

ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ С ПОМОЩЬЮ ИММУНО-ГИСТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ БЕТА-ТУБУЛИНА III

STUDY OF REGENERATING NERVOUS FIBERS IN THE RAT SCIATIC NERVE USING IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF BETA-TUBULIN III

**E. Petrova
E. Kolos**

Summary. The method of immunohistochemical detection of the beta-tubulin III made it possible to assess the degree of regeneration of the fibers of rat sciatic nerve after ligation (40 s). During the period from 1 to 8 weeks after surgery, the area of the nerve trunk containing beta-tubulin III-immunopositive structures increased, but did not reach the level of the intact nerve. The model will be used to assess nerve recovery after use in cell therapy experiment.

Keywords: immunohistochemistry, regeneration, nerve, beta-tubulin III.

Петрова Елена Сергеевна

К.б.н., с.н.с., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург)

Колос Елена Андреевна

М.н.с., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург)

ietmorphol@yandex.ru

Аннотация. Применение иммуногистохимического выявления белка бета-тубулина III позволило оценить динамику регенерации волокон седалищного нерва крысы после передавливания (наложения лигатуры в течение 40 с). В разные сроки после повреждения в дистальном сегменте нерва описано изменение размера площади поперечного среза, содержащей бета-тубулин III — иммунопозитивные структуры. Показано, что в период с 1 по 8 неделю после повреждения площадь, занятая нервными волокнами в дистальном сегменте поврежденного нерва постепенно увеличивается, но не достигает уровня интактного нерва. Разработанная модель будет использована в дальнейшей работе для оценки регенерации нервных проводников при экспериментальной клеточной терапии нерва.

Ключевые слова: иммуногистохимия, регенерация, нерв, бета-тубулин III.

Введение

Бета-тубулин, наряду с альфа-, гамма- и другими формами тубулина, входит в состав микротрубочек (МТ), которые вместе с промежуточными филаментами формируют внутриклеточный скелет. Бета-тубулин III играет важную функциональную роль в морфогенезе нейронов [11]. Выявление бета-тубулина III широко используется исследователями, занимающимися нейрогенезом. Считается, что бета-тубулин III начинает синтезироваться в нервных клетках на определенной стадии дифференцировки и служит маркером молодых нейронов. В связи с этим этот белок часто используется в качестве иммуногистохимического маркера нервных клеток в развитии [обзоры: 1, 12]. Кроме того, известно, что количество бета-тубулина III, наряду с другими цитоскелетными белками (нейрофиламентами, актином и др.), особенно велико в периферических аксонах [13]. Аксоны получают непрерывную подачу цитоскелетных белков из тел нервных клеток медленным аксональным транспортом. Бета-тубулин III — структурный белок нейротрубочек, и одна из его функций — осуществление аксоплазматического транспорта.

Поиск способов восстановления периферических нервных проводников — проблема, разрабатываемая исследователями в течение нескольких десятилетий,

однако многие вопросы остаются нерешенными. Имеющиеся методы восстановления нервов путем совершенствования шовной техники и аутотрансплантации сегментов нерва часто не приводят к полному функциональному восстановлению нервных проводников. В связи с этим активно ведется поиск способов стимуляции регенерации поврежденных нервов. В наши дни одним из способов считается применение генной и клеточной терапии [обзоры: 7–10]. Для оценки степени восстановления поврежденных нервных стволов применяют физиологические тесты, методы измерения скорости проводимости по нерву и количественный анализ регенерирующих волокон. Для морфологической оценки, наряду с классическим способом подсчета числа регенерирующих волокон на поперечных полутонких срезах, можно применять иммуногистохимическое выявление специфических структурных и функциональных белков [5, 6]. Задача настоящей работы состояла в исследовании регенерации поврежденного седалищного нерва крысы, используя иммуногистохимическое выявление бета-тубулина III.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах Вистар ($n = 20$), у которых на уровне верхней трети бедра повреждали седалищные нервы (лигатура в течение 40 с). При работе с жи-

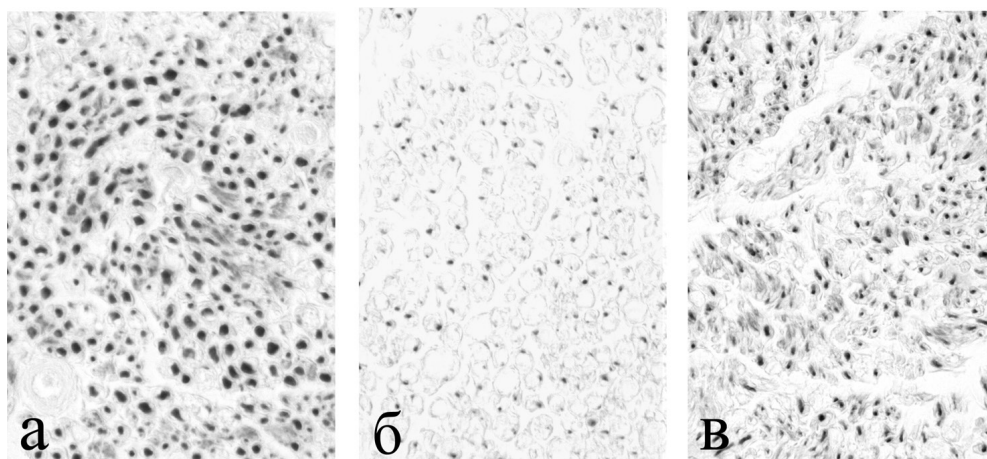


Рис. 1. Фрагменты поперечных срезов через дистальный конец седалищного нерва интактной крысы (а) и после наложения лигатуры: через 1 нед (б) и 3 нед (в). Иммуногистохимическая реакция на бета-тубулин III. Ув.: $\times 400$.

вотными руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Через 1, 3, 8 недели после операции выделяли фрагменты нерва дистальнее места повреждения и фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [2]. На парафиновых срезах проводили иммуногистохимическую реакцию на бета-тубулин III. Применяли мышинные моноклональные антитела к бета-тубулину III. В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора EnVision+System Labeled Polymer-HRP Anti-Mouse (K4001) (Dako, Дания). При анализе поперечных парафиновых срезов одного из трех стволов седалищного нерва (наиболее крупного) измеряли площадь, занятую тубулин-содержащими структурами (регенерирующими аксонами), в разные сроки после операции. Количественный анализ проводили на изображениях, полученных с помощью микроскопа Leica DM 750 и цифровой камеры Leica ICC50 при увеличениях $\times 400$. Площадь изображения составляла 82367 мкм^2 . Для измерений использовали программу ImageJ (NIH, США).

Результаты и обсуждение

На поперечных срезах седалищного нерва интактной крысы можно видеть, что бета-тубулин III-иммунопозитивные волокна разного диаметра прилегают друг к другу, между ними видны пространства, занятые миелиновыми оболочками, которые данным методом не окрашиваются (рис. 1). Неокрашенными остаются и другие структурные элементы нерва: эпиневральная и периневральная оболочки, кровеносные сосуды, коллагеновые волокна эндоневрия. Коричневый цвет приобретают только осевые цилиндры волокон, содержащие бета-тубулин III. Это позволяет исследовать уровень регенерации нерва

по размеру площади, занимаемой бета-тубулин III-иммунопозитивными структурами (нервными волокнами). Самые тонкие аксоны, которые позволил выявить этот метод достигали $0,7 \text{ мкм}$. В интактном нерве выявляются осевые цилиндры волокон разного диаметра: от $0,7 \text{ мкм}$ до $7\text{--}8 \text{ мкм}$. Площадь, занятая бета-тубулин III-иммунопозитивными структурами, составляет $10,5\%$ от площади изображения среза нерва. После повреждения большинство нервных волокон подвергаются валлеровской дегенерации [4, 8]. Практически одновременно начинают регенерировать тонкие аксоны и расти в дистальном направлении к тканям мишеням [4, 8]. Через 1 неделю после операции в дистальном конце нерва были обнаружены лишь отдельные тонкие нервные волокна (рис. 1, б). Диаметр наиболее крупных из них достигал 3 мкм . Возможно, что часть из них не является вновь образованными регенерирующими волокнами, а представляет собой тонкие волокна, которые сохранили свою целостность и не подверглись валлеровской дегенерации после наложения лигатуры. Через 3 недели после операции в дистальном сегменте поврежденного нерва уже имеется большое число тонких регенерирующих волокон (от $0,7 \text{ мкм}$ до $3\text{--}4 \text{ мкм}$ в диаметре). В период от 3 до 8 недель заметно увеличивается плотность регенерирующих волокон, увеличивается также число волокон с большим диаметром.

Для оценки восстановления нервных волокон в разные сроки после наложения лигатуры на поперечных срезах через дистальный конец поврежденного нерва проводили количественный анализ, при котором определяли долю площади, занимаемой структурными элементами, содержащими бета-тубулин III. Оказалось, что она достоверно отличалась в разные сроки: через 1 неделю после операции она составляла всего $0,9 \pm 0,1\%$ от пло-

щади цифрового изображения препарата; через 3 недели она заметно увеличивалась, по сравнению с первым сроком ($p < 0,05$), и составляла $3,7 \pm 0,2\%$. Через 8 недель она равнялась $6,9 \pm 0,2\%$ ($p < 0,05$, по сравнению с предыдущим сроком). Отмечается динамика увеличения регенерирующих нервных волокон нерва, однако и через 8 недель площадь, занимаемая тубулин-содержащими структурами, ниже, чем в интактном нерве ($p < 0,05$).

Полученные результаты, касающиеся динамики увеличения регенерирующих нервных волокон после передавливания седалищного нерва крыс согласуются с результатами работ других авторов, выполненных с помощью нейрогистологических методов и ЭМ и дополняют их [3, 4].

Таким образом, в настоящей работе описана динамика увеличения нервных волокон в регенерирующем нерве крысы после его передавливания (наложения лигатуры) с помощью применения иммуногистохимического выявления аксонального маркера бета-тубулин III. Установлено, что в период с 1 до 8 недель после передавливания площадь нервного ствола, содержащая бета-тубулин III-иммунопозитивные волокна, возрастает в несколько раз, но не достигает уровня интактного нерва. Отработанная модель оценки регенерации периферического нерва крысы будет использована в дальнейшей работе для оценки восстановления волокон поврежденного нерва при экспериментальной разработке клеточной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э., Петрова Е. С., Кирик О. В., Безнин Г. В., Сухорукова Е. Г. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2010. — Т. 5, № 3. — С. 57–63.
2. Коржевский Д.Э., Кирик О. В., Петрова Е. С., Карпенко М. Н., Григорьев И. П., Сухорукова Е. Г., Колос Е. А., Гиляров А. В. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии /руководство / под ред Д. Э. Коржевского. — СПб.: СпецЛит, 2014. (2-е издание, исправленное и дополненное). — С. 119.
3. Мирошникова М.Е., Чумасов Е. И. Регенерация седалищного нерва крысы после его различных экспериментальных повреждений // Архив анат., гистол. и эмбриол. — 1988. — Т. 95, № 10. — С. 30–35.
4. Ноздрачев А.Д., Чумасов Е. И. Периферическая нервная система. — СПб.: Наука, 1999. — 281с.
5. Петрова Е. С. Изучение регенерации седалищного нерва крысы после наложения лигатуры (иммуногистохимическое исследование) // В сборнике: Материалы XXIII съезда Физиологического общества имени И. П. Павлова — 2017. — С. 729–731.
6. Петрова Е.С., Павлова Н. В., Коржевский Д. Э. Современные морфологические подходы к изучению регенерации периферических нервных проводников // Мед. акад. журнал. — 2012. — Т. 12, № 3. — С. 15–29.
7. Петрова Е. С. Восстановление поврежденного нерва с помощью клеточной терапии (фундаментальные аспекты) // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2015. Т. 7. № 3 (26). С. 42–53.
8. Чельшев Ю. А. Регенерация в нервной системе / Руководство по гистологии / Под ред. Данилова Р. К. — СПб.: СпецЛит, 2011. — С. 656–665.
9. Щаницын И. Н., Иванов А. Н., Бажанов С. П., Нинель В. Г., Пучиньян Д. М., Норкин И. А. Стимуляция регенерации периферического нерва: современное состояние, проблемы и перспективы // Успехи физиологических наук. — 2017. — Т. 48, № 3. — С. 92–111.
10. Fairbairn N.G., Meppelink A. M., Ng-Glazier J. et al. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion // World J. Stem Cells. — 2015. — Vol.7, № 1. — P. 11–26.
11. Liu L., Geisert E. E., Frankfurter A., Spano A. J., Jiang C. X., Yue J., Dragatsis I., Goldowitz D. A transgenic mouse class-III beta tubulin reporter using yellow fluorescent protein // Genesis. 2007. V.45, № 9. P. 560–569.
12. Katsetos C.D., Herman M. M., Mörk S. J. Class III beta-tubulin in human development and cancer // Cell Motil. Cytoskeleton. — 2003. — V.55, № 2. — P. 77–96.
13. Sinicropi D.V., McLwain D. L. Changes in the amounts of cytoskeletal proteins within the perikarya and axons of regenerating frog motoneurons // J. Cell Biol. — 1983. — V. 96, № 1. — P. 240–247.

© Петрова Елена Сергеевна, Колос Елена Андреевна (iemmorphol@yandex.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»