

УДК 612.44.018:616.893-053.8-092.9

Показатели функционального восстановления при повреждении седалищного нерва крыс в условиях метаболических нарушений

В.А. Чавушян, Л.Г. Аветисян, К.В. Симонян

*Институт физиологии им. Л.А.Орбели НАН РА,
лаборатория нейроэндокринных взаимоотношений
0028, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22*

Ключевые слова: фруктоза, сдавливание седалищного нерва, мотонейроны спинного мозга

Чрезмерное потребление фруктозы вызывает метаболический синдром, ассоциируемый с изменениями функционирования центральной и периферической нервных систем. Гипергликемия, инсулиновая резистентность и липидемия – неотъемлемые компоненты диабета и важные факторы риска периферических нейропатий [1, 13]. Современные изучения подтверждают роль инсулина и расстройства его метаболизма в развитии патологий периферического нерва [1], а также большую степень вредоносного воздействия диабета первого и второго типа на периферическую нервную систему по сравнению с центральной нервной системой [1, 6].

Метаболизм глюкозы через сорбитный путь сильно ассоциирован с шванновской клеткой [5], хотя не совсем ясно, являются ли метаболиты причиной физиологической дисфункции, или служат исключительно в качестве индекса биохимического повреждения. Аккумуляция в нерве продуктов сорбитного пути вызывает дисфункцию шванновских клеток в виде сегментарной демиелинизации, что в свою очередь приводит к повышенной «уязвимости» к травматическому повреждению [12].

С целью изучения функционального восстановления после сдавливания седалищного нерва крыс в условиях метаболических нарушений, вызванных чрезмерным потреблением фруктозы, в данной работе исследованы показатели рефлекса отведения поврежденной конечности и синаптической активности мотонейронов спинного мозга при высокочастотной стимуляции (ВЧС) дистального участка поврежденного нерва.

Материал и методы

Эксперименты проведены в двух группах: в первой группе (фруктоза+сдавливание) у белых половозрелых крыс-самцов (5 животных массой 230-250г) вызывали метаболический синдром путем применения с питьевой водой 50% диетической фруктозы в течение шести недель и после этого проводили сдавливание седалищного нерва. Животные продолжали получать фруктозу в течение 28 постоперационных дней; во второй группе (сдавливание) проводили сдавливание седалищного нерва у интактных животных (n=5).

Сдавливание левостороннего седалищного нерва в верхней трети бедра (на 4 мм выше трифуркации) производили под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, в/б) кровоостанавливающим незазубренным зажимом в положении первого зубца в течение 30 сек [2], с последующим наложением швов на мышечные / кожные ткани и подкожным введением бициллина 3.

Спустя 1 - 28 дней после сдавливания седалищного нерва в группе фруктоза+сдавливание проведен анализ динамики восстановления чувствительной функции, основанный на показателях теста рефлекса отведения (ТРО), который проводили путем раздражения постоянным током наружной стороны подошвы задних лап биполярным электродом, состоящим из 2 медных проволок диаметром 1мм с межэлектродным расстоянием 2 мм [3]. Цифровым показателем данного теста служила пороговая величина силы тока (мА), вызвавшая рефлекс отведения на поврежденной и здоровой конечностях. Все числовые значения (величины) представлены как усредненные значения $\pm$ SEM по t-критерию Стьюдента для 5 животных. Различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Спустя 28 дней под уретановой анестезией (1,1 г/кг, в/б) животных фиксировали в стереотаксическом аппарате, ультразвуковым ножом проводили перерезку спинного мозга на уровне T2, вводили миорелаксант (1% дитилин, 25 мг/кг, в/б) и переводили на искусственное дыхание. Далее производили дорсальную ламинэктомию пояснично-крестцового отдела спинного мозга, а также отпрепаровывали дистальный участок сдавленного седалищного нерва. Для экстраклеточной регистрации спайковой активности мотонейронов стеклянный микроэлектрод с диаметром кончика 1 мкм, заполненный 2 М раствором KCl, многократно погружали по стереотаксическим координатам ($L \pm 0,7-1,6$ мм, $V +1,7-1,85$ мм) [7] в передние рога серого вещества поясничных сегментов спинного мозга (L4-L5 ипсилатеральной стороны по отношению к поврежденному нерву). ВЧС (100 Гц в течение 1 сек) дистального участка поврежденного седалищного нерва осуществляли биполярными серебряными электродами путем применения толчков прямоугольного постоянного электрического тока с длительностью 0,05 мсек и амплитудой 0,10 - 0,14 мА. Импульсный поток

мотонейронов, после селекции посредством амплитудного дискриминатора, подвергался программному анализу с последующим выводом распределенного в реальном времени пре- и постстимульного спайкинга активности единичных нейронов и построением на их основе гистограмм средних частот с данными многоуровневой статистической обработки дифференцированно для пре- и постстимульного времени, включая период ВЧС (разработчик В.С. Каменецкий). Для избираемых сравниваемых групп нейрональной спайковой активности программно строили усредненные перистимульные временные гистограммы. Целью анализа являлось определение статистической достоверности различий в длительности межспайковых интервалов до и после действия ВЧС. Для дальнейшей оценки отбирали лишь нейрональные единицы, спайковый поток которых имеет уровни значимости не более 0,05. Экспериментальные данные получены в целом на 10 крысах. В мотонейронах спинного мозга зарегистрировано 510 мотонейронов в группе сдавливание, 282 мотонейрона – в группе фруктоза+сдавливание.

Результаты и обсуждение

Согласно показателям ТРО группы фруктоза+сдавливание, спустя день после повреждения седалищного нерва чувствительность к электрическому току, приложенному к коже подошвы, значительно понижается на поврежденной конечности (величина ТРО $98,0 \pm 4,6$ мА; $P=0,17$, unpaired t test) по сравнению с теми же показателями здоровой конечности (величина ТРО $50,0 \pm 1,6$ мА; $P=0,33$). К 28-му дню сдавливания нерва разница этих же показателей на здоровой и поврежденной конечности значительно уменьшается ($56,0 \pm 1,0$ мА; $P<0,05$ на здоровой и $63,5 \pm 2,2$ мА; $P=0,75$ на поврежденной) (рис. 1). Таким образом, исследование динамики показателей ТРО здоровой и поврежденной конечности после одностороннего сдавливания седалищного нерва в группе фруктоза+сдавливание выявило некоторое восстановление чувствительной функции поврежденной конечности к 28-му дню сдавливания нерва. Электрофизиологическое исследование активности мотонейронов спинного мозга, вызванной на стимуляцию дистального участка поврежденного седалищного нерва, последующий анализ импульсного потока единичных нейронов выявили формирование различных комбинаций ответов в виде учащения импульсного потока – тетанической потенциации (ТП) и посттетанической потенциации (ПТП), а также урежения импульсного потока – тетанической депрессии (ТД) и посттетанической депрессии (ПТД). Зарегистрированы также смешанные комбинации ответов – ТП-ПТД и ТД-ПТП. Выраженность компонентов ответов оценивалась согласно значениям среднего уровня спайковой активности (число спайков) на данном отрезке перистимульной гистограммы: в группе фруктоза+сдавливание в нейронах с

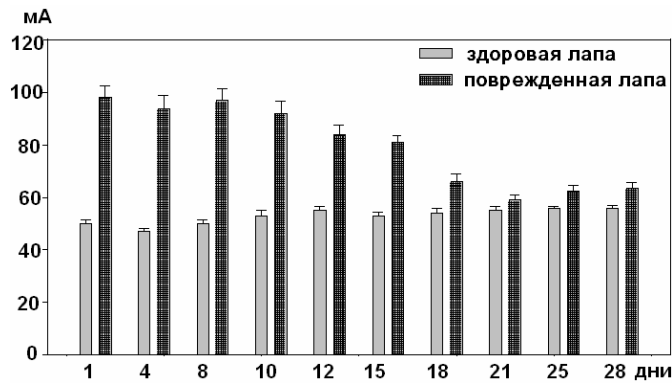


Рис. 1. Усредненные показатели величин тока (мА), вызывающих рефлекс отведения здоровой и поврежденной лап задних конечностей при электрической стимуляции кожи подошвы в динамике от 1 до 28 дней после одностороннего сдавливания седалищного нерва в группе фруктоза+сдавливание

ТП-ПТП и ТП-ПТД ответами количество спайков на время ВЧС меньше по сравнению с таковыми в группе сдавливание (рис. 2).

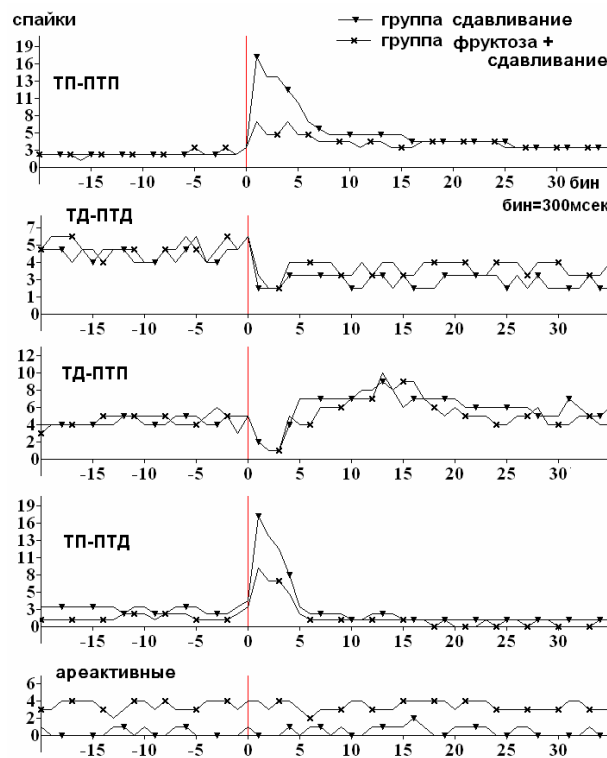


Рис. 2. Усредненные перистимульные временные гистограммы для популяций мотонейронов, проявляющих ТП-ПТП, ТД-ПТД, ТД-ПТП, ТП-ПТД ответы, и ареактивных единиц в группах сдавливание и фруктоза+сдавливание

В нейронах с ТД-ПТД и ТД-ПТП ответами средний уровень спайковой активности практически идентичен на протяжении всей регистрации, а ареактивные мотонейроны группы фруктоза+сдавливание проявляют значительно высокий уровень спайковой активности (рис.2). Программный анализ перистимульной активности для популяции нейронов, проявляющих данный тип ответов на ВЧС нерва, дает возможность оценки цифровых показателей средней частоты престимульного, постстимульного спайкового потока и такового на время тетанизации или ВЧС, которые приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Цифровые показатели средней частоты престимульного, постстимульного спайкового потока и такового на время ВЧС, а также долевое соотношение для указанных типов ответов в группе сдавливание

Типы ответов	Средняя частота престимульного спайкового потока (имп/сек)	Средняя частота спайкового потока на время ВЧС (имп/сек)	Средняя частота постстимульного спайкового потока (имп/сек)	Процентная доля из всех зарегистрированных нейронов
Ареактивные	2,58	2,33	2,79	0,59 % (3 из 510)
ТД-ПТД	16,59	7,98	10,30	16,67 % (85 из 510)
ТД-ПТП	15,22	6,03	21,02	7,65 % (39 из 510)
ТП-ПТД	9,83	48,83	5,86	27,25 % (139 из 510)
ТП-ПТП	7,03	51,28	12,93	43,9 % (224 из 510)

Таблица 2

Цифровые показатели средней частоты престимульного, постстимульного спайкового потока и такового на время ВЧС, а также долевое соотношение для указанных типов ответов в группе фруктоза+сдавливание

Типы ответов	Средняя частота престимульного спайкового потока (имп/сек)	Средняя частота спайкового потока на время ВЧС (имп/сек)	Средняя частота постстимульного спайкового потока (имп/сек)	Процентная доля из всех зарегистрированных нейронов
Ареактивные	12,92	13,41	12,89	6,02 % (17 из 282)
ТД	10,42	6,67	10,16	1,1 % (3 из 282)
ТП	-	-	-	
ПТД	12,34	12,89	9,69	9,6 % (27 из 282)
ПТП	14,68	14,58	21,15	9,6 % (26 из 282)
ТД-ПТД	18,85	9,00	13,52	15,96 % (45 из 282)
ТД-ПТП	14,31	6,64	18,46	12,8 % (36 из 282)
ТП-ПТД	7,10	26,21	4,02	15,24 % (43 из 282)
ТП-ПТП	8,14	21,80	12,09	30,14 % (85 из 282)

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что сдавливание седалищного нерва на фоне метаболического синдрома характеризуется аномальной синаптической активностью мотонейронов спинного мозга и нарушением баланса возбуждающих/тормозных вызванных ответов. Анализ перистимульных гистограмм спайковой активности для мотонейронов в сравниваемых экспериментальных группах сдавливание и фруктоза+сдавливание позволил заключить:

- в мотонейронах, проявляющих возбуждающие ответы на высокочастотную стимуляцию дистального участка поврежденного седалищного нерва в группах сдавливание (табл. 1) и фруктоза+сдавливание (табл. 2), зарегистрированы идентичный престоимый (7,03 и 8,14 спайк/сек) и постстимульный (12,93 и 12,09 спайк/сек) уровни средней частоты спайковой активности, а также значительно более выраженная ТП в группе сдавливание (51,28 спайк/сек) по сравнению с группой фруктоза+сдавливание (21,80 спайк/сек). Доля популяции таких нейронов доминирует как в группе сдавливание (43,9%), так и в группе фруктоза+сдавливание (30,14%);
- в группах сдавливание и фруктоза+сдавливание практически идентичные уровни активности (престоимой, постстимульной и на время ВЧС) зарегистрированы для мотонейронов, проявляющих ТД-ПТД и ТД-ПТП. Доля нейронов с ответами в виде ТД-ПТД составляла 16,67% и 15,96%, а в виде ТД-ПТП – 7,65% и 12,8%, в соответствующих группах;
- в нейронах, проявляющих ТП-ПТД ответы, зарегистрированные на время ВЧС ТП в группах сдавливание и фруктоза+сдавливание, соответственно составляют 48,83 и 26,21 спайк/сек. Пре- и постстимульный уровень спайковой активности этих нейронов выше в группе сдавливание. Долевое соотношение этих мотонейронов составляет 27,25% в группе сдавливание и 15,24% в группе фруктоза+сдавливание. В группе фруктоза+сдавливание выявлены мотонейроны, проявляющие лишь слабо выраженную ПТП (9,6 %) и ПТД (9,6 %), а также ареактивные единицы (6,0%).

В целом, по-видимому, увеличение доли мотонейронов с ПТП и ПТД ответами и ареактивных единиц в группе фруктоза+сдавливание служит показателем неполноценности нейрональной цепи рефлекторной дуги спинного мозга (с вовлечением мотонейронов и интернейронов) в условиях дегенерации. Таким образом, экстраклеточной регистрацией спайковой вызванной активности единичных нейронов выявлены электрофизиологические показатели аномальной активности, характеризующиеся наличием ареактивных единиц и слабой выраженностью компонентов ответов на время ВЧС, а также дисбалансом типов ответов в виде отно-

сительно равномерного соотношения тормозных / возбудительных ответов при стимуляции дистального участка поврежденного седалищного нерва.

Таким образом, выявлены значительное повышение порога чувствительности поврежденной конечности (1-18 дни) и тенденция выравнивания чувствительности здоровой и поврежденной конечности (21-28 дни) при электрическом раздражении подошвы задней конечности после сдавливания седалищного нерва у крыс с фруктозой индуцированным метаболическим синдромом. Спустя 28 дней после сдавливания седалищного нерва у крыс с фруктозой индуцированным метаболическим синдромом в мотонейронах люмбарного отдела спинного мозга зарегистрирована аномальная синаптическая активность, характеризующаяся нарушением выраженности и баланса возбудительных/тормозных ответов, вызванных на высокочастотную стимуляцию дистального отдела поврежденного седалищного нерва.

При дегенерации аксона расстройства аксонального транспорта трофогенов и веществ, необходимых для образования и выделения медиаторов нервным окончанием, обуславливают развитие дистрофических изменений нейронов и иннервируемых тканей и нарушение синаптических процессов. С другой стороны, в спинном мозге и периферическом нерве крыс со стрептозоциновым диабетом найдены некоторые артефакты сорбитного метаболического пути глюкозы [12] и показано, что периферический нерв обладает лимитированной емкостью фруктозы [9]. Развитие метаболических дисфункций регулируется многочисленными факторами, среди которых, согласно современным изучением, центральная роль отводится повышению оксидативного повреждения и снижению оксидативной защиты [10]. Интенсивное потребление фруктозы повышает маркеры оксидативного стресса [8] и, в частности, в передних рогах серого вещества спинного мозга [11]. Вероятно, именно указанные патологические изменения в спинномозговых нейронах задерживают восстановительные процессы.

Иннервацию основной части задних конечностей обеспечивает седалищный нерв. После повреждения как моторные, так и сенсорные аксоны седалищного нерва способны регенерировать и подключаться к специфическим мишеням. Иными словами, имеет место функциональное восстановление. Важно признать, что даже при самой благоприятной среде может произойти аномальное восстановление дистальной культы. Перестановка сенсорных и моторных компонентов в нерве со смешанной функцией является всеобщим последствием травмы. Конечной причиной двигательных нарушений при травматическом повреждении выступает дегенерация нейронов [4] и потеря синапсов [14], а конечным результатом могут быть нефункциональные аксональные единицы, которые и определяют увеличение доли зарегистрированных нами ареактивных мотоней-

ронов спинного мозга, а также возможность снижения степени выраженности ответов на ВЧС дистального участка поврежденного седалищного нерва спустя 28 дней после сдавливания.

Поступила 29.01.15

Մետաբոլիկ խանգարումների պայմաններում առնետների վնասված նստանյարդի ֆունկցիոնալ վերականգնման ցուցանիշները

Վ. Ա. Չավուշյան, Լ. Գ. Ավետիսյան, Կ. Վ. Միմոնյան

Ֆրոկտոզի չափից ավելի գործածումը առաջացնում է նյութափոխանակային համախտանիշ, որը կապված է կենտրոնական և ծայրամասային նյարդային համակարգերի գործառույթային փոփոխությունների հետ: Գերշաքարայնությունը, ինսուլինային կայունությունը և լիպիդեմիան շաքարախտի անբաժանելի մասն են և հանդիսանում են ծայրամասային նեյրոպաթիաների ռիսկի կարևոր գործոնները: Ֆրոկտոզի միջոցով նյութափոխանակային համախտանիշ առաջացրած առնետների մոդելի վրա իրականացվել է էլեկտրաֆիզիոլոգիական հետազոտություն՝ ուսումնասիրելով ողնուղեղի իպսիլատերալ գոտկային բաժնի մոտոնեյրոնների սինապտիկ ակտիվությունը նստանյարդի ճզմում-վնասումից քսանութ օր անց: Հայտնաբերվել են անոմալ ակտիվության ցուցանիշներ, որոնք բնութագրվում են անոռեակտիվության միավորների առկայությամբ և բարձր հաճախականությամբ խթանման ժամանակ պատասխանների թույլ արտահայտմամբ, ինչպես նաև պատասխանների տեսակի անհավասարակշռությամբ. արգելակիչ/դրդիչ պատասխանների համեմատաբար հավասարաչափ հարաբերակցության տեսքով վնասված նստանյարդի դիստալ բաժնի խթանման ժամանակ: Ֆրոկտոզի միջոցով նյութափոխանակային համախտանիշ առաջացրած առնետների հեռացման ռեֆլեքսի թեստի ցուցանիշները հետին վերջույթի ներքանի էլեկտրական խթանման ժամանակ ցույց են տալիս վնասված վերջույթի զգայունության շեմի զգալի բարձրացում (1-18 օր նստանյարդի ճզմումից հետո) և առողջ ու վնասված վերջույթների զգայունության հավասարեցման միտում (21-28 օր նստանյարդի ճզմումից հետո):

Indices of functional recovery of rat's damaged sciatic nerve in metabolic disorder condition

V.A. Chavushyan, L.G. Avetisyan, K.V. Simonyan

Excess fructose consumption causes metabolic syndrome associated with changes in function of the central and peripheral nervous systems. Hyperglycemia, insulin resistance and hyperlipidemia are integral components of diabetes and important risk factors for development of peripheral neuropathies. In this study in rat model of fructose-induced metabolic syndrome 30 days after sciatic nerve crush injury an electrophysiological study of evoked synaptic activity of ipsilateral single motoneurons of lumbar part of the spinal cord was carried out. Parameters of abnormal activity have been found by the presence of areactive units and weak expression of components of responses to high-frequency stimulation, as well as by disbalance of types of responses in the form of relatively even ratio of inhibitory/excitatory responses during stimulation of distal part of the damaged sciatic nerve. Test reflex abduction indices revealed a significant increase in sensitivity threshold of injured lower extremities (1-18 days) and a tendency to sensitivity equalization of healthy and injured lower extremities (21-28 days) in rats with fructose-induced metabolic syndrome under electrical stimulation of the sole of posterior lower extremities after sciatic nerve crush.

Литература

1. *Anderson N.J., King M.R., Delbruck L., Jolivald C.G.* Role of insulin signaling impairment, adiponectin and dyslipidemia in peripheral and central neuropathy in mice. *Dis. Model Mech.*, 2014, 7(6):625-33.
2. *Bridge P.M., Ball D.J., Mackinnon S.E. et al.* Nerve crush injuries – a model for axonotmesis. *Exp. Neurol.*, 1994, vol. 127, 2, p.284-290.
3. *Dijkstra J.* Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J. Neurosci. Methods*, 2000, vol. 96, p. 89-96.
4. *Farooqui A. A.* Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases. Springer, New York, 2010
5. *Gabbay K. H., O'Sullivan J. B.* The sorbitol pathway: Enzyme localization and content in normal and diabetic nerve and cord. *Diabetes*, 1968, 17:239.
6. *Lee-Kubli C., Mixcoatl-Zecuatl T., Jolivald C. G., Calcutt N. A.* Animal models of diabetes-induced neuropathic pain. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (ed. Geyer M., Ellenbroek B., Marsden C.). Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag; 2014.
7. *Paxinos G., Watson Ch.* The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th Edition. New York: Academic Press, 2005.
8. *Román C. L., Flores L. E., Maiztegui B., Raschia M. A., Zotto H. D., Gagliardino J. J.* Islet NADPH oxidase activity modulates β -cell mass and endocrine function in rats with fructose-induced oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2014, vol. 1840, 12, p. 3475-3482.

9. *Stewart M. A., Passonneau J. V.* Identification of fructose in mammalian nerve. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 17:536.
10. *Styskal J., Van Remmen H., Richardson A., Salmon A.B.* Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic. Biol. Med.*, 2012, 1;52(1), p. 46-58.
11. *Takamiya R., Takahashi M., Myint T., Park Y.S. et al.* Glycation proceeds faster in mutated Cu, Zn-superoxide dismutases related to familial amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB*, May 2003, vol. 17, p. 938-943.
12. *Ward J.D., Baker R.W. R., Davis B.H.* Effect of Blood Sugar Control on the Accumulation of Sorbitol and Fructose in Nervous Tissues. *Diabetes*, December 1972, 21:1173-78.
13. *Wiggin T.D., Sullivan K.A., Pop-Busui R., Amato A., Sima A.A., Feldman E.L.* Elevated triglycerides correlate with progression of diabetic neuropathy. *Diabetes*, 2009 Jul; 58(7):1634-40.
14. *Wishart T.M., Parson S.H., Gillingwater T.H.* Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2006, vol. 65, p. 733-739.