

УДК 612.822.5

Э. И. Сливко, С. В. Чернышева

КОНЦЕНТРАЦИЯ РНК В МОТОНЕЙРОНАХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СПИННОГО МОЗГА ПРИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОЙ АНТИДРОМНОЙ АКТИВАЦИИ

Концентрация РНК в нервных клетках зависит от их функционального состояния и изменяется при различных воздействиях на центральную нервную систему. Интенсивная и продолжительная функциональная активность приводит преимущественно к снижению содержания РНК в цитоплазме нейронов. Уменьшение концентрации цитоплазматической РНК в спинальных мотонейронах отмечено при длительной физической нагрузке [1, 13, 14], судорожных припадках [7], продолжительной стимуляции кожных рецепторов [6, 8] и афферентных нервных волокон [1, 2, 3]. Снижение концентрации РНК в мотонейронах обычно сопровождается аналогичными изменениями в глиальных клетках-сателлитах [1, 5, 6, 7].

Ряд экспериментальных данных привел к заключению о том, что причиной сдвигов концентрации РНК в нейронах при их возбуждении является действие медиатора на субсинаптическую мембрану; импульсная же активность сама по себе не влияет на метаболизм нуклеиновых кислот [2, 12, 15]. Так в опытах на крысах было показано, что антидромная стимуляция спинальных мотонейронов, в отличие от транссинаптической, не изменяет содержания РНК ни в самих мотонейронах, ни в глиальных клетках [2]. Однако этот вывод основан лишь на эффекте стимуляции при частоте 1 Гц, которая низка даже в сравнении с минимальной частотой разряда мотонейронов при произвольных движениях.

Мы изучали изменения концентрации РНК в мотонейронах или глиальных клетках при более высокой частоте антидромной активации. Стимуляцию производили при частоте 40 Гц, близкой к максимально высокому ритму разряда мотонейронов в условиях антидромного раздражения [9]. Исследован также эффект стимуляции при частоте 100 Гц, вызывающей весьма значительную трансформацию ритма разряда мотонейронов. В последнем случае предполагалось изучить компенсаторные возможности системы нейрон — глия при ее функциональном напряжении.

Методика исследований

Опыты проведены на кошках весом 2,5—3,5 кг. Под хлоралозо-нембуталовым наркозом производили ламинэктомию в области пояснично-крестцового утолщения и препаровку передних корешков спинного мозга L_7 и S_1 . Посредством генератора прямоугольных импульсов осуществляли антидромную стимуляцию левых передних корешков в течение 20 мин при частоте 40 и 100 Гц.

Показателем изменения возбудимости мотонейронов служила величина их фокального потенциала, который регистрировали с помощью металлического электрода, введенного в область вентрального рога серого вещества спинного мозга. Для регистрации применяли усилитель биопотенциалов УБП2-03 и электронный осциллограф С1-18.

Непосредственно после окончания стимуляции сегменты L_7 и S_1 иссекали, фиксировали в жидкости Карнуа и после обезжизивания в спиртах и хлороформе производили их заливку в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону. Концентрацию нуклеиновых кислот в цитоплазме спинных мотонейронов и их глиальных клетках-сателлитах определяли методом сканирования с помощью цитоспектрофотометра МУФ-5. Длина волны соответствовала максимуму поглощения галлоцианина. Для калибровки прибора применяли серию ослабителей. Концентрацию нуклеиновых кислот выражали в единицах оптической плотности.

При сканировании мотонейронов зонд цитоспектрофотометра проводили дважды через цитоплазму по обе стороны клеточного ядра [1]. Известно, что окраска галлоцианином выявляет не только РНК, но и ДНК [11]. Но содержание ДНК в цитоплазме весьма незначительно и поэтому таким путем измерялась именно концентрация РНК. При обследовании глиальных клеток отбирали только те из них, расстояние от которых до поверхности мотонейронов не превышало собственного диаметра глии. Таких клеток вокруг одного мотонейрона было обычно не более двух-трех. Зонд цитоспектрофотометра проводили однократно через центральную часть глиальной клетки, включающую как цитоплазму, так и ядро. Однако и в этом случае наблюдаемые сдвиги концентрации нуклеиновых кислот следует отнести за счет РНК, поскольку содержание ДНК, как генетического материала, является относительно стабильным и не могло измениться существенно за период стимуляции.

Мотонейроны и глию фотографировали на пленку «Микрат-200» при объективе 48 и окуляре 3. Показателем размера клеток служила площадь, занимаемая ими в срезе, которую определяли посредством планиметрии увеличенных негативов.

Концентрацию нуклеиновых кислот в цитоплазме мотонейронов, подвергнутых стимуляции, и перинейрональной глии, а также их размеры сравнивали с соответствующими показателями у клеток контралатеральной стороны, которые служили контролем. Статистическую значимость различий между этими показателями определяли с помощью критериев χ^2 и λ .

Результаты исследований и их обсуждение

Антидромная стимуляция мотонейронов вызывала изменения амплитуды и формы их фокального потенциала. Происходило увеличение его латентного периода и продолжительности. Увеличивался интервал между компонентами ответа, соответствующими возбуждению начального сегмента аксона и сомы мотонейронов. При частоте 40 Гц амплитуда фокального потенциала снизилась к концу периода стимуляции до $62 \pm 5\%$ исходного уровня. Еще более значительные изменения наблюдались при частоте стимуляции 100 Гц. Амплитуда фокального потенциала уменьшилась за время стимуляции до $20 \pm 1\%$ исходной величины.

В первой серии опытов у пяти кошек изучали концентрацию РНК в цитоплазме мотонейронов при частоте раздражения 40 Гц. Обследовано в общей сложности 100 мотонейронов на стороне спинного мозга, подвергнутой стимуляции, и 100 на противоположной его стороне. Опыты обнаружили увеличение концентрации РНК в цитоплазме мотонейронов при антидромной стимуляции. Если в контроле она составляла в среднем $0,246 \pm 0,006$, то после раздражения — $0,281 \pm 0,007$, что соответствует увеличению на 14,2% ($p < 0,01$). Наиболее значительные изменения наблюдались в крупных мотонейронах. На рис. 1 показана гистограмма распределения мотонейронов в зависимости от концентрации РНК в их цитоплазме в контроле и при данной частоте стимуляции.

Во второй серии опытов у шести кошек исследовано 120 мотонейронов, подвергнутых стимуляции частотой 100 Гц, и 120 контрольных. Средняя концентрация РНК в цитоплазме нейронов составила $0,257 \pm 0,005$ в контроле и $0,249 \pm 0,007$ в эксперименте. Статистический анализ не обнаружил значимых различий между этими показателями ($p > 0,1$).

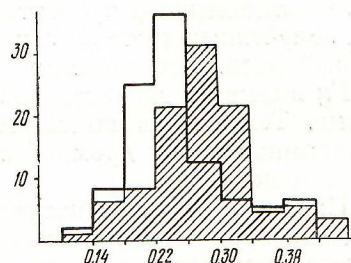
Размеры мотонейронов не претерпели существенных изменений в обеих сериях опытов. В первой серии они составляли в среднем 2420 ± 64 мкм² в контроле и 2300 ± 53 мкм² при стимуляции ($p > 0,5$).

Во второй серии опытов эти показатели составляли соответственно 2270 ± 58 и 2300 ± 52 $\mu\text{км}^2$ ($p > 0,5$). Не было обнаружено и статистически значимых изменений размера ядер мотонейронов.

Концентрация нуклеиновых кислот в перинейрональных глиальных клетках изучена при частоте раздражения 40 Гц в опытах на пяти

Рис. 1. Гистограмма распределения мотонейронов в зависимости от концентрации РНК в их цитоплазме в контроле (белые столбики) и при антидромной стимуляции (заштрихованные столбики) передних корешков спинного мозга частотой 40 Гц.

По горизонтали — концентрации РНК, по вертикали — количество нейронов.



кошках. Обследовано 127 клеток на стороне спинного мозга, подвергнутой антидромной стимуляции, и 130 на противоположной стороне. Опыты показали, что в глии, в отличие от мотонейронов, наблюдается

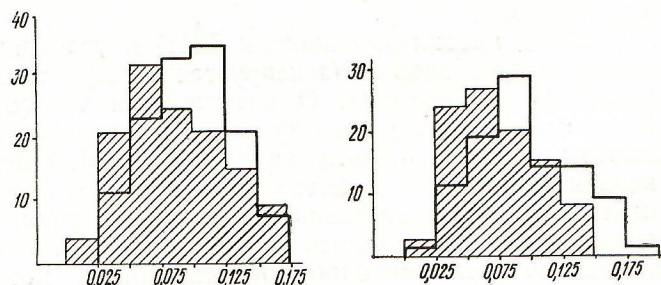


Рис. 2. Гистограммы распределений глиальных клеток в зависимости от концентрации в них нуклеиновых кислот в контроле (белые столбики) и при антидромной стимуляции (заштрихованные столбики) передних корешков спинного мозга частотой 40 Гц (слева) и 100 Гц (справа).

По горизонтали — концентрация нуклеиновых кислот, по вертикали — количество клеток.

уменьшение концентрации РНК. Если в контроле концентрация нуклеиновых кислот составила $0,098 \pm 0,003$, то в условиях стимуляции $0,087 \pm 0,004$, то-есть на 11,2% меньше. Это различие обнаруживается при анализе соответствующих распределений глиальных клеток (рис. 2) и является статистически значимым ($p = 0,05$).

Еще более значительные изменения в перинейрональной глии были отмечены при частоте раздражения 100 Гц. В опытах на четырех кошках было обследовано 98 клеток в условиях антидромной стимуляции и 96 на контралатеральной стороне спинного мозга. Концентрация нуклеиновых кислот в контроле составляла в среднем $0,094 \pm 0,004$, а при раздражении $0,075 \pm 0,003$ ($p < 0,01$). Различие между этими показателями составляет 20,5%. Таким образом, в данной серии опытов наблюдалось значительное уменьшение концентрации РНК в клетках-сателлитах. Такое явление обнаруживается и при сравнении соответствующих распределений глиальных клеток (рис. 2).

Статистически значимых изменений размеров глиальных клеток не наблюдалось. В первой серии опытов (частота 40 Гц) они составляли в контроле 33 ± 1 $\mu\text{км}^2$, а после антидромной стимуляции мотонейронов 29 ± 1 ($p > 0,1$). Во второй серии (частота 100 Гц) размеры перинейрональной глии составили соответственно 32 ± 1 и 29 ± 1 $\mu\text{км}^2$ ($p > 0,2$).

Таким образом, результаты опытов говорят о том, что длительная антидромная активация вызывает угнетение возбудимости мотонейронов, особенно выраженное при частоте раздражения 100 Гц. Между тем, в этих условиях не наблюдается снижения концентрации РНК в цитоплазме мотонейронов, а при частоте 40 Гц она даже повышается. В этом отношении результаты опытов существенно отличаются от данных, полученных другими авторами при транссинаптической стимуляции мотонейронов. Так известно [3], что ортодромная активация частотой 100 Гц вызывает значительное снижение концентрации РНК в их цитоплазме. Тем самым подтверждается неодинаковый характер влияния антидромной и ортодромной стимуляции на концентрацию РНК в цитоплазме нейронов.

Наряду с этим, из полученных данных следует, что концентрация РНК в нейроне способна изменяться не только в результате действия на него медиатора, но и вследствие импульсной активности. Об этом свидетельствует, в частности, увеличение концентрации РНК в цитоплазме мотонейронов при частоте раздражения 40 Гц. Поскольку при этом не наблюдалось существенных сдвигов размера мотонейронов, можно полагать, что в данном случае отмечалось повышение содержания РНК в их цитоплазме.

Возможно, расход цитоплазматической РНК в условиях длительного возбуждения мотонейронов компенсируется в результате усиления процессов клеточного метаболизма. О возможности такого усиления говорит повышение активности ряда ферментов в цитоплазме мотонейронов при частоте антидромной стимуляции 40 Гц [10]. Еще более вероятно, что концентрация РНК в мотонейронах поддерживается или даже увеличивается за счет поступления ее из перинейрональной глии. С этой точки зрения можно объяснить снижение концентрации РНК в глиальных клетках во время антидромной стимуляции мотонейронов. Подобное явление было отмечено ранее [4] при антидромном раздражении гигантского нейрона моллюска.

По-видимому, при частоте стимуляции 100 Гц усиливается расход РНК в цитоплазме мотонейронов. Поэтому, несмотря на еще более значительное уменьшение концентрации РНК в глиальных клетках, ее содержание в мотонейронах не увеличивается, а лишь поддерживается на уровне, близком к исходному. Таким образом, система нейрон — глия обладает значительными адаптационными возможностями, благодаря которым концентрация цитоплазматической РНК в нейроне может оставаться стабильной даже в условиях весьма продолжительной и частой импульсной активности.

Л и т е р а т у р а

1. Гейнисман Ю. Я., Ларина В. Н., Мац В. Н. Изменение содержания РНК в нервных и глиальных клетках при естественной и искусственной активации нейронов. Цитология, 1970, 12, № 8, с. 1028—1038.
2. Гейнисман Ю. Я., Ларина В. Н., Мац В. Н. Синаптические влияния как причина количественных изменений нейрональной РНК.— ДАН СССР, 1970, 192, № 1, с. 232—234.
3. Диденко А. В., Меркулова О. С. Изменение содержания SH-групп и РНК в мотонейронах спинного мозга кошки при раздражении заднего корешка импульсами электрического тока разной частоты.— ДАН УССР, 1966, 171, № 2, с. 487—489.
4. Дьяконова Т. Л. Активация синтеза РНК в глиальных клетках — сателлитах при генерации нейроном потенциалов действия. Цитология, 1972, 14, № 9, с. 1147—1155.
5. Певзнер Л. З. Обмен веществ в нейроне.— В кн.: Механизмы деятельности центрального нейрона. М.-Л.: Наука, 1966, с. 7—33.
6. Певзнер Л. З., Хайдарлиу С. Х. Содержание нуклеиновых кислот в чувствительных и двигательных нейронах спинного мозга и их глиальных клетках — сателлитах при

- различных функциональных состояниях нервной системы.— Цитология, 1967, 9, № 7, с. 840—847.
7. Саударгене Д. С. Динамика изменений количества РНК в нейронах и нейроглии спинного мозга при коразоловых судорогах и последующем покое.— Цитология, 1969, 11, № 5, с. 642—645.
 8. Тонкоглас В. П., Хайдарлиу С. Х. Функциональные изменения активности холинэстеразы и содержания нуклеиновых кислот в чувствительных и двигательных отделах мозга.— В кн.: Физиология и биохимия ядер мозга. Кишинев, 1971, с. 89—96.
 9. Шаповалов А. И. Клеточные механизмы синаптической передачи.— М.: Медицина, 1966.— 317 с.
 10. Яхниця О. Г., Сливко Е. И., Чернишева С. В. Вплив тривалого подразнення мото-нейронів спинного мозку на активність їх ферментативних систем.— IX з'їзд Українського фізіологічного товариства. Тези доповідей, Київ: Наукова думка, 1972, с. 438.
 11. Einarson L. On the theory of Gallocyaninchromalum staining and its application for quantitative estimation of basophilia.— Acta Pathol. Microbiol. scand., 1951, 28, N 1, p. 82—102.
 12. Gisiger V. Triggering of RNA synthesis by acetylcholine stimulation of the rostsynaptic membrane in a mammalian sympathetic ganglion.— Brain Res., 1971, 33, N 1, p. 139—146.
 13. Gmirato G. Quantitative evaluation of the metabolic variations in the spinal motor root cells, studied by biophysical method and following adequate stimulation (muscular fatigue). Action on metabolism of vitamin B₁₂.— J. Neuropathol. exp. Neurol., 1954, 13, N 2, p. 359—368.
 14. Hochberg I. Preliminary studies on the effect of exhaustion on the anterior horn cells of the rabbit.— Acta Pathol. Microbiol. scand., 1955, 36, N 5, p. 391—414.
 15. Kernell D., Peterson R. P. The effect of spike activity versus synaptic activation on the metabolism of ribonucleic acid in a molluscan giant neurone.— J. Neurochem., 1970, 17, N 7, p. 1087—1094.

Кафедра нормальной физиологии
Запорожского медицинского института

Поступила в редакцию
3.II 1978 г.

E. I. Slivko, S. V. Chernysheva

RNA CONCENTRATION IN MOTONEURONS AND GLIAL CELLS OF THE SPINAL CORD UNDER PROLONGED ANTIDROMIC ACTIVATION

Summary

Prolonged antidromic stimulation of the cat spinal motoneurons at a rate of 40-100 Hz resulted in depression of their electrical activity. The RNA content in motoneurons was almost the same or somewhat higher. The content of RNA in glial cells was decreased.

Department of Normal Physiology,
Medical Institute, Zaporozhie