

РАЗВИТИЕ НЕЙРОМЫШЕЧНОГО СИНАПСА В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ СОЧЕТАННОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕНЕРВАЦИИ

Т.Р. Ковригина, к.б.н., доцент; А.Д. Тяпкина, к.б.н., доцент

*Ярославский государственный педагогический университет
им. К.Д. Ушинского*

Целью исследования было изучение холинэстеразо (ХЭ)-позитивной зоны нейромышечного синапса (НМС) икроножной мышцы белой крысы при сочетанной химической денервации. Качественные и морфометрические характеристики ХЭ-позитивной зоны НМС изучены у 72 интактных и подопытных животных с 14 до 180-суточного возраста. В условиях химической денервации в икроножной мышце динамика изменений ХЭ-позитивной зоны НМС свидетельствует об ускорении появления качественных признаков, характеризующих периоды ее дефинитивного состояния и возрастной деструкции, и об отставании в росте мерных параметров.

Ключевые слова: нейромышечный синапс, холинэстераза, денервация.

The purpose of this investigation was to study the influence of chemical denervation on cholinesterase (ChE)-positive zones of motor end-plate (MEP) of the white rat gastrocnemius muscle. The qualitative and morphometric parameters of ChE-positive zones were studied. The results were demonstrated using a modified thioacetic acid method on 72 control and experimental animals aged from 14 to 180 days. During chemical denervation the dynamic of MEP ChE-positive zones changes indicates the acceleration of qualitative characteristics, which characterize periods of definitive status and age connected destruction, and the retention of the morphometric parameters in grows.

Key words: motor end-plate, cholinesterase, denervation.

В связи с запросами практической и теоретической медицины, определенное внимание исследователей было направлено на изучение реакции двигательного окончания скелетной мускулатуры при различных видах денервации – смешанной, чувствительной, симпатической. Многочисленные исследования нейроморфологов и физиологов показали специфику развития дистрофических и компенсаторных изменений при различных видах денервации [1, 2].

К настоящему времени установлено, что изолированная химическая десимпатизация и деафферентация вызывает гибель значительной части нейроцитов грудного и крестцового спинномозгового ганглия [5]. В меньшей степени изучено влияние сочетанной химической денервации на состояние НМС.

Цель исследования. Изучение ХЭ-позитивной зоны нейромышечного синапса икроножной мышцы белой крысы при сочетанной химической денервации.

Материал и методы. Исследование проведено на 72 белых крысах. Сочетанной химической денервации достигали однократным введением на 2-е сутки после рождения капсаицина подкожно (100 мг/ кг), с последующим введением с 3-х по 40-е сутки внутрибрюшинно раствора изобарина (Плива) (60 – 70 мг/кг). Контролем служили интактные животные. Подопытных и интактных животных выводили из опыта с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минвуза от 13. 11. 1984г. № 724) под нембуталовым наркозом в 14-, 21-, 30-, 60-, 90- и 180-суточном возрасте. Объектом исследования служила медиальная головка икроножной мышцы белой крысы. Активность ХЭ определяли на свободно плавающих срезах

модифицированным методом с тиюксусной кислотой [3]. Результаты гистохимической реакции оценивали по качественным параметрам и результатам прямой и непрямой морфометрии. На стандартной площади окулярной сетки подсчитывали суммарное количество выявляемых ХЭ-позитивных зон, процент НМС с простой и сложной конструкцией ферментоактивных зон (ФАЗ), определяли площадь сечения области НМС. Диаметр мышечного волокна (МВ) и диаметр сечения НМС измеряли с помощью окуляр-микрометра. Распределение значений для всех морфометрических показателей носило нормальный характер. Достоверность различий средних величин показателей оценивали на основании t-критерия Стьюдента с уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В мышцах интактных животных в 14-суточном возрасте активность ХЭ в области НМС характеризовалась как низкая (длительность инкубации срезов 30 мин). У 21% конструкций отмечено появление очагов просветления в плотном гомогенном характере конечного продукта реакции, т. е. начала дифференцировки ФАЗ на простые и сложные.

Выраженность активности ХЭ в области НМС достигала дефинитивного уровня к 30-суточному возрасту (время инкубации срезов 10 – 15 мин). В этом возрасте процент сложных конструкций достиг 45%. Среди сложных ФАЗ большинство составляли замкнутые структуры. С 60-суточного возраста количество НМС со сложной ФАЗ стало преобладающим (66%) и в 180-суточном возрасте составляло 78%. С 90-суточного возраста увеличивалось разнообразие НМС со сложной ФАЗ. Сложные конструкции имели трабекулярное строение с замкнутым и незамкнутым контуром.

Икроножная мышца 180-суточных животных имела низкий показатель иннервированности. В этом возрасте выявлялись неравномерность распределения активности ХЭ в трабекулах ФАЗ, наличие ФАЗ с низкой активностью ХЭ, с четкообразными и фрагментированными трабекулами, НМС с редуцированной ФАЗ, обнаруживались внесинаптическая активность ХЭ и глобулярные ФАЗ (рис.). Таким образом, в 180-суточном возрасте выявлялись дистрофические и регенераторные изменения ФАЗ НМС.

В первые две недели после рождения диаметр ФАЗ практически соответствовал диаметру МВ. Затем диаметр МВ увеличивался в большей степени, чем диаметр сечений области НМС. Их соотношение в 14-суточном возрасте составляло 0,63. В изучаемый период темпы увеличения диаметра МВ опережали темпы роста диаметра сечения НМС и в 60-суточном возрасте соотношение диаметра НМС со сложной ФАЗ стабилизировалось. Эта закономерность сохранялась и при исследовании отношения диаметра НМС с простой ФАЗ к диаметру МВ.

На протяжении последних недель первого месяца постнатальной жизни устанавливается постоянное соотношение числа НМС, приходящихся на одно МВ. С возрастом этот показатель «иннервированности» снижался с 0,94 в 14-суточном возрасте до 0,59 в 180-суточном. Происходит интенсивный рост площади сечения области НМС (площадь НМС со сложной ФАЗ увеличивалась с $104,66 \pm 5,47$ мкм² в 14-суточном возрасте до $461,96 \pm 11,11$ мкм² в 180-суточном), увеличивается показатель соотношения диаметра сечения области НМС к мышечному волокну. Последнее свидетельствует об опережающем росте размеров сечения НМС, по сравнению с МВ. С 60-суточного возраста происходило интенсивное увеличение диаметра МВ, отношение диаметра области НМС с простой ФАЗ к диаметру МВ уменьшалось, а отношение диаметра области НМС со сложной ФАЗ к диаметру МВ стабилизировалось, что свидетельствует о неравнозначности возрастных преобразований различных двигательных окончаний. С 90-суточного возраста происходит относительная стабилизация изученных мерных показателей.

В условиях дефицита симпатической и афферентной иннервации в 14-суточном возрасте отмечено снижение, по сравнению с контролем, активности ХЭ (время инкубации срезов до 50 мин). Только к 60-суточному возрасту длительность инкубации срезов была сопоставима со временем инкубации срезов мышц интактных животных.

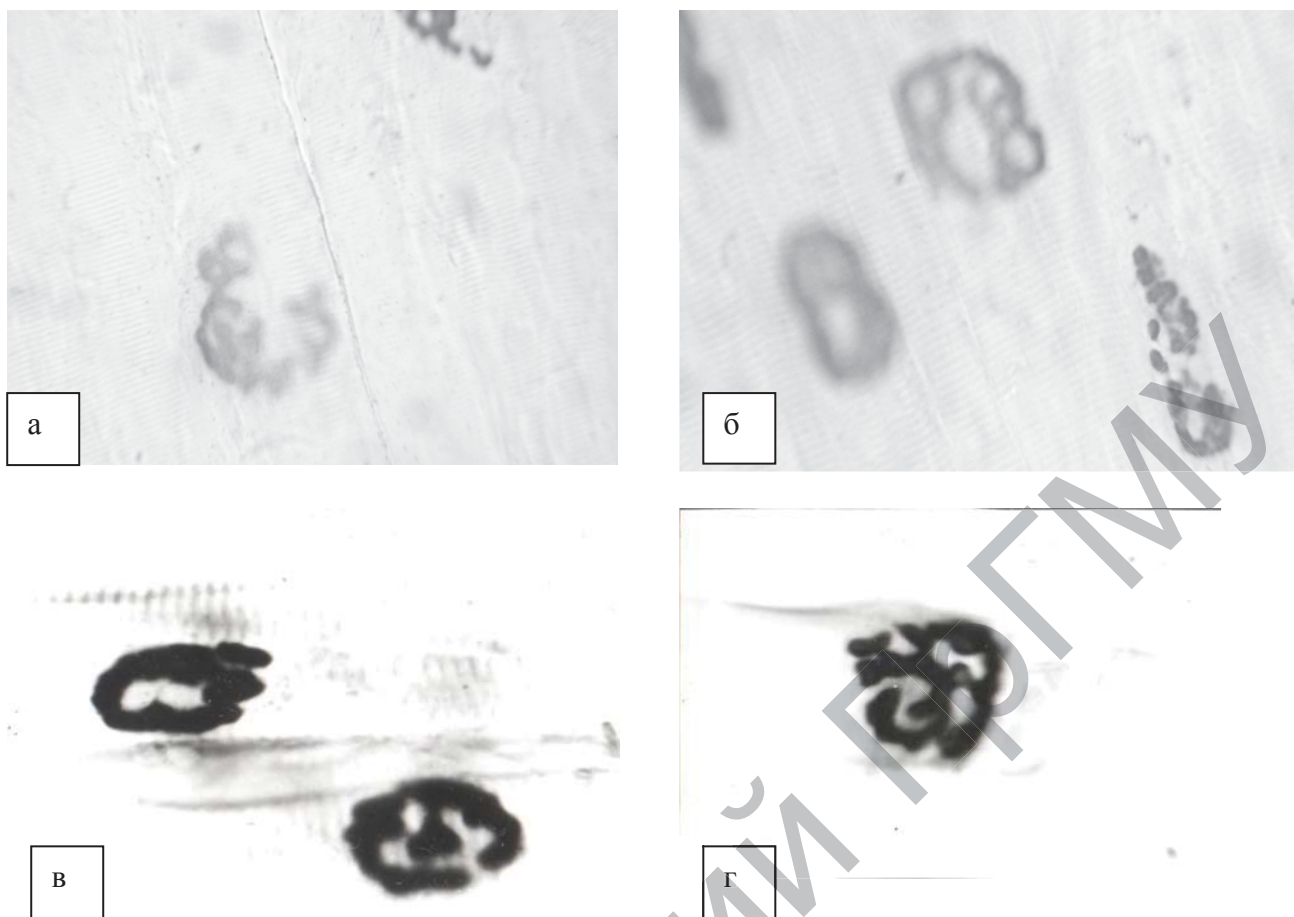


Рисунок – Нейромышечный синапс в икроножной мышце 180-суточных, после сочетанной химической десимпатизации и деафферентации (а, б), и интактных (в, г), белых крыс
а) разрушение трабекул ФАЗ НМС и снижение активности фермента;
б) глобулярная форма НМС;
в, г) НМС со сложной ХЭ-позитивной зоной НМС
Определение активности АХЭ методом с тиюксусной кислотой. Ок. 10[×]. Об. 40[×].

В 14-суточном возрасте обнаружены признаки дифференцировки на простые и сложные конструкции, но только 9,96% конструкций имели центральное просветление в гомогенном характере конечного продукта реакции (контроль – 21%). В 21-суточном возрасте отчетливо определялись простые и сложные ФАЗ: сложные ФАЗ составляли 13,72% (28,45% – контроль). В 180-суточном возрасте доля НМС со сложной ФАЗ была значимо ниже у подопытных животных (контроль – 78,33%, опыт – 72,25%).

Среди сложных ФАЗ с 30-суточного возраста обнаружены упрощенные конструкции с истонченными трабекулами и усложненные – с разветвленными трабекулами. Характерно наличие переходных форм за счет трансформации НМС с простой ФАЗ в НМС со сложной ФАЗ, а также редукции ферментонегативной зоны сложных ФАЗ за счет утолщения трабекул; выявляются глобулярные ФАЗ (рис.). С 90-суточного возраста отмечено наличие, наряду с ХЭ-позитивными зонами, типичными для НМС интактных животных, атипичных конструкций: в части ФАЗ трабекулы были истончены, фрагментированы, имели четкообразный вид. Выявлялись зоны с неравномерным распределением активности ХЭ. Около некоторых ФАЗ определялась внесинаптическая активность. Эти признаки совпадали с описанными выше признаками возрастных проявлений деструкции ФАЗ НМС, но выражены они были в большей степени. Отмечено снижение активности фермента до следовой во все исследуемые периоды, не характерное для интактных животных.

Усложнение простых конструкций, разрастание трабекул сложных ФАЗ, появление глобул ферментативной активности трактуется как компенсаторная реакция.

Характерной чертой для ХЭ-позитивных зон НМС была меньшая их величина: в 14-суточном возрасте площадь сечения области НМС со сложной ФАЗ составляла $58,97 \pm 9,34$ мкм² (у интактных животных – $104,66 \pm 5,47$ мкм²). К 30-суточному возрасту различия в размерах сечений НМС со сложной ФАЗ нивелировались. Это можно объяснить только большей интенсивностью роста изначально меньших структур. Выявленные в мышцах подопытных животных первых двух недель постнатальной жизни НМС с простой ФАЗ также имели меньшую площадь сечения. Различия нивелировались только к 90-суточному возрасту.

Малые размеры сечения области НМС в 14-суточном возрасте соответствовали меньшим значениям диаметра МВ: средний диаметр волокон икроножной мышцы равнялся в 14- и 21-суточном возрасте $8,79 \pm 0,32$ мкм и $13,61 \pm 0,57$ мкм (контроль – $14,59 \pm 0,23$ и $14,90 \pm 0,26$ мкм). Позднее разница в толщине МВ была не столь существенна. Однако с 30-суточного возраста выявлялась жировая дистрофия. Соотношение диаметра МВ и области сечения НМС, располагающихся на них, достигало значений, сопоставимых с контролем только к 90-суточному возрасту, когда показатель равнялся 0,55.

Проведенное исследование показало, что у интактных животных к 30-суточному возрасту устанавливается постоянное соотношение числа НМС, приходящихся на одно МВ, выраженность ХЭ достигает дефинитивной; к 60-суточному возрасту устанавливается соотношение основных конструктивных форм; к 90-суточному – происходит стабилизация изученных мерных показателей.

У подопытных животных, как и у интактных, отмечается прогрессивное увеличение мерных параметров как МВ, так и сечения области НМС, т.е. рост МВ и НМС у денервированных животных сохраняется. Необычным является обнаружение в условиях сочетанной химической десимпатизации и деафферентации меньшего, чем в норме, диаметра МВ. Различия между диаметром МВ, меньших у подопытных животных, сохранялись до 30-суточного возраста. Задержку роста диаметра МВ в условиях эксперимента можно объяснить массовой гибелью симпатоглиальных клеток на протяжении введения гуанетидина [5]. Возможно, следствием изменений является замедление развития НМС, размеры которых связаны с диаметром МВ [6]. Не исключено, что замедление развития двигательных окончаний происходит вследствие прямого токсического действия гуанетидина на мотонейроны, нервные волокна и нервные окончания или нарушения симпатической иннервации микрососудов. Более раннее, по сравнению с интактными животными, появление в области НМС дистрофических изменений в условиях сочетанной десимпатизации и деафферентации, характеризующих инволютивные деструктивные процессы, расценивается как проявление преждевременного старения.

Заключение. Таким образом, динамика изменений ХЭ-позитивной зоны НМС свидетельствует об ускорении появления качественных признаков, характеризующих периоды ее дефинитивного состояния и возрастной деструкции. Нормализации обнаруженных отклонений в развитии МВ и НМС денервированной икроножной мышцы не отмечено до конца наблюдения.

Литература

1. Ажипа Я.И. Трофическая функция нервной системы / АН СССР, Отд-е физиологии. – М.: Наука, 1990. – 671с.
2. Говырин В.А. Адаптационно-трофическая функция сосудистых нервов // Развитие научного наследия академика Л.А. Орбели. – Л.: Наука, 1982. – С.169 – 181
3. Николаев Г.М., Шилкин В.В. Опыт определения активности ацетилхолинэстеразы в структурах периферической нервной системы // проблемы морфогенеза периферических нервов: сб. трудов ЯМИ. Ярославль, 1983. – С.64 – 72

4. Огнетов С.Ю., Сабельников Н.Е, Чучков В.М. Нейромышечный синапс: органный характеристика, возрастные преобразования / под ред. проф. Шилкина В.В. – Ижевск. – 2002. – 164с.
5. Румянцева Т.А. Влияние химической денервации на нейроны экстра- и интрамуральных ганглиев в постнатальном онтогенезе белой крысы: Автореф...докт. мед. наук. – С.-Пб, 2002. – 42с.
6. Шилкин В.В., Филимонов В.И. Зависят ли размеры нейромышечного синапса от диаметра мышечного волокна // Российские морфологические ведомости, 1996. - № 2(5). – С.135 – 139