber retraction.

Key words: *isolated living neurons, cell processes, retraction, Limnaea stagnalis*

Laboratory of Neuron Functional Morphology and Physiology, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg