

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И.П.ПАВЛОВА

На правах рукописи

ПАВЛОВА

Наталья Владимировна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА
КРЫС ПОСЛЕ ЕГО ПЕРЕРЕЗКИ, ЛОКОМОТОРНОЙ ТРЕНИРОВКИ И
АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ СЕРОТОНИНА**

03.03.01 - физиология

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2011

Работа выполнена в Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
Герасименко Юрий Петрович
доктор медицинских наук., чл.корр. РАМН
Владимир Александрович Отеллин.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Обухов Дмитрий Константинович
Санкт-Петербургский Государственный
Университет

доктор медицинских наук, профессор
Макаров Феликс Николаевич
Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН

Ведущая организация:

Институт эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Защита состоится « » _____ 2011 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д002.020.01) при Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН(199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. И.П.Павлова РАН

Автореферат разослан « ____ » _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Н.Э.Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Многие аспекты регуляции и восстановления двигательной функции после повреждения спинного мозга, а также механизмы реорганизации и функционирования нейронных локомоторных сетей в изолированном от головного мозга участке спинного мозга остаются малоизученными. В истории экспериментальной неврологии имеется множество попыток использовать относительную сохранность дистального участка поврежденного спинного мозга для обеспечения двигательной функции конечностей. Однако, такие попытки, как правило, оставались не эффективными. В сравнительно недавнее время сложились представления о важной роли в управлении локомоторной активностью конечностей спинальных нейрональных сетей «генераторов шагательных движений» (ГШД), локализованных в спинном мозге [Баев 1983., Rossignol 1996]. Активность этих сетей инициируется и контролируется супраспинальными центрами ствола и головного мозга, а периферическая обратная связь осуществляет их текущую коррекцию. Эти нейронные локомоторные сети обеспечивают координированную активность мотонейронов. Недавно было показано, что дистальный отдел перерезанного спинного мозга обладает механизмами, способными после локомоторной тренировки в сочетании с эпидуральной и фармакологической стимуляцией инициировать двигательную активность в задних конечностях [Courtine et al., 2009]. Механизмы этого явления не изучены. Можно предположить, что восстановление локомоторных движений связано с пластичностью мозга и способностью структур дистального отдела перерезанного спинного мозга к реорганизации нейронных сетей. Важная роль в регуляции двигательного поведения принадлежит серотонинергической системе. Недавно было показано, что активация ГШД посредством эпидуральной стимуляции спинного мозга в сочетании с введением агонистов рецепторов серотонина улучшает локомоторную функцию у полностью спинализированных крыс [Gerasimenko et al., 2007., Courtine et al., 2009]. В настоящем исследовании предпринята попытка изучить структурно-функциональную реорганизацию спинного мозга после его повреждения и выявить эффективные способы восстановления его двигательных функций.

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в изучении структурно-функциональной реорганизации нейрональных локомоторных сетей поврежденного спинного мозга, обеспечивающих локомоторную функцию, при активации рецепторов конечностей и стимуляции серотонинергической системы.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить структурные характеристики спинного мозга интактных крыс.
2. Исследовать локомоторные способности у животных с полной перерезкой спинного мозга после тренировки на тредбане.
3. Провести морфологическое исследование дистального отдела спинного мозга после полной перерезки, последующей локомоторной тренировки и фармакологической стимуляции рецепторов серотонина.

Научная новизна. Впервые установлено, что локомоторная тренировка в сочетании с фармакологической активацией рецепторов серотонина способствует восстановлению локомоторной функции спинного мозга у полностью спинализованных крыс. Впервые показаны патологические и реактивные изменения, происходящие в нервных клетках и синаптических контактах в дистальном отделе спинного мозга после его перерезки, последующей локомоторной тренировки животных и фармакологической активации серотонинергической системы спинного мозга. Доказано, что нейрональные локомоторные сети спинного мозга, изолированные от супраспинальных влияний, способны реорганизовываться и обеспечивать локомоторную функцию. В отдаленные сроки после перерезки спинного мозга нейроны сохраняют свойственную им структуру как после тренировки на тредбане, так и на фоне введения агониста серотонина. Установлено, что у спинальных тренированных животных нейроны сохраняют на своей цитолемме синаптические контакты.

Основные положения выносимые на защиту.

1. Управление структурно-функциональной реорганизацией «изолированного» спинного мозга возможно посредством активации ГШД и стимуляции рецепторов серотонина.
2. Частичное восстановления двигательной активности задних конечностей обеспечивается за счет перестройки нейронных сетей дистального отдела спинного мозга, и сохранении синаптических контактов вокруг части спинальных нейронов.
3. Сочетанное воздействие локомоторной тренировки, регулирующей афферентный приток в спинной мозг от рецепторов конечностей, и активации серотонинергической системы спинного мозга обеспечивает наиболее эффективный способ восстановления локомоторной функции спинного мозга.

Теоретическое и практическое значение работы.

Возможность вызова шагательных движений у животных с полным перерывом спинного мозга после стимуляции афферентов задних конечностей доказывает, что дистальный отдел

спинного мозга обладает структурно-функциональной организацией, способной генерировать локомоторные движения. Тренировка способствует сохранению структуры мотонейронов. Доказана ведущая роль сенсорного входа в регуляции локомоторной активности у спинализованных животных. В результате исследования установлено, что серотонинергическая система играет значительную роль в организации локомоторных движений задних конечностей после перерезки спинного мозга. Действие неселективного агониста рецепторов серотонина (квипазина), приводит не только к улучшению локомоторной активности исследованных животных, но и способствует сохранению морфологической структуры дистального отдела спинного мозга. Полученные результаты свидетельствуют, что нейроны в изолированном дистальном отрезке спинного мозга в результате стимуляции афферентов и серотонинергической системы могут образовывать нейронные сети, которые способны обеспечивать локомоторную активность задних конечностей. Проведенное исследование расширяет представления о собственных механизмах спинного мозга, участвующих в регуляции двигательной активности задних конечностей в условиях нормы и экспериментальной патологии.

Апробация работы. Результаты работы представлены на 3-й Всероссийской с международным участием школе-конференции "Физиология мышц и мышечной деятельности" (Москва 2005), Всероссийской конференции молодых исследователей "Физиология и медицина" (Санкт-Петербург 2005), на I съезде физиологов СНГ (Сочи 2005), на V Международной конференции по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения – (Санкт-Петербург 2006), на XX съезде физиологического общества им. И.П.Павлова (Москва 2007), на межинститутской конференции молодых ученых "Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям среды", посвященной 100-летию академика В.Н. Черниговского (Санкт-Петербург 2007), на II Российской конференции по управлению движением (Петрозаводск 2008), на Российской конференции молодых ученых посвященной дню космонавтики в ИМБП (Москва 2008), на Всероссийской конференции «Научное наследие академика Л.А. Орбели "Структурные и функциональные основы эволюции функций, физиология экстремальных состояний" (Санкт-Петербург 2008), на V Международном Междисциплинарном Конгрессе "Нейронаука для медицины и психологии" (Судак, Крым, Украина, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых журналах и 9

работ в сборниках трудов научно-практических конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения экспериментальных данных, обсуждения полученных результатов, выводов и заключения. Работа изложена на 125 страницах, иллюстрирована 39 рисунками и 6 таблицами. Список литературы включает 167 источников, из них 33 отечественных и 134 иностранных источника.

МЕТОДЫ И ОРГАНИЗАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Исследование проведено на 106 взрослых самках крыс линии Sprague-Dawley. Экспериментальные животные были разделены на 6 групп. 1 группа – животные с полной перерезкой спинного мозга. 2 группа – животные с перерезкой спинного мозга и локомоторной тренировкой на тредбане. 3 группа – животные с перерезкой спинного мозга, локомоторной тренировкой и введением квисапина. 4 группа - животные с перерезкой спинного мозга и введением квисапина. 5 группа – интактные крысы с введением квисапина. 6 группа - интактные крысы.

Спинализация. Экспериментальную перерезку спинного мозга осуществляли под наркозом (ксилазин 2мг/кг в/м). Разрезали мягкие ткани на дорзальной стороне позвоночника, проводили ламинэктомию на уровне Th10 грудного позвонка. Подобранный по размеру крючок подводили под спинной мозг, который полностью перерезали ножницами.

Локомоторная тренировка. Переднюю часть туловища животного помещали в матерчатую трубу, закрепленную в системе поддержки веса тела. В такой системе голова и передние конечности животного находились в "трубе," а задние конечности касались ленты тредбана. Тренировку начинали через 1 сутки после операции. В процессе тренировки воспроизводились движения, повторяющие нормальный цикл шага, т. е. с плантарной постановкой задних лап на опору. Животных тренировали ежедневно по 10 минут, 5 раз в неделю.

Электрическая стимуляция спинного мозга у интактных и спинализированных крыс осуществлялась с помощью эпидуральных электродов, имплантированных на дорсальную поверхность спинного мозга в области L2 и S1 сегментов. Электроды выводились на разъем, закрепленный на черепе животного. Для интактных крыс использовалась низкочастотная (0,3-1 Гц), для хронически спинализированных крыс высокочастотная (30-40 Гц) стимуляция спинного мозга.

Электромиографическая активность (ЭМГ) регистрировалась в дистальной группе (m.

tibialis и m.gastrocnemius) мышц задних конечностей. Запись ЭМГ активности осуществляли биполярно серебряными электродами, вживленными в исследуемые мышцы. ЭМГ-сигналы усиливались биоусилителем (А-М система, модель 1700, США) с полосой пропускания частот от 10 Гц до 10 КГц и оцифровывались с частотой 2000 Гц. ЭМГ-сигналы пропускались через низко-проводящий фильтр, обрезающий частоту до 100 Гц. У обработанных таким образом ЭМГ-сигналов с помощью специальной программы в режиме off-line вычислялась амплитуда ЭМГ пачки, длительность ЭМГ пачки и межпачечный интервал.

Кинематический анализ производился по видеозаписям, которые делались одновременно с регистрацией ЭМГ. Для регистрации кинематических характеристик локомоторного поведения на тазобедренный, коленный и голеностопный суставы помещали светоотражающие маркеры. Перемещения маркеров при ходьбе регистрировали с помощью специальных видеокамер. Затем с использованием компьютерных программ производили реконструкцию кинематики шагательного цикла.

Поведенческий метод. Животным 1, 2, 3 и 4 групп еженедельно проводили контроль реабилитации локомоторной функции, для чего использовали международную BBB-шкалу [Basso et al., 1995], позволяющую в открытом поле исследовать степень восстановления движений задних конечностей и функции поддержки веса тела.

Гистологический метод. Через 6 недель спинной мозг фиксировали перфузией 4% параформальдегида на фосфатном буфере. Светооптическое исследование проводили на парафиновых срезах толщиной 5-7мкм, окрашенных тионином по методу Ниссля. В 5 случайно выбранных срезах спинного мозга (сегменты L2-L4) для каждой пластинки Рекседа подсчитывали количество морфологически неизмененных нейронов, нейронов с признаками хроматолиза и гиперхроматоза. **Иммуногистохимическую реакцию** на синаптофизин (маркер мембран синаптических пузырьков) осуществляли на парафиновых срезах толщиной 5-7мкм с использованием первичных поликлональных кроличьих антител к синаптофизину (Dako, Дания). Для выявления антител был использован 2х ступенчатый авидин-биотиновый метод, реализованный в наборе вторичных антител и стрептавида LSAB/HRP. Структуры спинного мозга и зоны Рекседа определяли по атласу цитоархитектнической организации спинного мозга [Molanger, Xu, Grant, 1984]. Для оценки выраженности иммуногистохимической реакции использовали относительную шкалу интенсивности иммунной реакции. Нейроны разделили на три группы: полностью окруженные иммунореактивной меткой, частично окруженные и нейроны, на которых метка

отсутствовала. В 5 случайно выбранных срезах спинного мозга (сегменты L2-L4) для каждой пластинки Рекседа подсчитывали число нейронов полностью окруженных иммунореактивной меткой, частично окруженных и нейроны, на которых метка отсутствовала. Доля нейронов каждой из трех групп подсчитывалась в процентном соотношении к общему количеству рассмотренных нейронов. Для статистической обработки полученных результатов использовали непараметрический критерий Хи-квадрат.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования локомоторной активности крыс после полной экспериментальной перерезки спинного мозга на нижнегрудном уровне

Известно, что после полной перерезки спинного мозга нейронные сети дистального отдела, изолированные от головного мозга, способны продуцировать ритмические шагательные движения [Герасименко 2002, Мошонкина 2004]. Предполагается, что при потере супраспинального входа происходят определенные изменения в структурах спинного мозга, способствующие частичному восстановлению функциональной способности оставшихся нейронов и синаптических контактов. Это подтверждается данными о том, что после перерезки спинного мозга на среднегрудном уровне в пластинках I-V область миелинизированных и немиелинизированных афферентных волокон увеличивалась в поясничном отделе через 1-2 недели [Krenz et al., 1998].

Через 2 недели после полной перерезки спинного мозга в грудном отделе, наблюдалась плегия задних конечностей, и крысы были не способны совершать локомоторные движения. При тестировании рефлекторной активности спинного мозга посредством электрической стимуляции S1 сегмента в мышцах задних конечностей регистрировались только ранний и моносинаптический компоненты ответов мышц, поздний полисинаптический компонент, который является показателем локомоции [Lavrov et al., 2008], отсутствовал. Через 3 недели после спинализации поздний компонент начал восстанавливаться, и у крыс стали появляться спонтанные, плохо координированные локомоторно-подобные движения задних конечностей. В период с 3 по 6 неделю локомоторная способность крыс улучшалась. Наблюдалось прогрессивное восстановление позднего полисинаптического ответа и появление шагательного паттерна. Обнаружена корреляция между восстановлением позднего компонента и восстановлением локомоторных способностей у спинализированных крыс (рис.1).

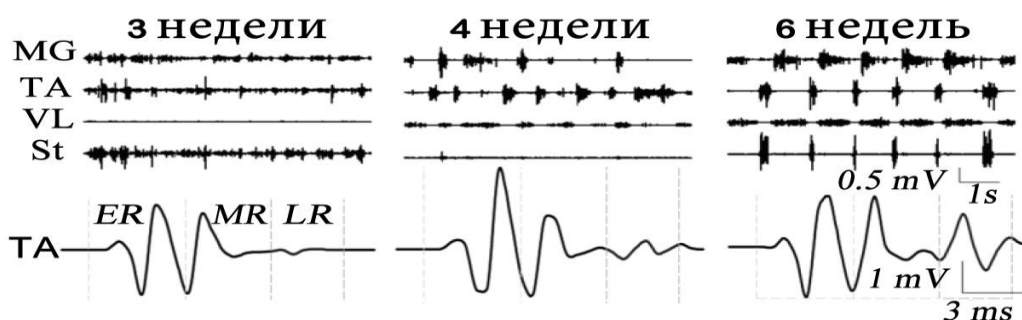


Рис.1. ЭМГ активность в мышцах задних конечностей (MG - m. medialis gastrocnemius, St - m.semitendinosus, TA - m.tibialis anterior, VL - m.vastus lateralis) при эпидуральной стимуляции спинного мозга через 3, 4 и 6 недель после спинализации. Внизу показана структура рефлекторного ответа на одиночную стимуляцию. ER ранний компонент - прямой мышечный ответ на стимуляцию моторных аксонов. MR - моносинаптический рефлекс на активацию афферентов группы Ia. LR - поздний ответ - полисинаптический рефлекс, опосредованный активацией афферентов группы II и афферентов флексорного рефлекса.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение, что восстановление полисинаптических рефлексов может являться индикатором частичного восстановления спинальной локомоторной нейрональной сети, необходимой для регуляции локомоторной функции спинного. При тестировании движений в “открытом поле” у крыс с полной перерезкой спинного мозга, которых не подвергали никаким воздействиям, оценки двигательной активности по BBB-шкале были низкими - в диапазоне 1-5 (от «слабые движения одного или двух суставов» до «слабые движения в двух суставах и значительные движения в третьем суставе»).

Влияние локомоторной тренировки на двигательную функцию спинного мозга крыс после его полной перерезки на нижнегрудном уровне

Тренировка животных на тредбане, проводимая после полной перерезки спинного мозга на нижнегрудном уровне, способна обеспечить значительное функциональное улучшение двигательной активности задних конечностей. Раздражение афферентов стопы является ключевым моментом в инициации локомоторных движений у спинализированных животных. Известно, что в острый период после спинализации локомоторную активность можно вызвать прямым раздражением подушечек лап животных движущейся лентой тредбана [Grillner et al., 1976]. У тренированных спинализированных крыс движения задних конечностей отсутствуют при тестировании в бассейне с водой, когда нет опоры. Контакт стопы с полом камеры при тестировании в открытом поле запускает шагоподобные движения у тренированных крыс. У крыс 2 группы, оценки двигательной активности задних

конечностей улучшились и изменялись в диапазоне 4-8 («слабые движения во всех трех суставах» - «подошвенная постановка стопы без поддержки веса тела»).

Влияние введения квисаина на двигательную функцию спинного мозга крыс после его полной перерезки на нижнегрудном уровне

Стимуляция серотонинергической системы с помощью введения квисаина привела к тому, что оценки двигательной активности находились в диапазоне 5-6 (до «значительные движения в двух суставах и слабые движения в третьем»). Такие данные говорят о том, что введение квисаина также эффективно, как и тренировки на тредбане (рис.2). Наши результаты совпадают с данными литературы о том, что агонист рецепторов серотонина – квисаин может модулировать восстановленные локомоторные движения посредством повышения амплитуды и продолжительности ЭМГ импульсов во флексорах и экстензорах задних конечностей [Majczynsky, 2005].

Влияние локомоторной тренировки и введения квисаина на двигательную функцию спинного мозга крыс после его полной перерезки на нижнегрудном уровне

После полной перерезки спинного мозга значительное количество рецепторов остается в неактивном состоянии и выключается из регуляции двигательной функции задних конечностей из-за дегенерации нисходящих путей и потери медиаторов. При стимуляции рецепторов серотонина дистального отдела агонистами серотонина компенсируется отсутствие воздействия дегенерировавших нисходящих волокон и может возникать активность нейронов, обеспечивающих локомоторную функцию задних конечностей. У спинальных крыс через 10-15 минут после введения квисаина наблюдалось усиление мышечного тонуса в мышцах задних конечностей. В большей степени мышечный тонус увеличивался в мышцах разгибателей, типичным случаем было возникновение мощной экстензии с последующим ритмическим рефлекторным сокращением мышц. Такой эффект влияния квисаина наблюдался на протяжении первых 3-4 недель после начала введения препарата. Отчетливый эффект улучшения локомоторных способностей был отмечен после 4 недель введения агониста квисаина - крысы могли стоять на неподвижном тредбане с частичной поддержкой веса тела, а при включении тредбана могли осуществлять шагательные движения. Движения были более координированы, в структуре шагательного цикла четко проявлялась фаза опоры и переноса, практически отсутствовало волочение стопы, которое наблюдалось у спинализированных крыс. У животных 1 группы при выполнении шагательных движений возникала ко-активация ЭМГ активности мышц-

антагонистов, у животных 3 группы мышцы-антагонисты при шагании работали реципрокно. Диапазон оценок достигал 5-9 (до «шаги с поддержкой веса тела»). В литературе имеются данные о том, что при активации локомоции у спинальных крыс введение серотонина и квиспина улучшает локомоторные движения, вызванные стимуляцией основания хвоста [Feraboli-Lohnherr et al., 1999]. Динамика восстановления локомоторной активности у крыс после полной перерезки спинного мозга в нижнегрудном отделе показана на рис.2

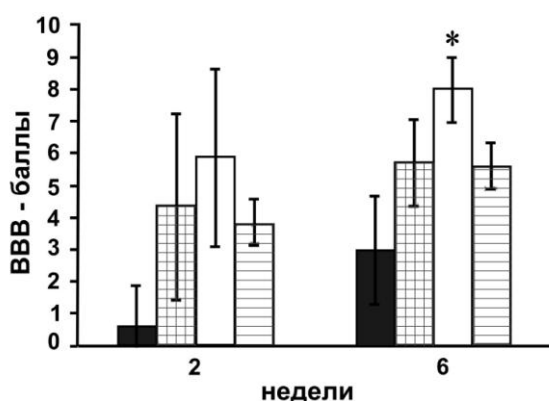


Рис.2. Изменение локомоторной активности хронических спинализированных крыс через 2-6 недель после операции. По оси ординат: баллы BBB-шкалы. Представлено стандартное отклонение данных. Обозначено:
 Черный – группа 1
 Клетки – группа 2
 Белый – группа 3
 Штриховка – группа 4
 Звездочка - достоверные отличия ($p < 0,05$) 3 группы от 2 и 1 группы через 6 недель.

Морфологическое исследование поясничного утолщения спинного мозга после его полной перерезки на нижнегрудном уровне

Поясничное утолщение соответствует области отхождения нервов тазовых конечностей и расположено у крыс в сегментах L1- L5 спинного мозга на уровне T12-L1 позвонков. Нейрональная сеть, ответственная за регуляцию локомоторного поведения, и названная спинальным генератором шагательных движений, локализована в ростральных сегментах люмбального отдела спинного мозга. Считается, что сегменты L1-L2 обладают ритмоформирующей функцией локомоции, и по существу, являются триггером шагательной ритмики. Наибольшая значимость средних поясничных сегментов для проявления локомоции подтверждается также экспериментами других авторов на разных моделях животных [Deliagina et al., 1983., Kiehn et al., 1998., Rossignol et al., 2000; Cazalets et al., 2000]. В сегменте L4- L5 локализованы основные моторные ядра *m.caudofemoralis*, *m.gastrocnemius*, *m.biceps*, *m.semitendinosus*, *m.plantar* и других мышц, участвующих в локомоции задних конечностей. [Romanes 1964, Sprague, Szentagotai J., 1951]. Наше внимание было сосредоточено на структуре клеток, предположительно входящих в состав этих локомоторных сетей. Мы рассматривали области спинного мозга, в которых локализуются ключевые элементы локомоторных циклов – первое переключение афферентов (дорзальный

рог), промежуточная зона – переключение полисинаптических цепей, X пластинка Рекседа - расположение собственных серотонинергических ядер спинного мозга и IX пластинка - мотонейроны [Eccles., 1960, 1960, Rexed., 1956]. Изучение реактивно измененных нейронов в отдельных пластинках позволяет предполагать возможное нарушение функций нейронных цепей, реагирующих на перерезку спинного мозга, поскольку в разных пластинках располагаются разные в функциональном отношении клетки.

Результаты гистологического исследования поясничных сегментов спинного мозга ниже места перерезки

Морфологический анализ поперечных срезов дистального отдела спинного мозга у животных всех опытных групп показал, что морфологические изменения нейронов происходят в основном в IV-V, VII, VIII, IX и X пластинках Рекседа (табл. 1, 2, 3, 4). В сером веществе дистального отдела в сегментах L2-L4 спинного мозга наблюдаются клетки с признаками хроматолиза, гиперхроматоза и неизмененные нейроны. Базофилия всей цитоплазмы зависит от диффузного распределения в ней рибонуклеопротеидов. Слабое окрашивание связано с нарушением структуры эндоплазматической сети, с находящимися в ней субмикроскопическими гранулами нисселевского вещества. Хроматолиз является морфологическим выражением большей или меньшей редукции концентрации РНК и протеинов. При гиперхроматозе происходит сгущение хроматофильного вещества, ядро становится интенсивно и диффузно базофильным, ядрышко перестает различаться. Гиперхроматоз рассматривается как реактивный процесс, указывающий на угрожающее жизни клетки изменение, обычно приводящее ее к гибели [Жаботинский, 1965]. В наших исследованиях показано, что у животных 1 группы обнаружены наиболее выраженные повреждения нейронов во всех пластинках Рекседа (табл. 1). Крупные нейроны VII пластинки часто повреждены по типу хроматолиза, имеют тяжелые изменения ядра; нейроны средних размеров и мотонейроны чаще повреждены по типу гиперхроматоза. Таким образом, у спинализированных животных мы видим значительные патологические изменения нейронов, которые, видимо, и обуславливают высокую степень локомоторной дисфункции.

Таблица 1. Гистограммы распределения нейронов разной степени повреждения в пластинках Рекседа IV-V и VII-X второго и четвертого поясничного сегмента у животных 1 и 2 группы. Оценивалась доля измененных клеток в поперечных срезах спинного мозга от всего количества клеток пластинки (см. описание методов). Черные столбики – хроматолит нейронов, штрихованные столбики – гиперхромные нейроны, белые столбики – морфологически сохранные нейроны.

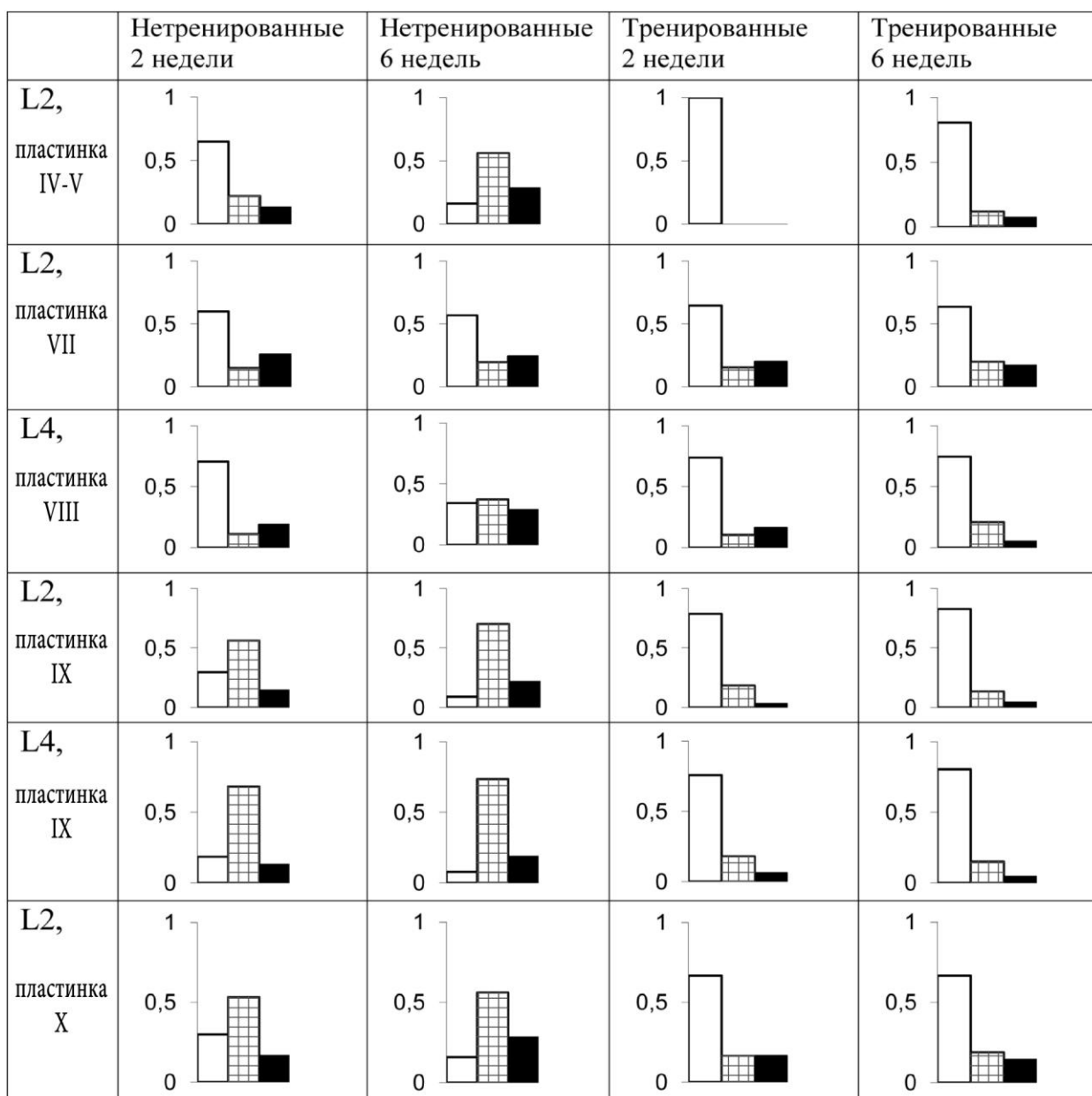


Таблица 2. Гистограммы распределения нейронов разной степени повреждения в пластинках Рекседа IV-V и VII-X второго и четвертого поясничного сегмента у животных 4 и 3 группы(тренированные и нетренированные крысы, которые получали квиспазин). Оценивалась доля измененных клеток в поперечных срезах спинного мозга от всего количества клеток пластинки (см. описание методов). Черные столбики – хроматолиз нейронов, штрихованные столбики – гиперхромные нейроны, белые столбики – морфологически сохранные нейроны.

	Нетренированные + квиспазин 2 недели	Нетренированные + квиспазин 6 недель	Тренированные + квиспазин 2 недели	Тренированные + квиспазин 6 недель
L2, пластинка IV-V				
L4, пластинка IV-V				
L2, пластинка VII				
L4, пластинка VII				
L4, пластинка VIII				
L2, пластинка IX				
L4, пластинка IX				
L2, пластинка X				

Таблица 3. Гистограммы распределения синаптофизин-иммунореактивной метки на цитолемме нейронов в пластинках Рекседа IV-V и VII-IX второго и четвертого поясничного сегмента у животных 1 и 2 групп. Оценивалась доля каждой группы клеток (см. описание методов) в поперечных срезах спинного мозга от всего количества клеток пластинки. Черные столбики – отсутствие метки на цитолемме нейрона, штрихованные столбики – частичное расположение метки на цитолемме, белые столбики – метка полностью окружает нервные клетки.

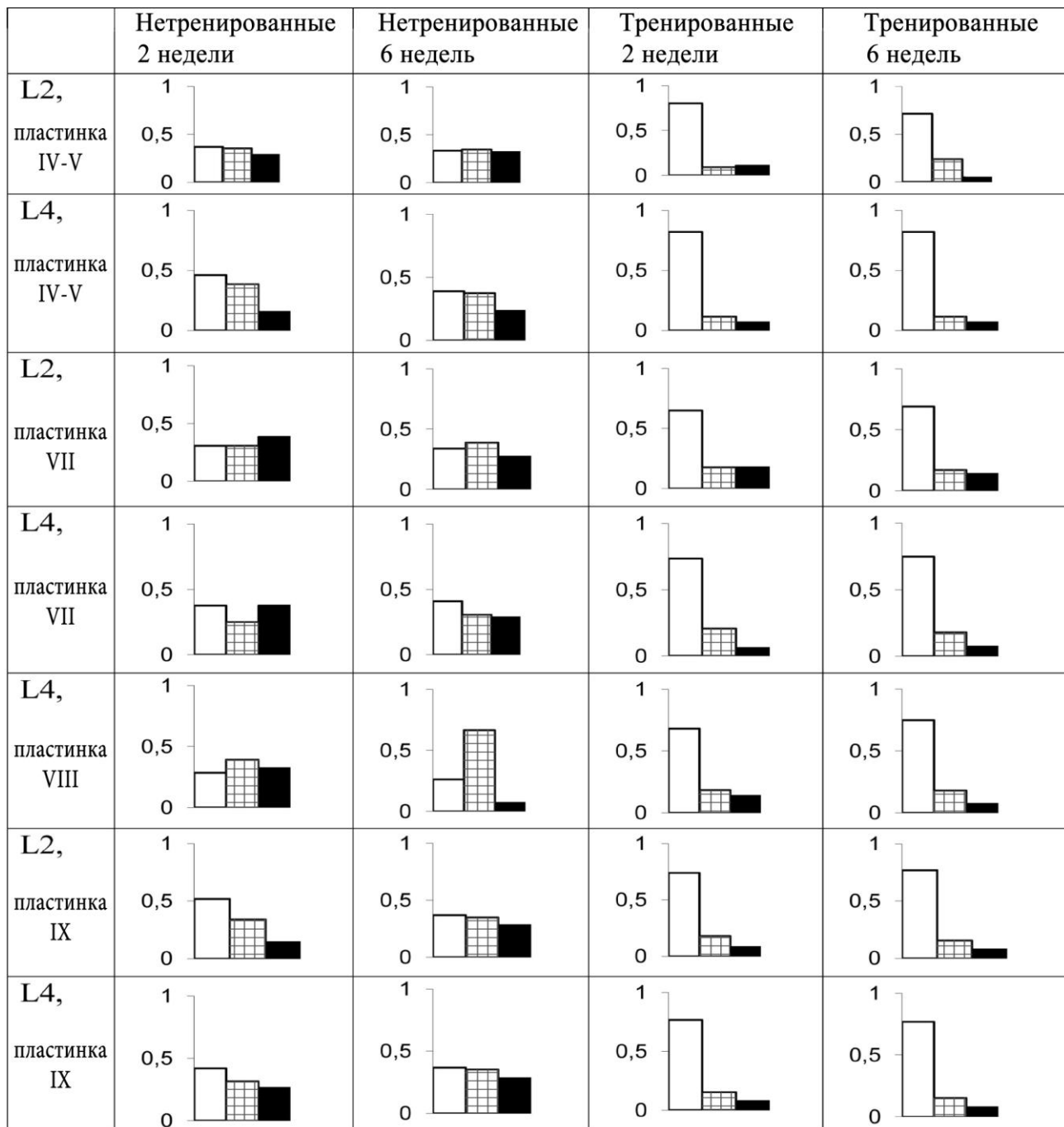


Таблица 4. Гистограммы распределения синаптофизин-иммунореактивной метки на цитолемме нейронов в пластинках Рекседа IV-V и VII-IX второго и четвертого поясничного сегмента у животных 4 и 3 групп. Оценивалась доля каждой группы клеток (см. описание методов) в поперечных срезах спинного мозга от всего количества клеток пластинки. Черные столбики – отсутствие метки на цитолемме нейрона, штрихованные столбики – частичное расположение метки на цитолемме, белые столбики – метка полностью окружает нервные клетки

	Нетренированные + квипазин 2 недели	Нетренированные + квипазин 6 недель	Тренированные + квипазин 2 недели	Тренированные + квипазин 6 недель
L2, пластинка IV-V				
L4, пластинка IV-V				
L2, пластинка VII				
L4, пластинка VII				
L2, пластинка VIII				
L2, пластинка IX				
L4, пластинка IX				

Распределение синаптофизина в поясничных сегментах спинного мозга после его перерезки

Иммуногистохимическая реакция на синаптофизин маркирует множество синапсов во всех пластинках Рекседа, вокруг разных нейронов и ядер, формируя представление о картине распределения синаптических контактов, расположенных во всех зонах серого и белого вещества спинного мозга. После спинализации крыс синаптофизин-иммунореактивные гранулы располагаются на многих нейронах гораздо реже, и не покрывают всю цитолемму, иногда на ней остаются только 1-2 гранулы. В основном эти изменения затрагивают крупные и средние нейроны. Встречаются погибающие синаптофизин-негативные клетки (табл. 3). По-сравнению с интактным спинным мозгом, где нейропиле содержит многочисленные гранулы продукта реакции, после перерезки на поперечно и продольно срезанных отростках нервных клеток нет скопления крупных гранул – синаптофизин распылен среди структур в нейропиле. Распыление синаптофизина в нейропиле может свидетельствовать о резком уменьшении числа функционирующих синаптических контактов. Гранулы синаптофизина распределены равномерно в аксонах и не концентрируются в пресинаптическом полюсе.

Результаты гистологического исследования поясничных сегментов спинного мозга у спинализированных крыс, подвергавшихся локомоторным тренировкам

При сравнительном анализе пластинок спинного мозга выявлено, что у животных 2 группы, через 2 недели все нейроны IV-V пластинок Рекседа морфологически сохранены, через 6 недель 20% нейронов реагируют по типу гиперхроматоза и хроматолиза. В VII пластинке на всех сроках наблюдения измененных клеток наблюдается 40% от общего количества нейронов этой зоны. В VIII пластинке через 2 и 6 недель повреждается 25% нейронов. В IX пластинке Рекседа наблюдается менее 25% измененных, в основном, по типу гиперхроматоза мотонейронов (табл. 1). Кроме того, у крыс 2 и 3 группы наблюдается сегрегация ядрышка в некоторых мотонейронах. Наиболее часто сегрегация ядрышка встречается у тренированных животных в мотонейронах, ответственных за функцию мышц - сгибателей и разгибателей. Заметно, что нейроны моторных пулов *m.tibialis anterior* и *m. gastrocnemius* имеют сохранную структуру и высокую концентрацию синаптофизина у животных 2 и 3 группы. У животных 1 и 4 группы, наблюдаются гиперхромные мотонейроны и уменьшение синаптофизин-иммунореактивной метки вокруг мотонейронов (табл. 1, 2, 3, 4). Сегрегация ядрышка может свидетельствовать об истощении РНК в ядрышке в результате выраженной функциональной активации нейронов тренируемых крыс. Таким образом, тренировка спинализированных

животных способствует сохранению нейронов дистального отдела спинного мозга. Большая часть нервных клеток в пластинках IV-V, VII, VIII, IX и X морфологически сохранна (табл.1).

Распределение синаптофизина в поясничных сегментах спинного мозга спинализированных крыс, подвергавшихся локомоторным тренировкам

При иммуногистохимическом исследовании реакции на синаптофизин показано, что у крыс 2 группы синаптофизин-иммунореактивная метка в сером веществе спинного мозга дискретно окружает нейроны, маркируя аксо-соматические синаптические контакты, и в большом количестве сохраняется в нейропиле что, судя по нашим данным, свидетельствует о сохранении синапсов из-за активации афферентного входа путем тренировки (табл. 3).

Результаты гистологического исследования поясничных сегментов спинного мозга у спинализированных крыс после введения квинпина и локомоторных тренировок

В норме нейрональная сеть локомоторного генератора находится на некотором уровне активности, получая сигналы от экстеро- и проприорецепторов, а нисходящие пути приводят в исполнение моторную программу спинного мозга. Серотонинергические бутоны широко распространены в сером веществе спинного мозга [Alvarez et al., 1998]. Спинальные проекции в основном идут из raphe obscures, raphe pallidus (через пирамидный тракт), raphe magnus и вентральной ретикулярной формации. Нейроны ядер шва посылают проекции в дорзальный рог – особенно в маргинальную зону, вентральный рог и зону вокруг центрального канала – во все сегменты и в интермедиолатеральное ядро в грудном отделе. В этих же областях биохимически находят и серотонин [Hadjiconstantinou et al., 1984]. В нашей работе мотонейроны были наиболее сохранной группой клеток при сочетанном воздействии афферентной и фармакологической стимуляции, что подтверждает участие многочисленных рецепторов серотонина, локализованных на мотонейронах, в организации локомоции. При тренировке крыс на фоне введения квинпина происходит стимуляция рецепторов серотонина дистального отдела спинного мозга, что приводит к улучшению восстановления локомоторной активности задних конечностей и в описанных пластинках Рекседа обнаруживается большое количество структурно сохранных клеток (табл. 3). В наших морфологических исследованиях у крыс 4-ой группы более чем в 3 раза увеличивается число морфологически неизмененных мотонейронов в IX пластинке Рекседа и в 2 раза – нейронов IV-V пластинок в сравнении с 1-ой группой животных (табл. 1 и 2). У крыс 2 группы значительно уменьшалось число клеток с явлениями хроматолиза и гиперхроматоза. У крыс 3 группы наблюдается наибольшее количество клеток с нормальной структурой: без признаков

деструкции оставались почти все мотонейроны и клетки дорсальных рогов спинного мозга. В промежуточной зоне (пластинка VII) число нервных клеток без признаков деструкции достигало 75-% (табл. 2). Кроме того, в спинном мозге 2 и 3 групп животных обнаружены мотонейроны с сегрегацией ядрышка и редкими гранулами нисслевского вещества, что является последствием повышенной активности клеток.

Распределение синаптофизина в поясничных сегментах спинного мозга спинализированных крыс, после введения квиспина и локомоторных тренировок

У крыс 3 группы наиболее высокая среди всех исследованных опытных групп концентрация синаптофизин-иммунореактивной метки выявлена во всех пластинках (табл. 4). В большей части нейронов гранулы синаптофизина располагаются на мембране в виде пунктирной метки, как в норме и имеют высокую плотность в нейропиле. Полученные нами данные, предполагают формирование новых синапсов. Они могут происходить от различных интернейронов дистальной части спинного мозга, от чувствительных волокон из кожи, суставов, сухожилий и мышц. В исследованиях других авторов получены сходные данные после гемисекции спинного мозга. На поврежденной стороне пунктирная метка вокруг мотонейронов уменьшается и остается минимальной в течение нескольких недель после повреждения [Nascimento et al., 1995]. К 90-му дню наблюдения синаптофизин-иммунореактивные структуры восстанавливаются и метка становится сравнимой с таковой на неповрежденной стороне спинного мозга. Показано, что в центральной нервной системе реконструкция может происходить посредством роста или спраутинга терминалей из соседних областей в поврежденную зону [Raisman 1969].

В результате проведенного исследования установлено, что стимуляция серотонинергической системы значительно улучшает восстановление локомоторных функций спинного мозга. Эффект введения квиспина на восстановление двигательной активности также существенен, как эффект стимуляции афферентной системы. Одновременная стимуляция афферентной системы и серотонинергической системы, приводит не только к возникновению движений конечностей, характерных для ходьбы, но и к восстановлению функции поддержки веса тела. Средняя величина оценки двигательной активности после одновременного введения квиспина и стимуляции афферентной системы достоверно больше средних оценок двигательной активности после других воздействий (рис. 2). При этом морфологическое исследование показывает, что у животных, которых тренировали и вводили квиспин, наблюдается нормальная структура большей части нейронов и увеличение

количества синаптических контактов. При афферентной стимуляции в структурах дистального отдела спинного мозга может происходить спраутинг, волокна первичных афферентов контактируют с моторными нейронами через увеличение входов к интернейронам. Физиологические эксперименты позволяют предположить, что стимуляция афферентной системы активирует дополнительные связи, которые компенсируют потерю нисходящих входов. Этому способствует и воздействие на серотонинергическую систему, которая как показано, значительно модулирует локомоцию [Schmidt, 2000]. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что после полной перерезки спинного мозга структуры дистального отдела ответственные за формирование двигательной активности - мотонейроны, интернейроны и афферентное звено - реорганизуются, образуя нейронные сети, способные индуцировать локомоторную активность задних конечностей.

ВЫВОДЫ

1. Спинной мозг крыс, изолированный от супраспинальных влияний, обладает высокой пластичностью и способен к структурно-функциональной реорганизации, обеспечивающей восстановление двигательной активности.
2. Системное введение спинализированным крысам агониста рецепторов серотонина - квипазина в сочетании с локомоторными тренировками на тредбане способствует восстановлению локомоторной функции задних конечностей и функции поддержки веса тела.
3. Выявлены ранние моносинаптические и поздние полисинаптические компоненты в рефлекторных мышечных ответах у крыс при эпидуральной электрической стимуляции первого крестцового сегмента. После спинализации полисинаптические компоненты отсутствуют, их появление коррелирует с восстановлением локомоторной функции.
4. Обнаружено, что после спинализации восстановление двигательных способностей в результате локомоторной тренировки и активации рецепторов серотонина связано с морфологической сохранностью структур дистального отдела изолированного спинного мозга.
5. Показано, что количество сохранивших нормальную структуру нейронов в IV-V, VII, VIII IX, X пластинках Рекседа дистального отдела поврежденного спинного мозга увеличивается после тренировки и стимуляции рецепторов серотонина.

6. При иммуногистохимическом исследовании установлено, что у спинализированных крыс после локомоторных тренировок и введения кvipазина происходит увеличение числа синапсов в нейропиле и на плазмолемме нейронов, обеспечивающих локомоцию после повреждения спинного мозга.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Е.Г.Гилерович, Т.Р. Мошонкина, Е.А.Федорова, Т.Т. Шишко, Н.В.Павлова, Ю.П. Герасименко, В.А.Отеллин. Морфо-функциональная характеристика поясничного утолщения спинного мозга крысы // Морфология.- 2007.- N5.- С. 33-37
2. Е.Г.Гилерович, Т.Р.Мошонкина, Н.В.Павлова, Е.А.Федорова, Г.И.Новиков, Ю.П.Герасименко, В.А.Отеллин Морфо-функциональное исследование дистального отдела спинного мозга крыс после полной экспериментальной перерезки с последующей тренировкой животного на тредбане // Журнал эвол. биохимии и физиологии.- 2008.- Т.44.N.6.- С.636-643.
3. Мусиенко П.Е., Баранова Н.В(Павлова)., Селионов В.А., Герасименко Ю.П. Локомоция, вызванная эпидуральной стимуляцией у децеребрированной кошки, после повреждения спинного мозга // Биофизика.- 2009. - Т54. N 2.-С.293-300
4. Гилерович Е.Г., Мошонкина Т.Р., Павлова Н.В., Отеллин В.А., Герасименко Ю.П. Морфо-функциональное исследование поврежденного спинного мозга крыс после активации рецепторов серотонина и двигательных нагрузок // Доклады Академии Наук.- 2009.- Т.428. N 3.- С.413-416.
5. Гилерович Е.Г., Мошонкина Т.Р., Павлова Н.В., Федорова Е.А., Шишко Т.Т. Иммуногистохимическая характеристика поясничного утолщения спинного мозга после полной перерезки с последующей тренировкой экспериментальных крыс // Материалы V Международной конференции по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения – 2006».- С.49
6. Гилерович Е.Г., Мошонкина Т.Р., Павлова Н.В., Новиков Г.И. Локомоторные тренировки крыс с полной перерезкой спинного мозга препятствуют глиозу дистального отдела спинного мозга // Материалы XX Съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова: тезисы доклада.- Москва, 2007.- С. 192-193.
7. Павлова Н.В. Исследование синаптофизин-иммунореактивных структур в спинном мозге спинализированных крыс после локомоторных тренировок // Межинститутская

конференция молодых ученых. Санкт-Петербург-Колтуши, 2007.-С.59

8. Павлова Н.В., Мошонкина Т.Р., Гилерович Е.Г. Морфофункциональное исследование влияния афферентной и фармакологической стимуляции на «изолированное» поясничное утолщение спинного мозга крыс // II Российская конференция по управлению движением: тезисы доклада.- Петрозаводск, 2008.- С. 70-72

9. Павлова Н.В. Гистологическое исследование спинного мозга крыс после полной экспериментальной перерезки и последующей хронической активации опорных реакций // Конференция молодых ученых, посвященная дню космонавтики: тезисы доклада.- Москва. 2008г.-С.48-49

10. Мошонкина Т.Р., Павлова Н.В., Герасименко Ю.П., Малыгин А.В. Опыт использования ТЭС-терапии для восстановления локомоции у спинальных крыс. Актуальные проблемы ТЭС-терапии: тезисы доклада.- Санкт-Петербург, 2008.- С.85-86

11. Павлова Н.В. Морфологическое исследование спинного мозга спинализированных крыс после локомоторной тренировки // Всероссийская конференция «Научное наследие академика Л.А. Орбели» : тезисы доклада.- Санкт-Петербург, 2008.-С.123

12. Мошонкина Т.Р., Павлова Н.В., Зеленкова Н.М., Новиков Г.И., Герасименко Ю.П. Исследование роли афферентов в организации локомоторных движений на экспериментальной модели спинализированных крыс с денервацией задних конечностей // Пятый Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии»: тезисы доклада.- Судак, 2009.- С.159

13. Павлова Н.В., Мошонкина Т.Р., Зеленкова Н.М., Герасименко Ю.П. Морфофункциональное исследование роли афферентов задних конечностей в восстановлении локомоции на модели спинальных крыс // Материалы VI Всероссийской с международным участием Школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности: тезисы доклада.- Москва, 2011.-С.63