

© Коллектив авторов, 2009
УДК 611.018.8:616.833.58-001:599.323.4

С.С. Архипова¹, И.С. Рагинов², А.Р. Мухитов¹ и Ю.А. Чельшев²

КЛЕТКИ-САТЕЛЛИТЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ ПОСЛЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ТРАВМ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ

¹ Лаборатория микроскопии (зав. — д-р биол. наук В.В. Сальников) Казанского института биохимии и биофизики РАН;

² кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. Ю.А. Чельшев) Казанского государственного медицинского университета; e-mail: svetlanaarkhipva@rambler.ru

На моделях передавливания, перерезки и лигирования седалищного нерва крысы изучена реакция и изменения количества клеток-сателлитов (КС) в спинномозговых узлах поясничного отдела. После перерезки нерва выявлены нейроны, окруженные двумя слоями КС. При этом увеличиваются толщина отростков КС и площадь их контактов за счет инвагинаций в перикарионы нейронов. После лигирования нерва КС и их отростки располагаются вокруг части больших и средних нейронов в несколько плотно прилегающих слоёв, увеличивается площадь контакта КС с перикарионами нейронов этих популяций за счёт более развитых инвагинаций, появляются ламеллярные структуры в цитоплазме КС, а также контакты с отростками КС, окружающих соседние нейроны. Наибольшее увеличение количества КС обнаружено при лигировании нерва. После перерезки нерва увеличивается количество малых и средних нейронов, окруженных виментин-позитивными КС. При этом количество больших нейронов, окруженных такими клетками, уменьшается. Во все сроки после лигирования нерва все нейроны исследованных узлов окружены виментин-позитивными КС. Посттравматические изменения в структуре и количестве различаются у КС, ассоциированных с чувствительными нейронами конкретных популяций и зависят от вида травмы афферентных проводников.

Ключевые слова: спинномозговой узел, клетки-сателлиты, нейроны, регенерация нерва, виментин.

Клетки-сателлиты окружают перикарионы чувствительных нейронов и по фенотипическим характеристикам рассматриваются как аналоги шванновских клеток [5]. В ответ на травму периферического отростка чувствительных нейронов клетки-сателлиты начинают пролиферировать [12, 15]. В спинномозговых узлах крысы по морфофункциональным и цитохимическим критериям различают большие, средние и малые нейроны [9]. Лигирование периферического нерва приводит к увеличению количества клеток-сателлитов преимущественно больших нейронов [13]. Представляется актуальным исследование структуры клеток-сателлитов, характера их взаимодействия с нейронами, а также изменения численности популяции клеток-сателлитов, окружающих чувствительные нейроны конкретных фенотипов, при различных видах повреждений периферического нерва.

Клетки-сателлиты спинномозговых узлов, как и их аналоги, шванновские клетки, экспрессируют белок промежуточных филаментов — виментин [15]. При травме нерва экспрессия виментина в пролиферирующих шванновских клетках усиливается [14]. Виментин становится главным белком цитоскелета в утративших связь с аксоном шванновских клетках в периферическом отрезке перерезанного седалищного нерва [10].

Цель данной работы — сравнительный анализ количества и структуры клеток-сателлитов

больших, средних и малых нейронов спинномозгового узла L_V крысы после передавливания, перерезки или лигирования седалищного нерва, а также определение количества нейронов конкретных популяций в спинномозговых узлах L_{IV}–L_V крысы, клетки-сателлиты которых экспрессируют виментин в условиях посттравматической регенерации.

Материал и методы. Опыты проведены на крысах-самцах массой 120–200 г. Все операции и взятие материала осуществляли под уретановым наркозом (Sigma, США, 150 мг/кг внутривенно) на левой конечности в области середины бедра, согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Крысам 1-й подопытной группы (n=28) передавливали седалищный нерв в течение 30 с [2]. Животным 2-й группы (n=28) седалищный нерв перерезали с последующим сшиванием центрального и периферического отрезков «конец в конец» [3]. У животных 3-й группы (n=28) иссекали фрагмент седалищного нерва длиной 5 мм, предварительно накладывая лигатуру на центральный отрезок. Контролем служили интактные животные (n=14). На 30-е и 90-е сутки после операции выделяли спинномозговые узлы (у 7 животных каждой группы в тот и другой послеоперационный срок) на уровне L_V на ипсилатеральной стороне, фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде и 2% четырехоксида осмия и заключали в эпон (Sigma, США). У всех животных каждой группы, исследуя не менее 100 нейронов каждой популяции, на полутонких срезах толщиной 1 мкм, окрашенных метиленовым синим, определяли среднее количество клеток-сателлитов вокруг нейронов: малых (диаметром меньше 30 мкм²), средних (диаметром 30–50 мкм²),

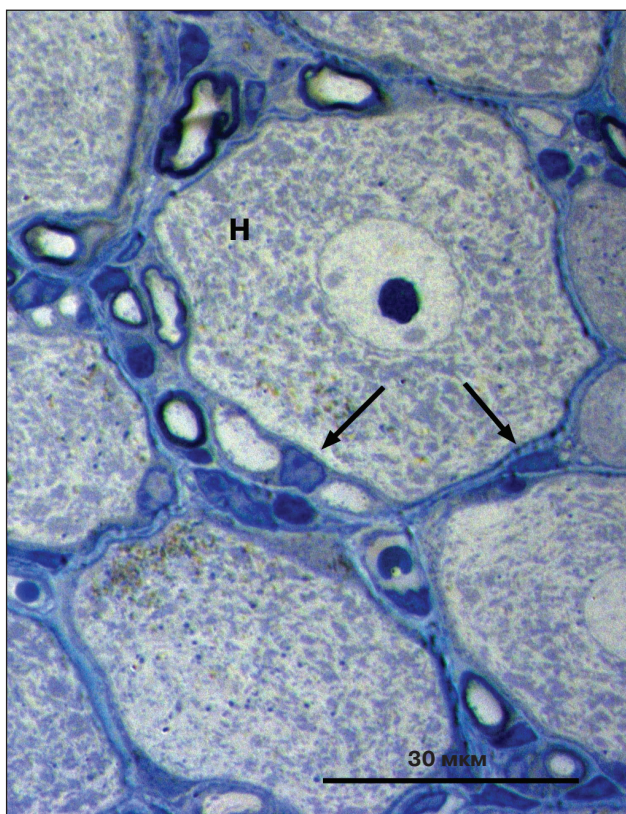


Рис. 1. Нейроны спинномозгового узла L_V intactной крысы с клетками-сателлитами.

Н — нейрон. Стрелки — клетки-сателлиты. Окраска метиленовым синим.

и больших (диаметром больше $50 \mu m^2$), с видимым ядром и ядрышком. Оценка статистической значимости полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента. Электронно-микроскопические исследования проводили с помощью микроскопа Jeol 1200 SX (Япония).

Для подсчета общего количества нейронов различных популяций и иммуноцитохимических исследований спинномозговые узлы (у 7 животных каждой группы в указанные выше сроки после операции) на уровне L_{IV} - L_V фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезживали и заливали в парафин. На каждом 5-м серийном срезе толщиной 7 мкм после окраски метиленовым синим при увеличении 400 подсчитывали общее количество нейронов каждой популяции с видимыми ядрышками, используя окулярную сетку [8]. Количество гибнущих нейронов определяли как разность среднего количества нейронов данной популяции в спинномозговых узлах у intactных животных и среднего количества нейронов данной популяции у подопытных крыс. Для определения доли нейронов всех размерных групп, окруженных виментин-позитивными клетками-сателлитами, с помощью непрямого иммунопероксидазного метода с использованием антител к виментину (Dako, Дания, разведение 1:1000) выявляли и подсчитывали нейроны, перикарионы которых окружены виментин-позитивными клетками-сателлитами. Часть срезов после депарафинирования окрашивали йодидом пропидия [12] и DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол) и анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции красителей применяли

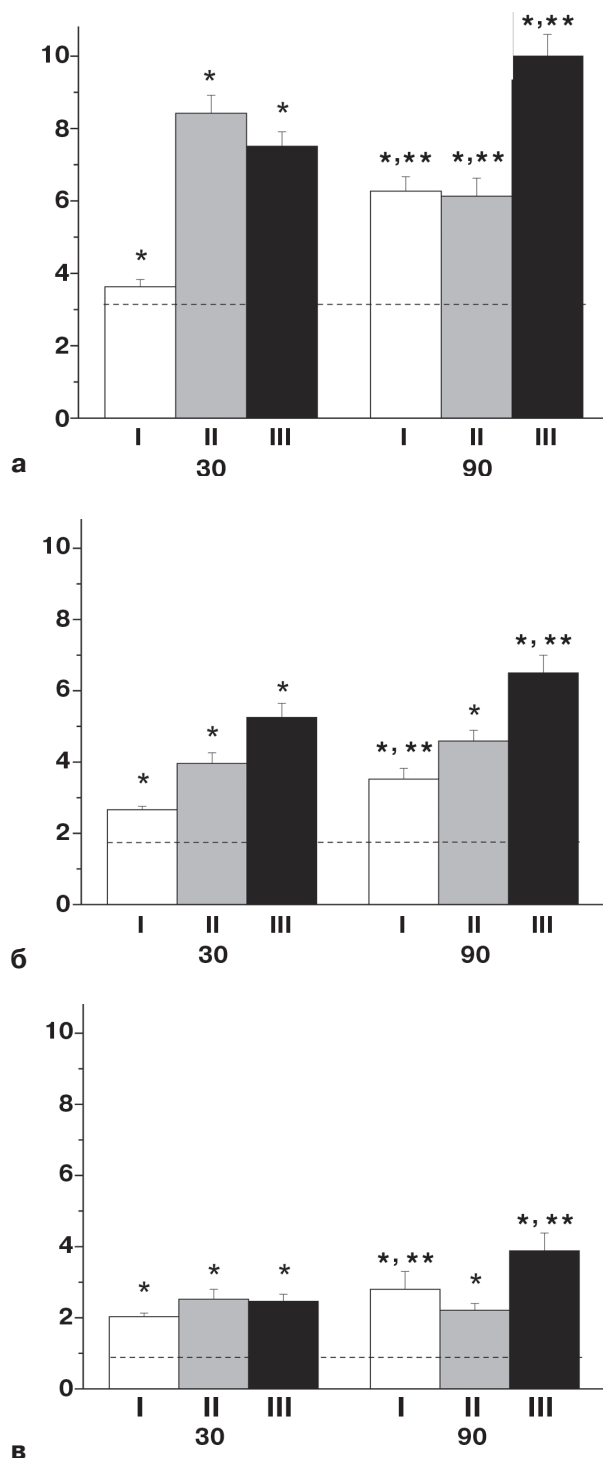


Рис. 2. Среднее количество клеток-сателлитов вокруг больших (а), средних (б) и малых (в) нейронов в разные сроки после травмы седалищного нерва.

По оси абсцисс: I — после перерезки седалищного нерва; II — после его передавливания; III — после его лигирования; время от начала опыта (сут); по оси ординат — количество клеток-сателлитов; одна звездочка — различия значимы при сравнении с данными у intactных животных; две звездочки — различия значимы при сравнении с данными соответствующей группы на 30-е сутки после травмы, при $P < 0,05$. Пунктирная линия — количество клеток-сателлитов у intactных животных. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

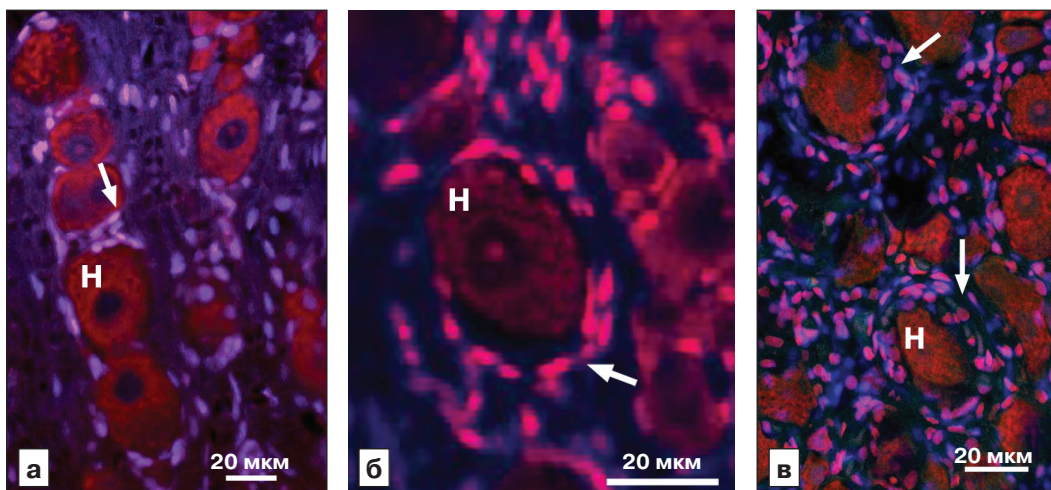


Рис. 3. Нейроны с клетками-сателлитами спинномозгового узла L_V крысы через 90 сут после различных типов травм седалищного нерва.

а — клетки-сателлиты в условиях передавливания нерва располагаются в один слой; б — в условиях перерезки нерва клетки-сателлиты некоторых нейронов располагаются в 2 слоя; в — клетки-сателлиты в условиях лигирования седалищного нерва формируют вокруг нейронов многослойные оболочки. Н — нейрон; стрелки — клетки-сателлиты. Окраска DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол) и йодидом пропидия.

ультрафиолетовый (длина волны 351 нм) и гелий-неоновый (543 нм) лазеры.

Результаты исследования. В спинномозговых узлах (рис. 1) у интактных крыс клетки-сателлиты окружают перикарионы нейронов всех популяций, образуя узкую однослойную оболочку, состоящую из тел клеток и их отростков, не образующих контактов с клетками-сателлитами соседних нейронов. Цитоплазма клеток-сателлитов более электронно-плотная, чем у нейронов.

На 30-е сутки после передавливания нерва количество клеток-сателлитов больших, средних и малых нейронов значимо ($P < 0,05$) возрастает соответственно в 2,6, 2,5 и 2,6 раза, а к 90-м суткам их количество увеличивается соответственно в 1,9, 2,9 и 2,3 раза по сравнению с таковым у интактных животных (рис. 2). После передавливания седалищного нерва клетки-сателлиты, как и у интактных животных, располагаются в один слой вокруг соответствующих нейронов (рис. 3, а). Структура клеток-сателлитов, а также характер их взаимодействия с нейронами в этих условиях значительно не отличаются от таковых у интактных крыс. После перерезки нерва клетки-сателлиты части нейронов начинают располагаться в 2 слоя (см. рис. 3, б), их отростки направляются к соседним нейронам и ветвятся. Толщина их увеличивается, в цитоплазме появляются ламеллярные структуры, в месте контакта нейрона с клеткой-сателлитом образуются многочисленные инвагинации плазмолеммы соседних клеток, в области которых имеются щелевые контакты. В цитоплазме клеток-сателлитов подобные инвагинации нейрона выявляются в виде округлых электронно-

светлых образований, ограниченных мембраной (рис. 4).

На 30-е сутки после перерезки нерва количество клеток-сателлитов больших, средних и малых нейронов значимо ($P < 0,05$) возрастает соответственно в 1,1, 1,6 и 2,1 раза, а на 90-е сутки их количество увеличивается соответственно в 1,9, 2,2 и 2,9 раза (см. рис. 2).

Лигирование нерва приводит к более выраженному увеличению количества клеток-сател-

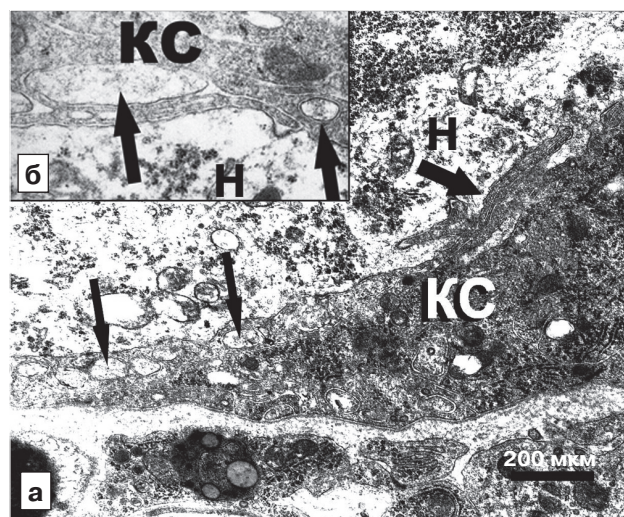


Рис. 4. Взаимоотношение нейрона с прилегающей клеткой-сателлитом в спинномозговом узле L_V на 90-е сутки после перерезки седалищного нерва.

а — инвагинации цитоплазмы нейрона (узкие стрелки); отростки клеток-сателлитов, углубившиеся в перикарион нейрона (широкая стрелка); б — округлые образования, ограниченные двойной мембраной, инвагинации цитоплазмы нейрона (стрелки) в цитоплазму клетки-сателлита. КС — клетка-сателлит; Н — нейрон.

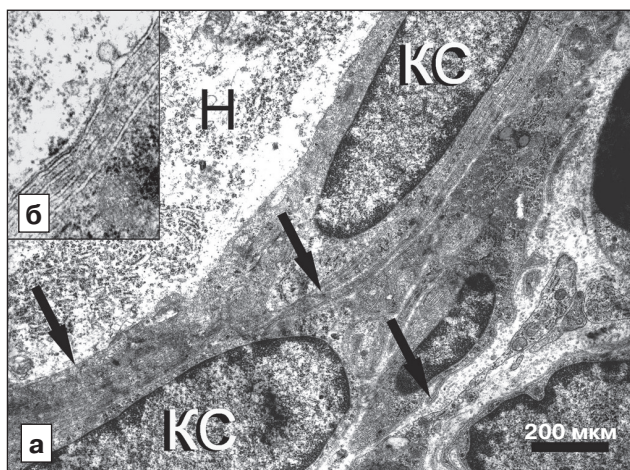


Рис. 5. Чувствительный нейрон спинномозгового узла L_V с прилегающими клетками-сателлитами на 90-е сутки после лигирования седалищного нерва.

а — сформированная отростками клеток-сателлитов (стрелки) многослойная структура вокруг перикариона нейрона; б — область контакта между нейроном и прилегающей клеткой-сателлитом, где узкие отростки клеток-сателлитов расположены в несколько плотно прилегающих слоев. КС — клетки-сателлиты; Н — нейрон.

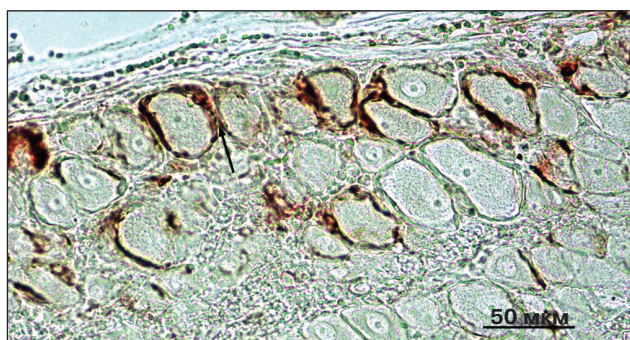


Рис. 6. Виментин-позитивные клетки-сателлиты (стрелка) в спинномозговом узле L_V на 90-е сутки после перерезки седалищного нерва.

литов и их отростков. Клетки-сателлиты части больших и средних нейронов начинают располагаться в несколько плотно прилегающих слоев (см. рис. 3, в), становятся сильно отростчатыми (рис. 5, а). Толщина оболочки, образованной клетками-сателлитами, увеличивается за счет многократного «наматывания» узких отростков клеток-сателлитов вокруг перикарионов нейронов (см. рис. 5, б). К 30-м суткам после лигирования нерва количество клеток-сателлитов больших, средних и малых нейронов значимо ($P < 0,05$) возрастает соответственно в 2,3, 3,3 и 2,5 раза, на 90-е сутки их количество увеличивается соответственно в 3,1, 4,1 и 4,0 раза (см. рис. 2).

У intactных крыс в спинномозговых узлах L_{IV} – L_V выявлено 100 ± 52 малых, 64 ± 15 средних и

216 ± 38 больших нейронов, окруженных виментин-позитивными клетками-сателлитами, что составляет соответственно 8, 6 и 54% от общего числа нейронов данной популяции. На 90-е сутки после перерезки нерва количество малых и средних нейронов, окруженных виментин-позитивными клетками-сателлитами, увеличивается соответственно в 4,6 и 9,9 раза, а количество больших нейронов, окруженных подобными клетками-сателлитами, уменьшается в 2,8 раза по сравнению с таковым у intactных животных. На 30-е и 90-е сутки после лигирования нерва все нейроны окружены виментин-позитивными клетками-сателлитами (рис. 6).

Передавливание седалищного нерва не приводит к гибели нейронов ни одной популяции в спинномозговом узле L_V крысы (рис. 7, а). При перерезке количество малых, средних и больших нейронов значимо ($P < 0,05$) снижается на 30, 28 и 35% соответственно (см. рис. 7, б). Лигирование седалищного нерва приводит к более выраженной гибели больших, средних и малых нейронов на 67,5, 69 и 40,8% ($P < 0,05$) соответственно (см. рис. 7, в).

Обсуждение полученных данных. В настоящей работе установлено, что после передавливания седалищного нерва большинство нейронов в соответствующих спинномозговых узлах у половозрелой крысы выживают, после перерезки нерва через 30 сут погибают 19% нейронов, через 3 мес — 30–40%. Лигирование нерва вызывает наиболее значительную гибель нейронов [3, 6]. Эти результаты согласуются с данными других исследователей [7, 11, 13, 16]. Увеличение количества клеток-сателлитов конкретных нейронов может происходить за счет их пролиферации [13]. В ЦНС повышение количества перинейрональных сателлитов происходит путем перемещения глиоцитов из участков, расположенных вдали от тел нейронов, по направлению к ним в условиях повышенной активности нервного центра [1, 4]. Перемещения клеток-сателлитов в спинномозговых узлах не описано, хотя исключать такую возможность нельзя.

Выявленные структурные отличия клеток-сателлитов после травмы, в особенности инвагинации, в области которых находятся щелевые контакты, свидетельствуют об активном взаимодействии нейрона с клетками-сателлитами в условиях посттравматической регенерации. Эти инвагинации, по-видимому, служат для увеличения площади контакта между клетками-сателлитами и соответствующими нейронами.

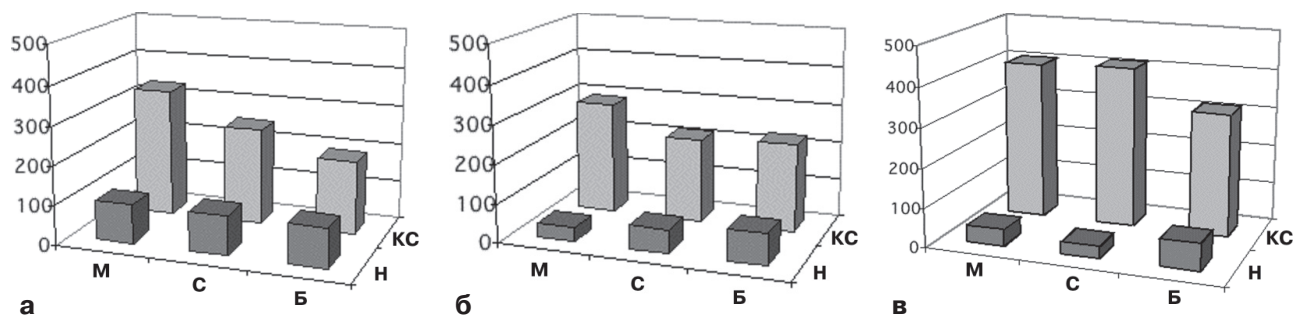


Рис. 7. Относительное количество выживших нейронов (Н) различных популяций и окружающих их клеток-сателлитов (КС) в спинномозговом узле L_4 крысы к 90-м суткам после травмы седалищного нерва.

а — передавливание нерва; б — перерезка нерва; в — лигирование нерва. По оси абсцисс: М — малые нейроны; С — средние нейроны; Б — большие нейроны; по оси ординат — исследованный параметр (%).

Различия в посттравматическом изменении количества клеток-сателлитов на моделях передавливания, перерезки и лигирования нерва могут быть связаны с неодинаковым количеством гибнущих нейронов, принадлежащих конкретным популяциям. После перерезки и передавливания нерва большее увеличение количества клеток-сателлитов малых нейронов, вероятно, отражает процесс наиболее активной выработки митогенов для клеток-сателлитов выживающими нейронами данной популяции. Уменьшение количества клеток-сателлитов после лигирования нерва, по-видимому, является результатом значительной гибели чувствительных нейронов. После аксотомии в малых пептидергических нейронах начинает экспрессироваться нейрональная форма NO-синтазы (nNOS). Образующий NO активирует в клетках-сателлитах гуанилатциклазу и в них повышается содержание циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) [16]. Блокада образования nNOS и цГМФ приводит к усилению апоптоза аксотомированных нейронов и клеток-сателлитов через увеличение экспрессии проапоптозного белка — Вах [17]. Однако, как показано *in vitro* и *in vivo*, содержание цГМФ повышается в близлежащих клетках-сателлитах, но не в непосредственно окружающих данный нейрон [18]. Вероятными участниками этих процессов являются образовавшиеся после травмы щелевые контакты между клетками-сателлитами различных нейронов [7]. Все перечисленное имеет прямое отношение к посттравматическому усилению экспрессии виментина в клетках-сателлитах, так как цГМФ регулирует фосфорилирование виментина [19, 20].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 07-004-00746-а.

ЛИТЕРАТУРА

- Александровская М.М., Бразовская Ф.А., Гейнисман Ю.А. и др. Морфологическая перестройка нейроглии в условиях усиленного функционирования нервных центров. Докл. АН СССР, 1968, т. 180, вып. 3, с. 719–725.
- Рагинов И.С., Вафин А.Ю., Хафизьянова Р.Х. и Чельшев Ю.А. Влияние лекарственных препаратов ксимедон и ноотропил на регенерацию периферического нерва. Рос. морфол. ведомости, 1997, №1(6), с. 120–126.
- Рагинов И.С. и Чельшев Ю.А. Посттравматическое выживание чувствительных нейронов различных субпопуляций. Морфология, 2003, т. 124, вып. 4, с. 47–50.
- Ройтбак А.И. Глия и ее роль в нервной деятельности. СПб., Наука, 1993.
- Чельшев Ю.А. и Сайткулов К.И. Развитие, фенотипическая характеристика и коммуникации шванновских клеток. Успехи физиол. наук, 2000, т. 31, с. 54–69.
- Arvidsson J. and Ygge J. A quantitative study of the effects of neonatal capsaicin treatment and of subsequent peripheral nerve transection in the adult rat. Brain Res., 1986, v. 5397, № 1, p. 130–136.
- Hanani M., Huang T.Y., Cherkas P.S. et al. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. Neuroscience, 2002, v. 114, № 2, p. 279–283.
- Henken D., Battisti W., Chesselet M. et al. Expression of bb-preprotachykinin mRNA and tachykinins in rat dorsal root ganglion cells following peripheral or central axotomy. Neuroscience, 1990, v. 39, № 3, p. 733–742.
- Lawson S. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. In: Sensory Neurons: Diversity, Development, Plasticity. New York, Oxford Univ. Press, 1992, p. 27–59.
- Neuberger T.J. and Cornbrooks C.J. Transient modulation of Schwann cell antigens after peripheral nerve transection and subsequent regeneration. J. Neurocytol., 1989, v. 18, p. 695–710.
- Pannese E., Ledda M., Cherkas P.S. et al. Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. Anat. Embryol. (Berl.), 2003, v. 206, № 5, p. 337–347.

12. Ockleford C.D., Hsi B.L., Wakely J. et al. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence I. Use with tissue and cytoskeleton studies. *J. Immunol. Methods*, 1981, v. 43, p. 261–267.
13. Perry V., Brown M. and Andersson P. Macrophage responses to central and peripheral nerve injury. *Adv. Neurol.*, 1993, v. 59, p. 309–314.
14. Ramer M., Priestley J. and McMahon S. Functional regeneration of sensory axons into adult spinal cord. *Nature*, 2000, v. 403, p. 312–316.
15. Shinder V., Amir R. and Devor M. Cross-excitation in dorsal root ganglia does not depend on close cell-to-cell apposition. *Neuroreport*, 1998, v. 9, № 18, p. 3997–4000.
16. Thippeswamy T., McKay J.S., Morris R. et al. Glial-mediated neuroprotection: evidence for the protective role of the NO-cGMP pathway via neuron-glial communication in the peripheral nervous system. *Glia*, 2005, v. 49, № 2, p. 197–210.
17. Thippeswamy T., McKay J. and Morris R. Bax and caspases are inhibited by endogenous nitric oxide in dorsal root ganglion neurons in vitro. *Eur. J. Neurosci.*, 2001, v. 14, № 8, p. 1229–1236.
18. Thippeswamy T. and Morris R. The roles of nitric oxide in dorsal root ganglion neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002, v. 962, p. 103–110.
19. Vega J., Rodriguez C., Medina M. et al. Expression of cytoskeletal proteins in glial cells of dorsal root ganglia. *Cell Mol. Biol.*, 1989, v. 35, № 6, p. 635–641.
20. Wyatt T.A., Lincoln T.M. and Pryzwansky K.B. Vimentin is transiently co-localized with and phosphorylated by cyclic GMP-dependent protein kinase in formyl-peptide-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 1991, v. 266, № 31, p. 21274–21280.

Поступила в редакцию 09.12.08
Получена после доработки 21.03.09

SATELLITE CELLS OF THE SENSORY NEURONS AFTER DIFFERENT TYPES OF SCIATIC NERVE TRAUMA IN RAT

S.S. Arkhipova, I.S. Raginov, A.R. Mukhitov and Yu.A. Chelyshev

The reaction of satellite cells (SC) and the changes in their numbers were studied in rat lumbar dorsal root ganglia using the models of sciatic nerve crush, transection and ligation. After the nerve transection, the neurons surrounded by two layers of SC were found. This was accompanied by the increased SC branch thickness and contact area due to invaginations into neuronal perikarya. After the nerve ligation, both SC and their branches were found to form several closely adjacent layers around the part of the large and medium neurons, the area of SC contact with the perikarya of neurons of these populations was increased due to more developed invaginations, there appeared the multilamellar structures in SC cytoplasm and the contacts with the branches of SC, which surrounded the neighboring neurons. The most pronounced increase in SC numbers was demonstrated after the nerve ligation. After the nerve transection, the numbers of small and medium neurons, surrounded by vimentin-positive SC, was increased. At the same time, the number of large neurons surrounded by these cells, was decreased. At all time intervals after the nerve ligation, all the neurons in the ganglia studied were surrounded by vimentin-positive SC. Post-traumatic changes in structure and numbers were different in SC, associated with specific populations of sensory neurons and depended on type of afferent conductor injury.

Key words: *dorsal root ganglion, satellite cells, neurons, nerve regeneration, vimentin.*

Laboratory of microscopy, RAS Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics; Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University.