

ОКОНЧАНИЕ ДОРСАЛЬНОКОРЕШКОВЫХ АФФЕРЕНТНЫХ ВОЛОКОН В СПИННОМ МОЗГЕ ЧЕРЕПАХИ *TESTUDO HORSFIELDI* И ТРЕХМЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ СЕНСОМОТОНЕЙРОННОЙ СВЯЗИ

© Н. М. Чмыхова,¹ О. А. Карамян,¹ В. М. Кожанов,¹ Н. П. Веселкин,¹ Х. П. Клеманн²

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова, РАН, Санкт-Петербург, Россия,
² Институт физиологии, Университет, Берн, Швейцария;

¹ электронный адрес: nchmykhova@mail.ru

Структурную организацию сенсомотонейронной связи черепахи исследовали с помощью маркирования пероксидазой хрена (ПХ) дорсальнокорешковых афферентных волокон и спинальных мотонейронов и последующей ее компьютерной 3-мерной реконструкции. ПХ апплицировали на филаменты дорсальных и вентральных корешков суперфузируемого препарата спинного мозга черепах *Testudo horsfieldi*. Инъекцию ПХ в мотонейроны осуществляли с помощью внутриклеточных микроэлектродов. Меченые элементы прослеживали под световым микроскопом. Получена новая схема распределения окончаний дорсальнокорешковых волокон с дополнительными зонами их ветвления: ипсилатерально — в зоне Лиссауера, моторном ядре и в вентролатеральной части белого вещества; контралатерально — в IV и V пластинках серого вещества. Выявлено, что эллипсоидное дендритное поле поясничных мотонейронов черепах имеет меньшую, чем у лягушки, rostrocaudальную протяженность (300—500 мкм). Ветвления дорсальнокорешковых афферентных коллатералей, направленных в моторные ядра, простираются на 50—70 мкм rostrocaudально и имеют в среднем около 80 утолщений, синаптоподобных структур (почти в 10 раз меньше, чем у лягушки). Возможные контакты дорсальнокорешкового волокна с мотонейроном устанавливались одной коллатералью на сегментах I—VII порядков ветвления дорсального и вентромедиального дендритов. Число контактов — около 4, что также на порядок меньше, чем у лягушки. Упрощение сенсомоторной связи у черепах, вероятно, компенсируется изменением функциональных характеристик сенсомотонейронного соединения рептилий по сравнению с таковыми у амфибий, изменением, выражающимся в значительном увеличении эффективности передачи сигналов, сходной с таковой у млекопитающих.

Ключевые слова: спинальные мотонейроны, дорсальнокорешковые афферентные волокна, пероксидаза хрена, сенсомотонейронная связь, 3-мерная реконструкция, черепаха.

Распределение волокон дорсального корешка и посылаемых ими сигналов в поясничных сегментах спинного мозга рептилий изучали с помощью различных гистологических и электрофизиологических методов (Ten Donkelaar, 1997). Показано, что коллатерали афферентных волокон в спинном мозге черепах *Pseudemys scripta elegans* не только не ветвятся в моторных ядрах, но и не достигают их (Ruigrok et al., 1985a), а контакты дорсальнокорешковых афферентных волокон с мотонейронами возможны в интермедиальной области серого вещества (Ruigrok et al., 1985b). Результаты электрофизиологических исследований показали наличие моносинаптической связи дорсальнокорешковых афферентов с поясничными мотонейронами черепах (Батуева, 1972; Rosenberg, 1972; Yamashita, 1986). Однако детальных исследований, сочетающих морфологический и электрофизиологический анализ, на черепахах не проводили. Связь между структурой и функцией при передаче информации в спинальном моносинаптическом рефлексе позвоночных анализировали по результатам, полученным на кошке и лягушке; авторы, анализируя факторы, определяющие амплитуду и вероятность постсинаптических ответов, указывали на недостаточность имеющихся данных о структуре сенсо-

мотонейронного соединения (см. обзор: Luescher, Clamann, 1992).

Удобство работы на изолированном спинном мозге черепах позволило нам в настоящей работе параллельно с функциональным исследованием сенсомотонейронной связи черепахи, т. е. анализом постсинаптических процессов, происходящих на соматодендритной мембране мотонейронов (Кожанов и др., 2004), провести структурное исследование дорсальнокорешкового афферентного входа на поясничные мотонейроны черепахи *Testudo horsfieldi*, включающее трехмерную реконструкцию пре- и постсинаптических элементов связи. Полученные в работе данные необходимы для анализа эффективности передачи сигналов в сенсомотонейронном синапсе позвоночных, а также для дальнейших структурных и функциональных исследований ее в различных экспериментальных условиях.

Материал и методика

Эксперименты проводили на изолированном спинном мозге 20 степных черепах *Testudo horsfieldi* массой 150—250 г. Животных наркотизировали нембуталом

(50 мг/кг, интраперитонеально). Поясничный отдел позвоночника иссекали и помещали в специальную камеру с охлажденным до 4—6 °С физиологическим раствором, где после ламинэктомии из позвоночного канала извлекали поясничный отдел спинного мозга с вентральными и дорсальными корешками. В большинстве опытов брали поясничное утолщение целиком либо его делили посегментно на поперечные срезы толщиной 2—3 мм (сегменты D8—D10, S1) и использовали последовательно. Нормальный физиологический раствор для суперфузии спинного мозга, имеющий следующий состав (в мМ/л): NaCl — 120, KCl — 5, NaHCO₃ — 15, MgCl₂ — 2, CaCl₂ — 3, глюкоза — 10 (Hounsgaard et al., 1988), постоянно аэрировали карбогеном — смесью O₂ (98 %) и CO₂ (2 %). Температура раствора составляла 22—25 °С, pH 7.3—7.6.

Для одновременной стимуляции и маркирования пероксидазой хрена (ПХ) мотонейронов и волокон дорсального корешка тонкие филламенты вентрального и дорсального корешков помещали в микропипетки всасывающих электродов, заполненные физиологическим раствором, содержащим 15—20 % ПХ (Sigma, Type VI, США, или Boehringer, Германия). Внутренний диаметр кончика пипеток составлял от 30 до 100 мкм. Отдельные мотонейроны идентифицировали по антидромному потенциалу действия в ответ на раздражение вентрального корешка. Внутриклеточные отведения потенциалов от мотонейронов осуществляли с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 3 М KCl или 7—10%-ным раствором ПХ в 0.5 М KCl с сопротивлением от 20 до 60 МОм. Для внутриклеточного маркирования мотонейронов через микроэлектрод подавали деполяризующие толчки тока силой 3—10 нА, длительностью 60 мс, с частотой 9—10 Гц в течение 5—20 мин. Активность мотонейронов и их ответы на раздражение дорсальнокорешковых филламентов наблюдали на экране осциллографа и регистрировали на компьютере с помощью АЦП по специально созданной программе (Кожанов и др., 2001).

Гистологические процедуры фиксации препаратов и выявления ПХ осуществляли согласно методам Адамса (Adams, 1977) и Ито с сотрудниками (Itoh et al., 1979). Выявление ПХ выполняли на серийных замороженных срезах мозга толщиной 60 мкм. После проведения гистохимических процедур срезы монтировали на предметные стекла, окрашивали тионином и заключали в балзам.

Светооптическое исследование серийных срезов осуществляли под микроскопом Ergaval (Carl Zeiss, Jena, Германия), оснащенным отечественным рисовальным аппаратом РА-6. 3-мерную реконструкцию мотонейронов и дорсальнокорешковых афферентных волокон по серийным гистологическим срезам выполняли на компьютерной установке Eutectic NTS (Neuron Tracing System, США). Трассирование клеток и волокон выполняли, используя иммерсионный объектив 100×. Морфометрический анализ 3-мерных реконструкций нейронов и их ветвлений проводили по программам NEURON 4 и NEURON 5. При 3-мерной реконструкции нейронов вводили поправку на толщину среза: значения величин по Z-оси увеличивали до значения, устанавливаемого на микротоме при резке мозга. Поправку, учитывающую сжатие (в %) ткани после проведенных гистохимических процедур, в измерении не вводили.

Результаты

В 36 экспериментах на 20 препаратах поясничного утолщения спинного мозга черепах *Testudo horsfieldi* выделяли филламенты дорсального и вентрального корешков для проведения 3 вариантов опытов: I — для аппликации ПХ на филламенты с целью получения общей картины распределения ветвящихся волокон и дендритов мотонейронов в нейропиле мозга; II — для одновременной аппликации ПХ и стимуляции волокон филламентов дорсального корешка с целью вызова в отдельных мотонейронах, идентифицированных по антидромному потенциалу действия, постсинаптических ответов; III — для последующего ионофореза ПХ в регистрируемый мотонейрон.

Ход и ветвления дорсальнокорешковых волокон в дорсальной половине мозга. Вход дорсального корешка с тонким окрашенным филламентом в дорсолатеральную область поверхности мозга показан на рис. 1, а. Дорсальнокорешковые афферентные волокна толщиной от 1 до 6 мкм, вступив в спинной мозг, бифуркировали в дорсальном канатике, посылая более тонкие по сравнению с основным стволом восходящие (ростральные) и нисходящие (каудальные) афферентные ветви. На сагиттальных срезах дорсолатеральной части спинного мозга наблюдались восходящие и нисходящие ветви тонких (около 1 мкм) афферентных волокон. В этой области нейропила, называемой зоной Лиссауера, обнаруживались их короткие коллатерали с тончайшими терминальными ветвлениями (рис. 1, б). Дорсальнее бифуркировали толстые волокна на восходящие (диаметром до 4 мкм) и более тонкие (до 3 мкм) нисходящие ветви (рис. 1, в—д). Некоторые из дорсальнокорешковых волокон, пройдя латеральную и центральную области дорсального канатика, бифуркировали в его медиальной части. Обнаруживались афферентные волокна с двойной бифуркацией: сначала — в центральной области дорсального канатика на восходящую и нисходящую ветви, а затем — в медиальном канатике, где одна из них (восходящая) бифуркировала вновь на восходящую и нисходящую более тонкие ветви.

От восходящих и нисходящих ветвей афферентных волокон с интервалом 100—800 мкм отходили коллатерали первого порядка. Чаще они были одиночными, хотя наблюдались случаи отхождения двух и трех коллатералей от одной точки ветви. Дальнейшее последовательное деление коллатералей первого порядка с различно удаленными точками ветвления приводило к формированию афферентных веточек с терминальными структурами. Пучки афферентных веточек, по-видимому, соответствовали положению проекционных зон коллатералей в дорсальном роге. В I и II пластинках серого вещества терминальные ветвления тонких волокон с мельчайшими (диаметром до 1 мкм) утолщениями образовывали субстанцию в виде мха или войлока, похожую на таковую в зоне Лиссауера (рис. 1, б). Коллатерали более толстых афферентов, ветвящихся и оканчивающихся в III—IV пластинках дорсального рога, объединялись в пучки, напоминающие букеты или веники (рис. 1, д). Они состояли из многократно делящихся и сплетающихся между собой веточек, несущих множество как мелких (менее 1 мкм в диаметре), так и крупных (до 4 мкм в диаметре) утолщений. Часть коллатералей ветвилась вдоль медиального края пластин IV и V. Некоторые из коллатералей направлялись через дорсальную комиссуру на контралатеральную половину мозга (рис. 1, ж, з), где оканчивались в IV

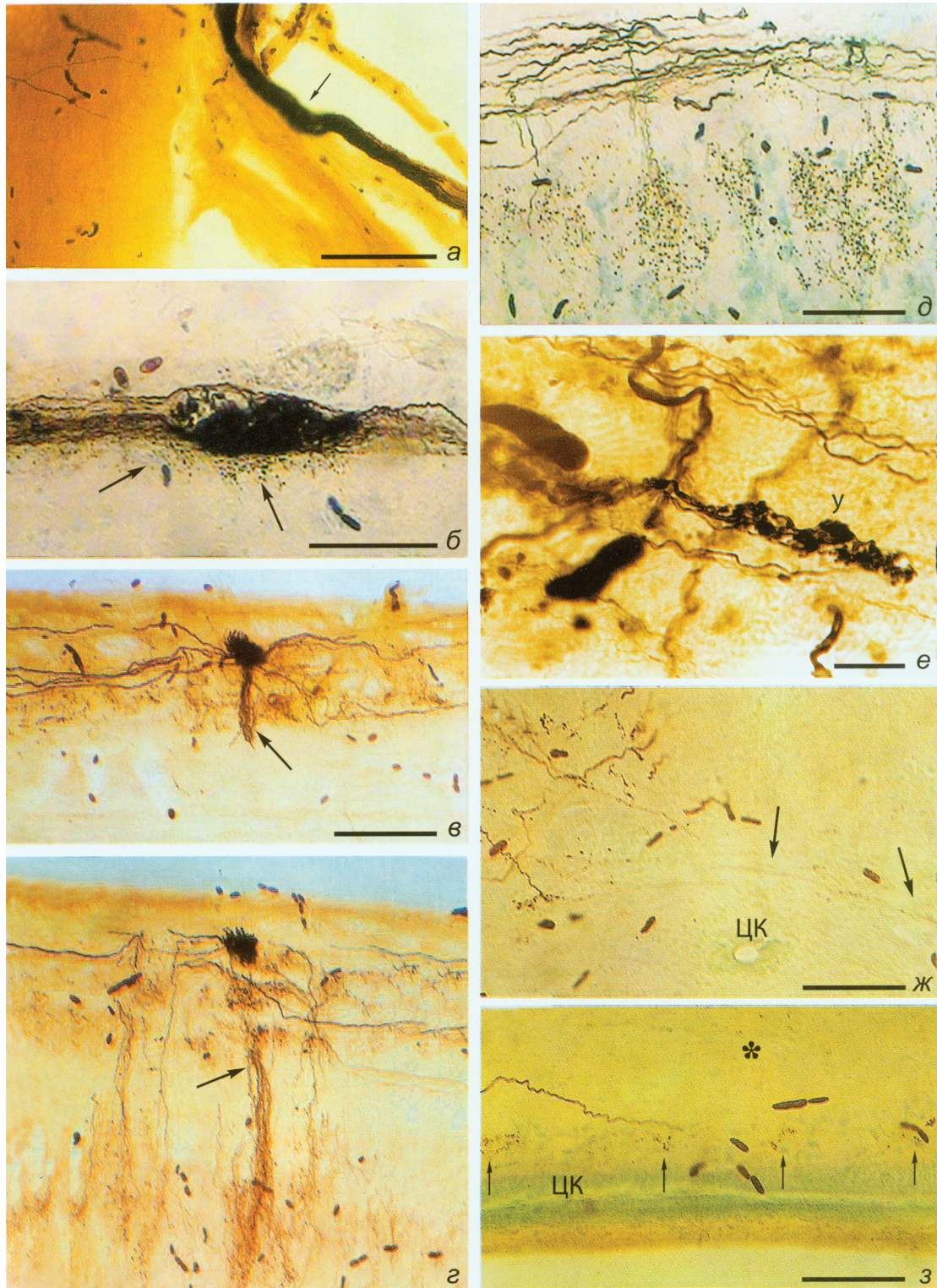


Рис. 1. Участки нейропиля дорсальной половины поясничного утолщения спинного мозга черепахи *Testudo horsfieldi* с афферентными волокнами, окрашенными с помощью аппликации пероксидазы хрена (ПХ) на филламент дорсального корешка.

a — участок сагиттального среза с подходящим к дорсальной поверхности мозга окрашенным дорсальнокорешковым филламентом (стрелка). *б* — сагиттальный срез, представляющий восходящие (влево от входящего пучка волокон) и нисходящие (вправо) ветви после вступления дорсальнокорешковых волокон в спинной мозг и их бифуркаций в зоне Лиссауера; видны терминальные структуры с мельчайшими утолщениями (стрелки). *в, г* — два последовательных сагиттальных среза, представляющие бифуркации толстых дорсальнокорешковых волокон в дорсальном канатике с терминальными ветвлениями в I—III пластинках серого вещества и пучком коллатералей (стрелки), направляющихся к вентральному рогу. *д* — пучки коллатералей дорсальнокорешковых волокон в медиальной области дорсального рога. *е* — сплетающиеся терминальные структуры коллатералей дорсальнокорешковых волокон с крупными утолщениями (Y) в медиальной области основания дорсального рога; фронтальный срез. *ж* — участок нейропиля с дорсальнокорешковыми афферентными волокнами (стрелки), переходящими на контралатеральную половину спинного мозга над центральным каналом (ЦК) через дорсальную комиссуру и оканчивающимися контралатерально в медиальной части IV и V пластин; фронтальный срез. *з* — участок сагиттального среза спинного мозга с направляющимися над центральным каналом (ЦК) на контралатеральную половину спинного мозга терминальными ветвлениями дорсальнокорешковых афферентных волокон (стрелки); звездочка отмечает положение уровня входа в спинной мозг окрашенного дорсальнокорешкового филламента; слева видна восходящая ветвь бифуркирующего в медиальном канатике афферентного волокна. Масштабные отрезки: 100 (*б, д, ж, з*), 200 (*а, в, г*) и 15 (*е*) мкм.

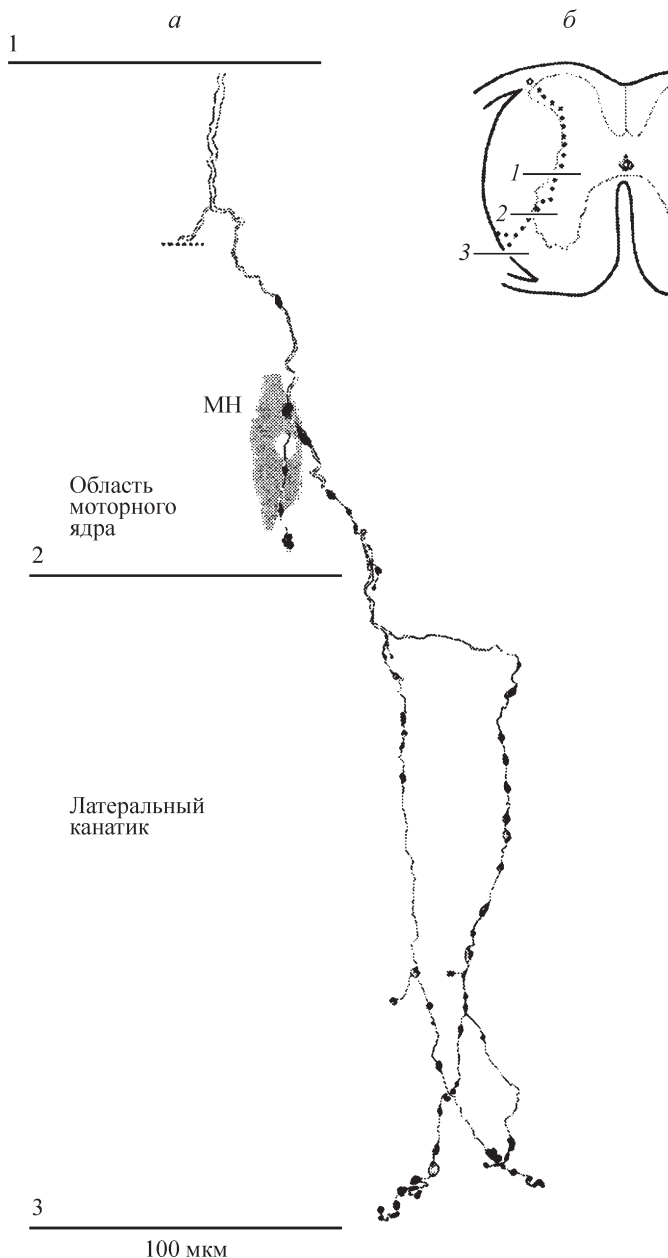


Рис. 2. Графическая реконструкция коллатерали дорсальнокорешкового афферентного волокна, ветвящейся в моторном ядре и латеральном канатике (между линиями 2 и 3) поясничного утолщения спинного мозга черепахи.

a — коллатераль, реконструированная по серийным сагиттальным срезам с использованием иммерсионного объектива 100 \times , имеющая концевые утолщения и по ходу волокна; *МН* — силуэт сомы мотонейрона. *б* — ход реконструированной коллатерали (*a*), представленный на схеме фронтального среза спинного мозга черепахи.

и V пластинках мозга. В медиальной области V и VI пластин ипсилатеральной половины мозга обнаружены сплетения из афферентных веточек коллатералей, пришедших из разных областей дорсального канатика. Они оканчивались в области, соответствующей расположению в спинном мозге млекопитающих нейронов ядра Кларка. Здесь часто наблюдались цепочки из довольно крупных утолщений афферентных волокон (рис. 1, *e*).

Первичные афферентные волокна, посылающие коллатерали в вентральную половину

мозга. В нейропиле поясничного утолщения мозга черепахи на уровне входа дорсального корешка выделялся латеральный пучок толстых коллатералей первого порядка, опускающихся в нейропиле серого вещества вентрального рога (рис. 1, *в*, *з*). В этот пучок объединялись коллатерали 1-го порядка, отходящие близко к точке бифуркации толстых афферентных волокон на восходящие и нисходящие ветви. В областях, удаленных от входа корешка в ростральном и каудальном направлениях, пучки также наблюдались, но со значительно меньшим числом коллатералей в них. Обнаружено, что коллатерали, отходящие от одной точки дорсальнокорешковой афферентной ветви, могут ветвиться в разных пучках, удаленных друг от друга на 200—250 мкм.

Ветвление коллатералей, опускающихся в вентральную половину мозга, становилось обильным в латеральном интермедиальном сером веществе (V и VI пластины). По имеющимся литературным данным, полученным на черепахе *Pseudemys scripta elegans*, такие коллатерали, хотя и не достигают моторных ядер (Ruigrok et al., 1985a), являются аналогами 1а афферентов млекопитающих. Как было показано, основная область их окончаний соответствует области ветвления дорсальных дендритов мотонейронов черепах, а именно интермедиальной области серого вещества. Нами обнаружены терминальные ветвления, достигающие моторных ядер и оканчивающиеся в них (рис. 2, 3). На одном срезе рядом с телами мотонейронов можно было видеть терминальные ветвления разных афферентных волокон, имеющие утолщения, различающиеся по размерам почти вдвое (рис. 3, *a*). Впервые в спинном мозге черепахи выявлены терминальные ветвления афферентов, которые представляли собой волокна с утолщениями, окружающими тела мотонейронов (рис. 3, *в*). Их можно было видеть в центре моторного ядра, а также в его медиальной части.

Были выявлены коллатерали, вступающие в латеральную часть моторного ядра, затем выходящие в латеральный канатик и пронизывающие его вплоть до вентролатеральной поверхности мозга. Реконструкция такой коллатерали представлена на рис. 2. Общее число ее утолщений, концевых и по ходу волокна, составляло 63. Из них только 7 (11 %) располагались в моторном ядре и остальные — в белом веществе латерального канатика.

Трехмерная реконструкция прямой связи афферентных волокон с поясничными мотонейронами. Структуру связей афферентных волокон с поясничными мотонейронами исследовали после одновременной аппликации ПХ на тонкие филаменты дорсального корешка и их стимуляции для вызова постсинаптических ответов в мотонейронах, маркируемых после регистрации с помощью внутриклеточной инъекции ПХ (8 опытов). В половине случаев коротколатентные ответы в мотонейронах не регистрировались.

Компьютерную трехмерную реконструкцию выполнили на 2 мотонейронах, получающих прямые контакты первичных афферентов (рис. 4—6). Анализ реконструкций мотонейрона 1 и мотонейрона 2 показал, что по характеристикам дендритных деревьев поясничные мотонейроны черепахи могут быть отнесены не к изодендритическим, а к идиодендритическим нейронам, так как они обладают разными по занимаемой территории полями индивидуальных дендритов. Так, у мотонейрона 1, имеющего 5 первичных дендритов, общая длина одного дендритного дерева, дорсального, состоящего из 35 сегментов, составляет около 5 мм при суммарной длине ветвлений

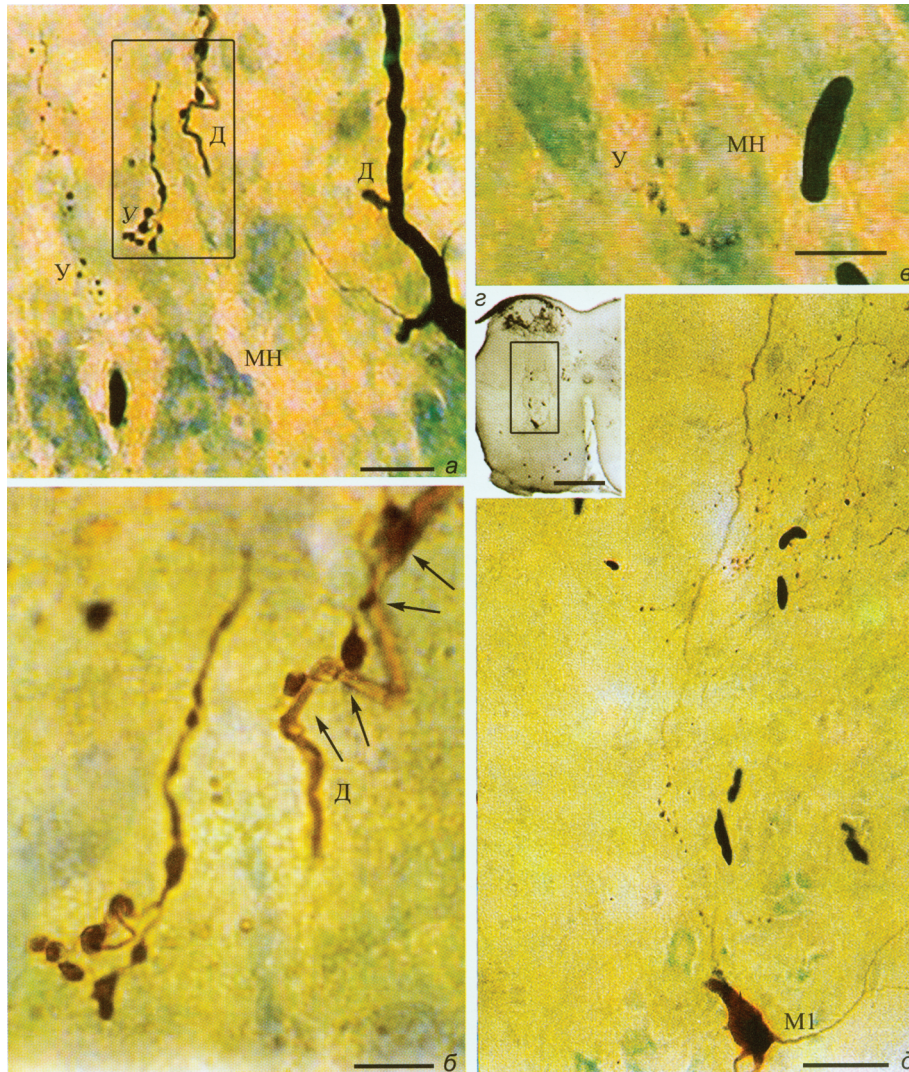


Рис. 3. Ветвления дорсальнокорешковых афферентных коллатералей в моторном ядре спинного мозга черепахи, выявленные с помощью аппликации ПХ на дорсальнокорешковый филамент.

а — область нейропиля с терминальными ветвлениями дорсальнокорешковых волокон, имеющими утолщения (У, синаптоподобные структуры), и дендритом (Д), окрашенного с помощью внутриклеточной инъекции ПХ в мотонейрон, (МН) — мотонейроны, окрашенные тионином по Нисслю. *б* — фрагмент участка, выделенного на фото *а* рамкой, при большем увеличении; возможные контакты дорсальнокорешковых волокон и регистрируемого мотонейрона указаны стрелками. *в* — участок моторного ядра, в центральной части которого видна терминальная веточка афферентного волокна с утолщениями (У); мотонейроны (МН) окрашены тионином по Нисслю. *г* — фронтальный срез спинного мозга черепахи с окрашенными дорсальнокорешковыми волокнами и мотонейроном 1 (см. в тексте), меченным внутриклеточно ПХ после его регистрации. *д* — участок, выделенный на фото *г* рамкой, при большем увеличении; видны утолщения афферентных волокон в дорсальной части моторного ядра и около сомы мотонейрона (М1). Масштабные отрезки: 10 (*б*), 15 (*в*), 25 (*а*), 50 (*д*) и 300 (*г*) мкм.

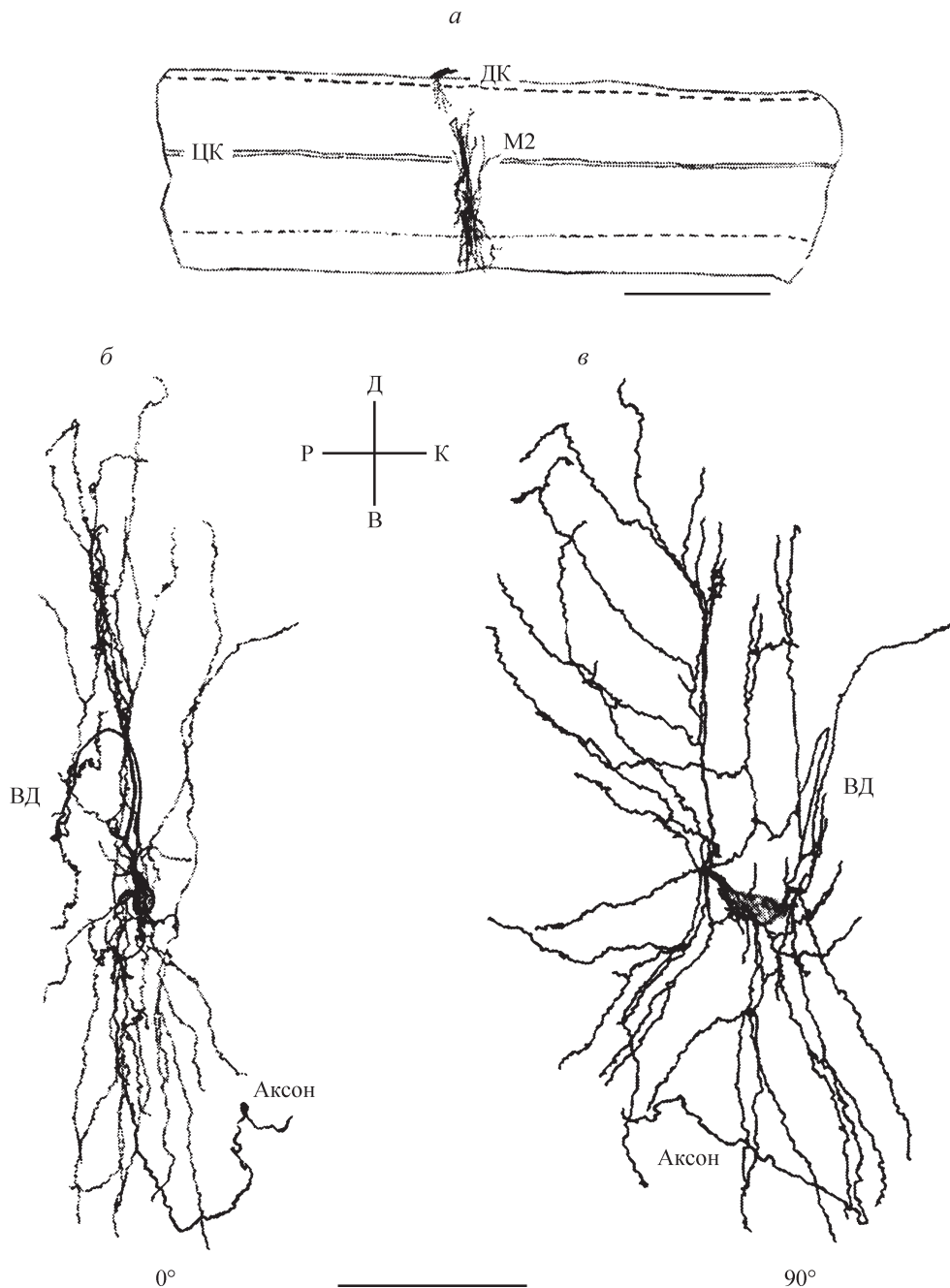


Рис. 4. Трехмерная реконструкция мотонейрона 2 (M2), регистрируемого в эксперименте и окрашенного с помощью внутриклеточной инъекции ПХ.

a — общая схема расположения мотонейрона 2 (M2) на сагитальном срезе поясничного утолщения спинного мозга; ЦК — центральный канал, ДК — дорсальный корешок с окрашенным филламентом, Д, В, Р и К — дорсальное, вентральное, ростральное и каудальное направления соответственно. *б* — вид трехмерной реконструкции M2 в сагитальном плане (0°); ВД — ветвь вентромедиального дендрита. *в* — вид реконструкции во фронтальном плане (поворот вокруг оси Y на 90°). Масштабные отрезки: 1 мм (*a*) и 250 мкм (*б, в*).

всех его 5 дендритов 11 мм (около 48 %). У мотонейрона 2, имеющего 7 первичных дендритных стволов с ветвлениями, простирающимися суммарно более чем на 17 мм, протяженность 61 сегмента только дорсального дендрита составляет более 7 мм (около 42 %). Радиальной симметрии разветвлений поясничных мотонейронов черепах, как было выявлено у кошки (Cullheim et al., 1987), не наблюдалось. Общий объем нейропиля, занимаемого дендритами поясничных мотонейронов черепахи, не соответствовал форме куба или шара. Скорее, это диск, так как дорсовентральная протяженность дендритного поля мо-

тонейронов составляла около 1 мм, медиолатеральная — 0.7—0.8 мм, а ростокаудальная — лишь 0.3—0.5 мм (рис. 4).

Трехмерные реконструкции коллатералей афферентных волокон во фронтальном и сагитальном планах представлены на рис. 7. Морфометрические данные 5 коллатералей 5 афферентных волокон сведены в табл. 1. На рис. 7, представляющем вид коллатералей в двух планах (фронтальном — 0° и сагитальном — 90°), видно, что реконструированные коллатерали занимают узкое пространство нейропиля (до 50—70 мкм), т. е. заметно

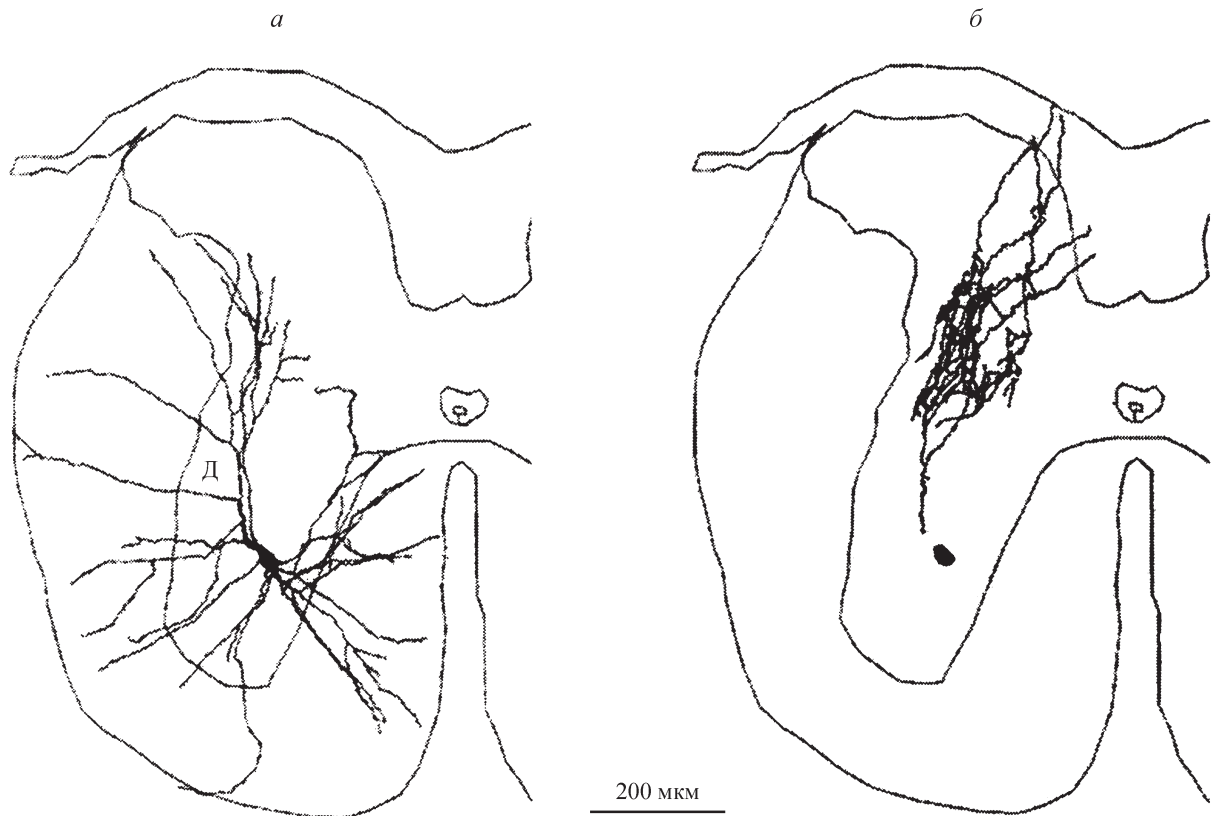


Рис. 5. Трехмерные реконструкции, представленные на схемах фронтальных срезов спинного мозга, мотонейрона 1, окрашенного ПХ (а), и коллатералей дорсальнокорешковых афферентных волокон, ветвящихся в области дорсального дендрита (Д) мотонейрона (б).

выражено ростокаудальное ограничение распределения деревьев афферентных коллатералей, как и дендритного поля мотонейронов в спинном мозге черепахи.

Ветвясь в области дорсального дендритного дерева мотонейрона 1, 4 коллатерали 4 афферентных волокон устанавливали предполагаемые контакты с этим мотонейроном. Предполагаемые контакты с мотонейроном 1 были обнаружены только в сером веществе, на дендритных сегментах 1—7-го порядков ветвлений дорсального дендрита (рис. 5, 6). Выявлено, что утолщения 4 коллатералей 4 афферентных волокон, концевые и по ходу волокна, плотно прилегали к дендриту мотонейрона в количестве 1, 2, 6 и 7. Возможные контакты располагались на его дендритной поверхности поодиночке или группами, т. е. 16 контактов формировались в виде 7 контактных зон (кластеров), состоящих из одиночных или близко расположенных друг к другу утолщений афферентных коллатералей (расстояние между соседними контактами составляло не более 10 мкм) (рис. 6, б). Удаленность 7 контактных зон от сомы мотонейрона 1, в котором находился регистрирующий микроэлектрод, составляла 150—250 мкм.

В другом эксперименте более толстый филамент дорсального корешка после аппликации ПХ содержал большее число меченых волокон, контактирующих с мотонейроном 2, расположенным приблизительно на 100 мкм каудальнее входа дорсального корешка в спинной мозг (рис. 4). При реконструкции связей мотонейрона 2 было выявлено, что 12 нисходящих ветвей дорсальнокорешковых волокон посылали 12 коллатералей в область распределения дендритного дерева исследуемого мотонейрона.

46 возможных контактов было обнаружено на ветвях двух его дендритов. На дорсальном дендрите найдено 15 контактов и 31 — на вентромедиальном дендрите, посылающим дорсолатерально в VI пластину интермедиального серого вещества мощный дугообразный ствол толщиной около 3 мкм (рис. 4), ветвящийся рostrальнее тела клетки, т. е. ближе к входу дорсального корешка. На обоих дендритах мотонейрона 2 утолщения коллатералей афферентных волокон тесно располагались друг за другом (рис. 3, а, б), но выделение отдельных контактных зон, устанавливаемых каждой отдельной коллатералью, не представлялось возможным из-за множественных переплетений претерминальных веточек афферентных волокон вдоль дендритов мотонейрона. Можно отметить, что наиболее плотное расположение предполагаемых контактов обнаруживалось на сегментах дендритов высоких порядков ветвления, в 200—220 мкм от сомы. В среднем одна коллатераль дорсальнокорешкового афферентного волокна с мотонейроном устанавливала также 4 контакта, как и в эксперименте с мотонейроном 1.

Обсуждение

Полученная нами общая схема расположения областей интраспинальных ветвлений афферентных волокон дорсального корешка в поясничном отделе спинного мозга черепах *Testudo horsfieldi* сравнима с распределением афферентов в спинном мозге других видов черепах (Ten Donkelaar, 1997). Однако применение микроаппликаций ПХ на филаменты дорсального корешка позволило нам не

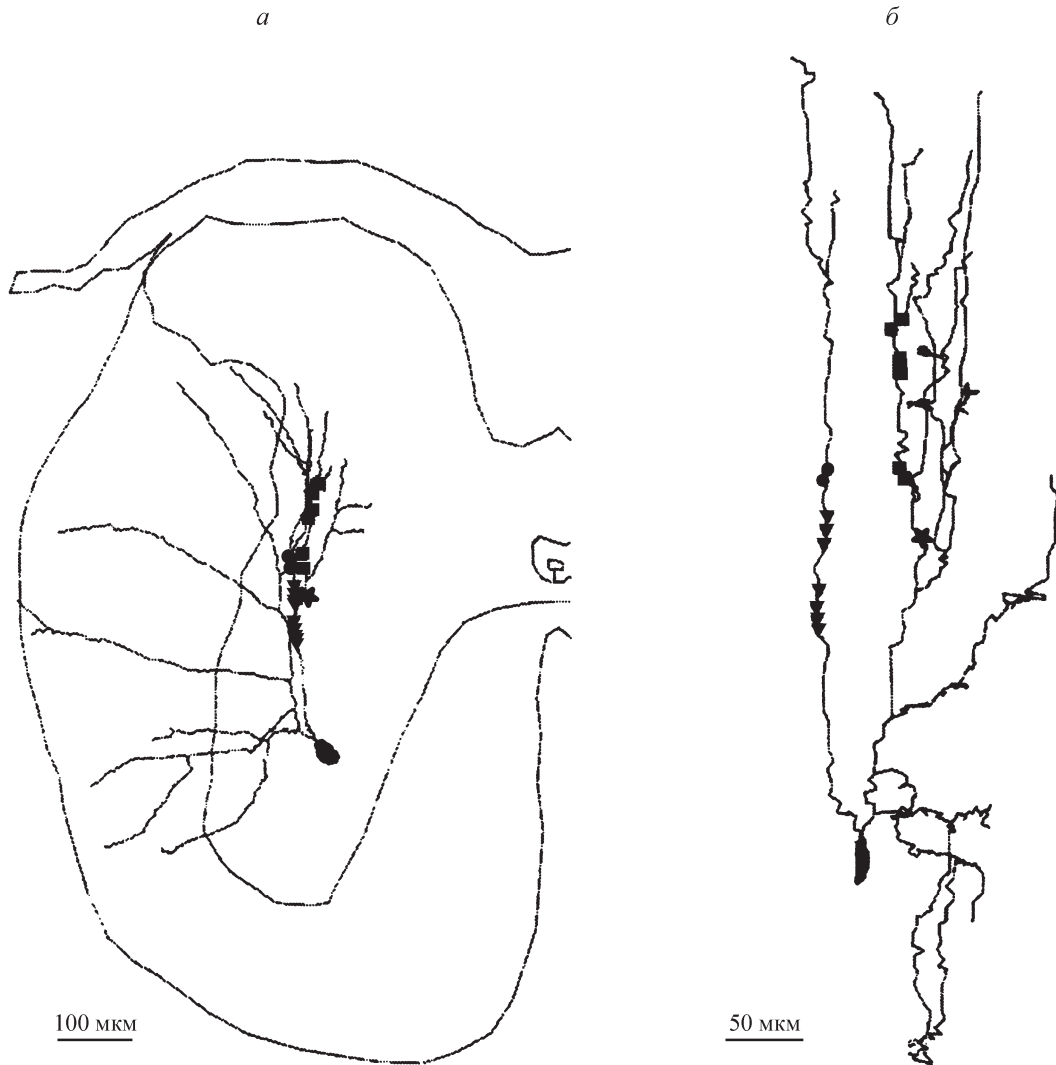


Рис. 6. Расположение возможных контактов четырех коллатералей (соответственно табл. 1) четырех дорсальнокорешковых афферентных волокон на дорсальном дендрите мотонейрона 1.

a — общий вид реконструкции дорсального дендрита мотонейрона 1 с контактами на схеме фронтального среза мозга; *б* — вид дорсального дерева мотонейрона 1 с контактами в сагиттальном плане (поворот вокруг оси Y на 90°). Контакты коллатералей 1—4 обозначены соответственно *треугольниками, квадратами, кружками и звездочкой*.

только подтвердить известные данные литературы, но дать сведения, не описанные ранее. На основании нашего материала представлена схема (рис. 8), дополняющая такую работу Руигрока с сотрудниками (Ruigrok et al., 1985c). В ней кроме ранее описанных зон ветвления афферентных волокон показаны ипсилатеральные ветвления и окончания дорсальнокорешковых волокон, как у млекопитающих в зоне Лиссауера (Light, Perl, 1979), в моторном ядре (Ishizuka et al., 1979), а также в вентральной части латерального канатика и у поверхности спинного мозга. Нами был выявлен переход тонких афферентных волокон на противоположную половину мозга через дорсальную комиссуру и контралатеральное распределение их в IV и V пластинках серого вещества поясничного утолщения, как у амфибий (Adanina et al., 1983) и млекопитающих (Light, Perl, 1979). Эти данные могут служить морфологическим базисом в исследованиях свойств мотонейронов и их ответов при избирательной стимуляции разных областей белого вещества спинного мозга черепахи (Delgado-Lesama et al., 1999, 2004),

в исследованиях билатерально сформированных нейронных цепей в спинном мозге, обеспечивающих лево- и правосторонние двигательные рефлексы (Stein et al., 1998).

В результате обнаружения нами ветвлений и окончаний афферентных коллатералей в латеральном белом веществе и у вентролатеральной поверхности мозга возникли вопросы о возможных постсинаптических структурах в этих областях и соответственно функциональном назначении этого пути поступления афферентных сигналов у черепахи. Мишенью могли бы быть дистальные отделы латеральных дендритов мотонейронов. Известно, что у черепах, как и у других представителей позвоночных низших классов (круглоротых и амфибий), латеральные дендриты спинальных мотонейронов обильно ветвятся в латеральном канатике (у поверхности мозга), образуя перимедулярное сплетение из тончайших кончиков дендритов (Nieuwenhuys, 1964). Однако сенсомотонейронных контактов в этой области нейропиля нами выявлено не было, и возникший вопрос остается открытым.

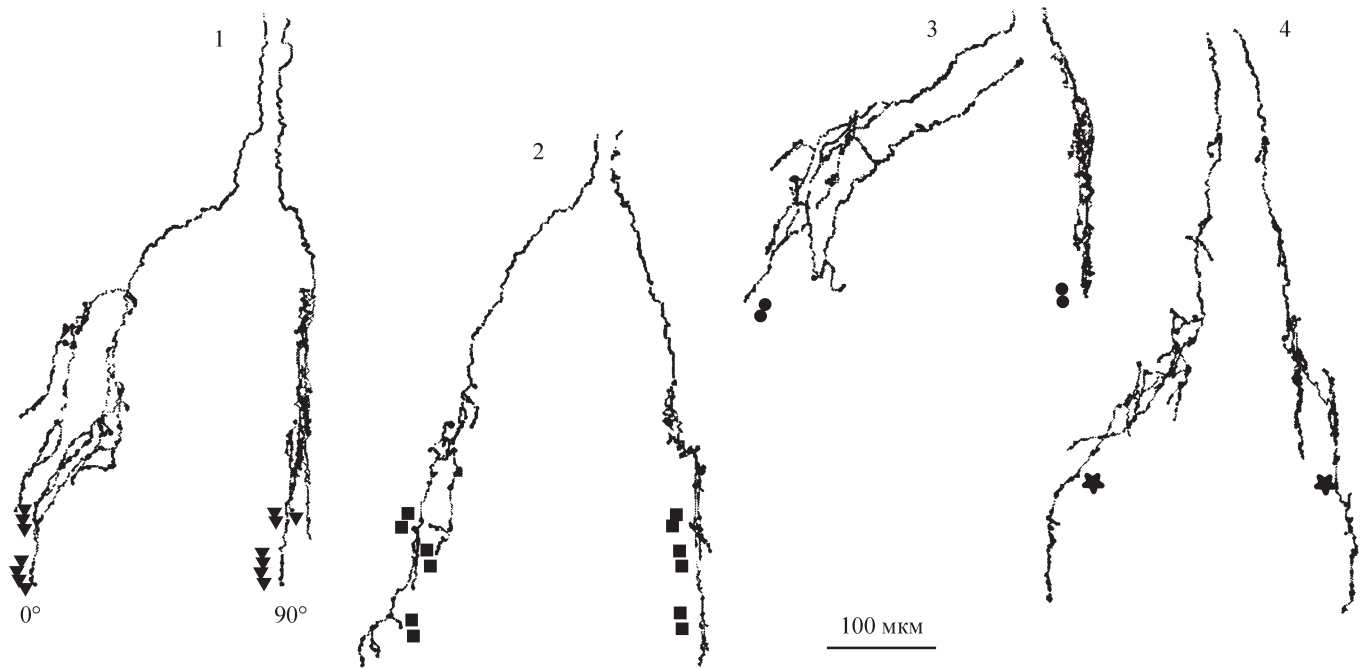


Рис. 7. Графические реконструкции афферентных коллатералей 1—4 с областями контактов, отмеченных на рис. 6. Реконструкции каждой из коллатералей представлены во фронтальном (0°) и сагитальном (90°) планах, показанных для коллатерали 1.

Важным новым фактом нашего исследования является обнаружение у черепахи афферентных коллатералей, достигающих моторных ядер, ветвящихся и оканчивающихся в них (рис. 2, 3). По данным литературы, подход дорсальнокорешковых афферентных волокон к моторным ядрам наблюдался лишь у ящериц — представителей рептилий со значительно более подвижными задними конечностями, пальцы которых участвуют в сложных перемещениях животного (Kusuma, Ten Donkelaar, 1980; Ten Donkelaar, 1997). Нами были обнаружены ветвления конечных веточек, окружающих тела окрашенных по Нисслю мотонейронов. Следовательно, сенсомотонейронные контакты возможны не только на дендритах, как уже было показано ранее на черепахе *Pseudemys scripta elegans* (Rugirok et al., 1985b) и нами (настоящая работа), но и на сомах мотонейронов черепах.

Результаты морфометрии трехмерных реконструкций коллатералей дорсальнокорешковых афферентных волокон черепахи (табл. 1) выявили значительно меньшее среднее число утолщений отдельных коллатералей (84) по сравнению с таковым числом у лягушки (более 600; табл. 2) и меньшую плотность их распределения в коллатерали (среднее число утолщений коллатерали на 1 мм ее общей длины): 39 у черепахи по сравнению с 60 у лягушки (табл. 2).

Трехмерная реконструкция связей дорсальнокорешковых афферентных с поясничными мотонейронами спинного мозга черепахи *Testudo horsfieldi* выявила значительное пространственное ограничение ветвлений дендритных деревьев поясничных мотонейронов в rostro-каудальном направлении (до 0.5 мм) по сравнению с таковым у лягушки (>2 мм) (Grantyn et al., 1984; Dityatev et al., 2001). Поле ветвящейся коллатерали афферентного

Таблица 1

Морфометрические данные трехмерной реконструкции пяти коллатералей пяти дорсальнокорешковых волокон, ветвящихся в области дорсального дендритного дерева регистрируемого мотонейрона 1 в поясничном утолщении спинного мозга черепахи *Testudo horsfieldi*

Номер	Число возможных контактов с мотонейроном 1	Средняя толщина коллатерали 1-го порядка, мкм	Число сегментов ветвлений всей коллатерали	Число утолщений одной коллатерали	Диапазон диаметра утолщений, мкм	Плотность утолщений (количество утолщений на 1 мм длины)
1	7	1.6	41	90	0.8—3.0	36
2	6	1.0	35	57	0.7—3.4	38
3	2	1.8	33	64	0.4—3.2	33
4	1	1.3	65	128	0.5—3.3	57
5	—	1.3	35	79	0.9—3.8	34
Среднее и его отклонение			41.8 ± 13.3	83.6 ± 28.0	0.4—3.8	39.6 ± 9.9

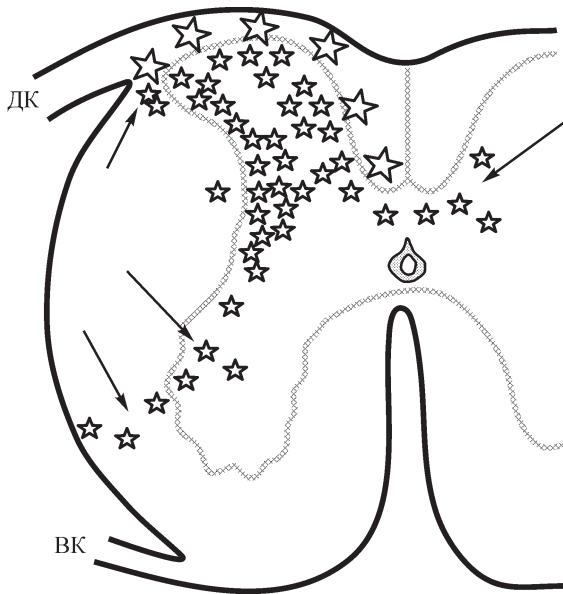


Рис. 8. Общая схема хода восходящих и нисходящих ветвей дорсальнокорешковых афферентных волокон (большие звездочки) и распределения их терминальных ветвлений (мелкие звездочки) в поясничном утолщении спинного мозга черепахи *Testudo horsfieldi*.

ДК — дорсальный корешок, ВК — вентральный корешок; стрелками указаны дополнительные области окончаний дорсальнокорешковых волокон, выявленные в настоящей работе.

волокна черепахи в сагиттальном плане также ограничено и составляло лишь 50—70 мкм, что может свидетельствовать о более сфокусированной проекции афферента на дендриты мотонейронов определенного моторного ядра черепах *T. horsfieldi*.

Действительно, в значительной части опытов было трудно найти мотонейроны, имеющие прямую связь с афферентными волокнами тонкого филамента дорсально корешка. Нами было выявлено, что она может устанав-

ливаться небольшим числом контактов (1—7) одной коллатерали волокна (табл. 1, 2), как и у черепахи *P. scripta elegans* (1—6) (Ruigrok et al., 1985b). Установление связи одним афферентным волокном с мотонейроном, расположенным не в области входа дорсального корешка, посредством двух коллатералей возможно, но с малой вероятностью, так как у черепахи, как и у других позвоночных (Ishizuka et al., 1979; Grantyn et al., 1984), наблюдается редкое отхождение коллатералей первого порядка от восходящих и нисходящих ветвей (в среднем через 400 мкм) и в основном единичное. При отхождении двух коллатералей от одной точки афферентной ветви области их ветвления часто оказываются достаточно удаленными друг от друга, так что и в этом случае в область сходного с диском дендритного поля одного мотонейрона вступает одна коллатераль.

Однако другая ситуация может возникать при расположении мотонейрона непосредственно под входом первичных афферентных волокон в спинной мозг, где после бифуркации волокна каждая из его ветвей посылает первичную коллатераль к вентральному рогу, и ближайшие к точке бифуркации коллатерали объединяются, вступая в область дендритного поля мотонейрона. Нами были выявлены наиболее мощные пучки коллатералей афферентных волокон именно в этой части спинного мозга (рис. 1, в, г). Таким образом, путь передачи сигналов от отдельному мотонейрону от одного афферентного волокна в области входа волокон дорсального корешка в спинной мозг возможен по двум коллатералям. В таком случае у черепахи возможно формирование большего числа прямых контактов одного волокна с мотонейроном. Соотношение числа контактов связи афферент—мотонейрон и удаленности мотонейрона от точки входа волокна в спинной мозг рассматривалось на модельных представлениях сенсомотонейронного синапса кошки: мотонейрон, расположенный дальше от места входа афферентного волокна в спинной мозг, имеет меньше его контактов (Luescher, Clamann, 1992).

Сравнить некоторые структурные характеристики сенсомотонейронной связи в спинном мозге черепахи с

Таблица 2

Сравнение некоторых структурных характеристик сенсомотонейронной связи в спинном мозге черепахи и лягушки

Характеристика	Лягушка	Черепаха
Средний диаметр афферентной коллатерали, мкм	2.6 (2.1—3.8) [1] 2.2 (1.3—4.4) [3]	1.4 (1.0—1.8) [5]
Среднее число утолщений одной коллатерали	670 (515—757) [1] 640 (141—2192) [3]	84 (57—128) [5] 98.0 ± 40.1 [4]
Средняя плотность распределения утолщений (n) в коллатерали, п/мм	60 [3]	39 [5]
Средний диаметр утолщений, мкм	2.13 (0.8—4.6) [1] 1.69 (0.3—3.9) [3]	1.9 (0.4—3.8) [5]
Число коллатералей, участвующих в одной связи	1—3 [1—3]	1 [4, 5]
Число утолщений афферентного волокна, контактирующего с одним мотонейроном	38.5 (19—72) [1—3]	3.9 (1—7) [4, 5]
Число контактных зон на одном мотонейроне	12.3 (5—23) [1—3]	2.0 (1—3) [4, 5]
Число утолщений в одной контактной зоне	3.3 {1—12} [1]	2.0 (1—4) [4, 5]

Примечание. В круглых скобках указан разброс значений, в квадратных — источник литературы: [1] Grantyn et al., 1984; [2] Чмыхова и др., 1987; [3] Chmykhova et al., 2007; [4] Ruigrok et al., 1985b; [5] Данные настоящей работы.

такowymi лягушки можно по данным табл. 2. Видно, что у черепах по сравнению с лягушкой значительно меньше величины трех показателей: общего числа контактов, числа контактных зон и числа утолщений в одной контактной зоне в связи. Такое упрощение сенсомоторной связи у черепахи, вероятно, компенсируется изменением функциональных характеристик сенсомоторнейронного соединения рептилий по сравнению с таковыми амфибий — изменением, выражающимся в значительном увеличении эффективности передачи сигналов, сходной с таковой у млекопитающих (Кожанов и др., 2004; Chmykhova et al., 2007).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ОБН РАН и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-48533, 08-04-00098) и Швейцарского национального научного фонда (грант № 31-45729.95).

Список литературы

- Батуева И. В. 1972. Надсегментарные синаптические влияния на поясничные мотонейроны черепахи. Физиол. журн. СССР. 58 : 1673—1685.
- Кожанов В. М., Карамян О. А., Чмыхова Н. М., Клеманн Х. П. 2001. Модуляция спонтанной синаптической активности мотонейронов спинного мозга черепахи метаботропными глутаматными рецепторами II группы. Нейрофизиология. 33 (2) : 111—119.
- Кожанов В. М., Чмыхова Н. М., Карамян О. А., Веселкин Н. П., Клеманн Х. П. 2004. Морфофизиологическое исследование сенсомоторнейронных соединений спинного мозга степных черепах. В кн.: Материалы Всероссийской конференции «Механизмы синаптической передачи». М. 41.
- Чмыхова Н. М., Шаповалов А. И., Ширяев Б. И., Комиссарчик Я. Ю., Слизиревская Е. С. 1987. Ультраструктурный анализ физиологически идентифицированного и маркированного пероксидазой хрена сенсомоторного синапса лягушки. Докл. АН СССР. 293 (1) : 250—251.
- Adams J. 1977. Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker. Neuroscience. 2 : 141—145.
- Adanina V. O., Shapovalov A. I., Shiriaev B. I., Tamara Z. A. 1983. Tracing of motoneurons and primary afferent projections after intracellular staining with lucifer yellow: dye-coupling. Neuroscience. 9 : 453—461.
- Chmykhova N. M., Karamian O. A., Kozhanov V. M., Dityatev A. E., Clamann H.-P., Vesselkin N. P. 2007. 3-D reconstructions of the individual afferent-motoneuron contact system in the frog and turtle. In: Abstracts. The Fifth European conference on comparative neurobiology, 25—28 April. Paris. 131.
- Cullheim S., Fleshman J. W., Glenn L. L., Burke R. E. 1987. Architecture of dendritic trees in the type-identified α -motoneurons. J. Comp. Neurol. 255 : 82—96.
- Delgado-Lezama R., Aguilar J., Cueva-Rolon R. 2004. Synaptic strength between motoneurons and terminals of the dorsolateral funiculus is regulated by GABA receptors in the turtle spinal cord. J. Neurophysiol. 91 : 40—47.
- Delgado-Lezama R., Perrier J.-F., Hounsgaard J. 1999. Local facilitation of plateau potentials in dendrites of turtle motoneurons by synaptic activation of metabotropic receptors. J. Physiol. 515 : 203—207.
- Dityatev A. E., Chmykhova N. M., Dityateva G. V., Babalian A. L., Kleinle J., Clamann H.-P. 2001. Structural and physiological properties of connections between individual reticulospinal axons and lumbar motoneurons of the frog. J. Comp. Neurol. 430 : 433—447.
- Grantyn R., Shapovalov A. I., Shiriaev B. I. 1984. Tracing of frog sensory-motor synapses by intracellular injection of horseradish peroxidase. J. Physiol. 349 : 441—458.
- Hounsgaard J., Kiehn O., Mintz I. 1988. Response properties of motoneurons in a slice preparation of the turtle spinal cord. J. Physiol. 398 : 575—589.
- Ishizuka N., Mannen H., Hongo T., Sasaki S. 1979. Trajectory of group Ia afferent fibers stained with horseradish peroxidase in the lumbosacral spinal cord of the cat: tree dimensional reconstructions from serial sections. J. Comp. Neurol. 186 : 189—212.
- Itoh K., Konishi A., Nomura S., Mizuno N., Nakamura Y., Sugimoto T. 1979. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. Brain Res. 175 : 341—346.
- Kusuma A., Ten Donkelaar H. J. 1980. Dorsal root projections in various types of reptiles. Brain Behav. Evol. 17 : 291—309.
- Light A. R., Perl E. R. 1979. Reexamination the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. J. Comp. Neurol. 186 : 117—132.
- Luescher H.-R., Clamann H.-P. 1992. Relation between structure and function in information transfer in spinal monosynaptic reflex. Physiol. Rev. 72 : 71—99.
- Nieuwenhuys R. 1964. Comparative anatomy of the spinal cord. In: Organization of the spinal cord. Progress in Brain Research. London: Elsevier Publ. Co. 11 : 1—57.
- Rosenberg M. E. 1972. Excitation and inhibition of motoneurons in the tortoise. J. Physiol. (Lond.). 221 : 715—730.
- Ruigrok T. J. H., Crowe A., Ten Donkelaar H. J. 1985a. Morphology of primary afferents to the spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. Anat. Embryol. 171 : 75—81.
- Ruigrok T. J. H., Crowe A., Ten Donkelaar H. J. 1985b. Termination of primary afferents on lumbar motoneurons in the turtle *Pseudemys scripta elegans*. Brain Res. 339 : 141—145.
- Ruigrok T. J. H., Crowe A., Ten Donkelaar H. J. 1985c. Dendrite distribution of identified motoneurons in the lumbar spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. J. Comp. Neurol. 238 : 275—285.
- Stein P. S. G., McCullough M. L., Currie S. N. 1998. Reconstruction of flexor—extensor alternation during fictive rostral scratching by two-site stimulation in the spinal turtle with transverse spinal hemisection. J. Neurosci. 18 : 467—479.
- Ten Donkelaar H. J. 1997. Reptiles. In: The central nervous system of vertebrates. Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo: Springer-Verlag. 1315—1524.
- Yamashita M. 1986. Monosynaptic connections of low threshold muscle afferents with hindlimb motoneurons in the turtle spinal cord. Exp. Brain Res. 63 : 519—529.

Поступила 25 XII 2007

DORSAL ROOT AFFERENT FIBER TERMINATION IN THE SPINAL CORD
OF THE TURTLE *TESTUDO HORSFIELDI* AND 3-DIMENSIONAL RECONSTRUCTION
OF THE SENSORY-MOTONEURON CONNECTION

N. M. Chmykhova,¹ O. A. Karamian,¹ V. M. Kozhanov,¹ N. P. Vesselkin,¹ X.-P. Clemann²

¹ I. M. Sechenov Institute RAS, St. Petersburg, Russia, and ² Institute of Physiology, University of Bern, Switzerland;
¹ e-mail: nchmykhova@mail.ru

HRP tracing methods and computer reconstruction were used to study the structural organization of sensory-motoneuron connections in the turtle. HRP was applied through suction electrodes to thin dorsal and ventral root filaments of superfused isolated lumbar spinal cord of the turtle *Testudo horsfieldi*. Single motoneurons were labeled iontophoretically with the use of intracellular glass microelectrodes. Labeled elements were examined by light microscopy. The Eutectic Neuron Tracing System and its associated program were used for 3-D reconstructions and morphometry. The distribution of dorsal root afferent fibers and their terminations were presented in a new scheme in which, beside the well known zones, new ones were shown in the Lissauer zone, motor nuclei, ventrolateral funiculus and in the contralateral medial gray matter (IV—V laminae). Unlike in the frog, the motoneuron dendritic field in the turtle was restricted to an ellipsoid space having a short axis in the rostro-caudal direction (300—500 μm). The dorsal root afferent fibers connected to motoneurons produced very short branches (50—70 μm) in a restricted rostro-caudal direction. One dorsal root fiber collateral had about 80 synapselike enlargements (approximately 10-fold fewer than in the frog). The putative sensory-motoneuron contacts were found on the I—VII order dendritic segments of the dorsal and ventromedial dendritic trees. It was shown that in the turtle only one first order collateral of the dorsal root fiber participated in the sensory-motoneuron connection with a small number (about 4) of putative contacts, which was also less than in the frog by a factor of 10. The simplicity of the synapse structure in the turtle is likely to be compensated through the higher efficiency of the signal transmission which is comparable to that in mammals.

Key words: spinal motoneurons, dorsal root afferent fibers, horseradish peroxidase, 3-dimensional reconstruction, sensory-motoneuron connection, turtle.