

УДК 611.832+616–001.4]:591.151

© С. Н. Семенов, Н. Т. Алексеева, С. О. Фетисов, 2013

ПОЛИМОРФИЗМ НЕЙРОНОВ СПИНОМОЗГОВЫХ УЗЛОВ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ СЕНСОРНЫХ ВОЛОКОН ВСЛЕДСТВИЕ НАНЕСЕНИЯ ГЛУБОКОЙ РАНЫ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

С. Н. Семенов, Н. Т. Алексеева, С. О. Фетисов

ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко»
Минздрава России, г. Воронеж, Россия

В статье представлены результаты изучения структурно-функционального состояния популяции нейронов спинномозговых узлов крыс в процессе заживления экспериментальной глубокой раны мягких тканей. Подтверждено разделение популяции нейронов спинномозгового узла на две подгруппы по размерному и тинкториальным признакам на большие А-нейроциты и малые В-нейроциты. Отмечено возникновение дегенеративных и компенсаторных реакций нейронов по механизму уоллеровской дегенерации. Выраженность реакций соответствовала стадиям раневого процесса и имела отличия для нейронов разных типов.

Ключевые слова: спинномозговые узлы, чувствительные нейроны, полиморфизм популяции, глубокие раны мягких тканей.

© S. N. Semenov, N. T. Alekseeva, S. O. Fetisov, 2013

Polymorphism of Spinal Ganglia Neurons After Injury of Peripheral Sensory Fibers Due to the Application of Deep Soft Tissue Wounds

The results of the study of the structural and functional state of the population of neurons in the rat spinal ganglia during healing of experimental deep soft tissue wounds. The division of the population of neurons into two subgroups by the dimension and tinctorial characteristics as large A-neurocytes and small B-neurocytes has been confirmed. The degenerative and compensatory responses of neurons by Waller's degeneration mechanism were observed. Intensity of reactions corresponded with the stages of wound healing, and differed for different types of neurons.

Keywords: spinal ganglia, sensory neurons, polymorphism of population, deep soft tissue wounds.

Введение

Рассматривая участие нейронов спинномозговых узлов (СМУ) в процессах, сопровождающихся повреждением покровных тканей, необходимо отметить их значительную роль в регуляции морфогенетических механизмов воспаления и последующей пролиферации клеточных элементов [2, 3, 8, 12]. В свою очередь с ростом глубины и размеров раны увеличивается вероятность повреждения дендритов псевдоуниполярных клеток с последующей деафферентацией поврежденного участка. Регенерация поврежденных отростков зависит от состояния как самих нейронов, так и клеток тканей-мишеней, которые способны регулировать рост дендритов [3, 7, 9].

Оценивая динамику дегенеративных и регенерационных процессов, протекающих в СМУ, необходимо учитывать гетерогенность нейронов, которые отличаются морфофункциональными особенностями: размерами, степенью развития субстанции Ниссля в перикарионе, топографией ядра и ядрышка. Существует

значительное число публикаций посвященных классификации нейронов СМУ, при этом нет определенности в количестве типов нервных клеток в составе чувствительных ганглиев [1, 4, 5, 13]. В некоторых работах отмечено изменение соотношения различных типов нервных клеток после перерезки, лигирования, сдавления и других значительных воздействий на нервные стволы [1, 3, 8, 12, 14]. Предполагается, что эти изменения связаны с дифференцировкой функций нейронов и различной скоростью де- и регенерации волокон разного диаметра.

В связи со сказанным выше достаточно актуальным является изучение морфофункциональных особенностей нейронной популяции СМУ в процессе заживления глубокой раны кожи и подлежащих мягких тканей в эксперименте на лабораторных животных.

Материал и методы исследования

Объектом изучения являлись 126 половозрелых белых беспородных самцов крыс-самцов в возрасте 6 месяцев к нача-

лу эксперимента. Масса тела животных варьировала от 250 до 300 г соответственно их возрасту. Животные были разделены на 7 групп, каждая из которых состояла из 18 крыс, включая группу биологического контроля (интактных животных). Каждая группа, кроме группы интактных крыс соответствовала установленным срокам исследования, в которое животные выводились из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом: на 1, 3, 5, 7, 14 и 28 сутки, соответственно. В стерильных условиях после удаления волосяного покрова на переднюю поверхность левого бедра крысы острым скальпелем наносили разрез длиной 1 см и глубиной 0,5 см. Швы на рану не накладывали. Раневой дефект закрывали стерильной повязкой, которую меняли при каждом кормлении животных. Нанесенную рану использовали в качестве экспериментальной для оценки процесса ее произвольного заживления. Основываясь на литературных данных [8], производили препарирование и иссечение поясничных ганглиев L_{III}–L_V, соответствующих нервам, иннервирующим область нанесенной раны. Серийные продольные парафиновые срезы толщиной 6–7 мкм окрашивали крезильным фиолетовым по методике Ниссля в модификации И. В. Викторова. Для качественного анализа и идентификации структурных особенностей в популяции нейронов СМУ нами выделялись клетки с реактивными (компенсаторно-приспособительными) и деструктивными (альтеративными) изменениями. Для измерения размерных характеристик (площади среза) нейронов производили цифровую микрофотосъемку с использованием компьютерного комплекса анализаторов изображений на базе микроскопа Leica DMLB. Полученные изображения обрабатывали с использованием графического планшета и программы ImageJ ver. 1.68. Значения площади в пикселях переводили в мкм² при помощи встроенного в программу и предварительно откалиброванного конвертера. Статистическую обработку проводили при помощи программного пакета Statistica 6.0. Для выявления достоверности различий между группами использовались Mann–Whitney test; с целью выявления достоверности доли выборки использовали метод углового преобразова-

ния Фишера. Достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Гистологическое исследование СМУ контрольных животных выявило классическое строение чувствительного ганглия: псевдоуниполярные нейроны в большей массе располагались на периферии узла под соединительнотканной капсулой, по периферии нервных клеток в тонких прослойках рыхловолокнистой соединительной ткани располагались глиальные элементы, формируя вместе с нервными волокнами перинейрональную оболочку (капсулу). Центральная часть узла заполнена пучками нервных волокон с залегающими между ними небольшими группами нейроцитов. Их ядра, имеющие округлую и овальную форму, занимали как центральное, так и эксцентричное положение. Каждое ядро содержало 1–2 крупных, хорошо очерченных ядрышка. Хроматофильное вещество по своему строению было неоднородным. Большинство нейронов имели крупные глыбки, прилежащие к нуклеолемме, при этом значительная часть вещества была представлена в диспергированном виде. У некоторых нейронов тигроид располагался равномерно по всей цитоплазме. Проведенные морфометрические измерения в контрольной группе животных показали бимодальный характер распределения вы-

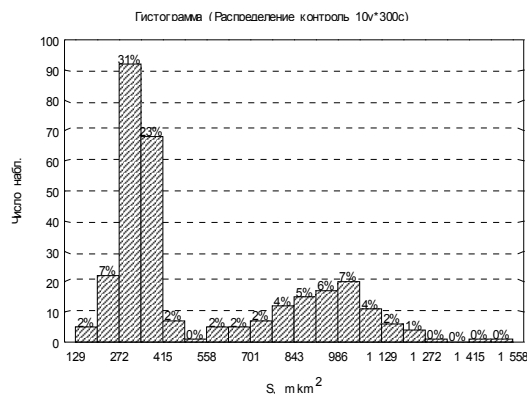


Рис. 1. Интервальная гистограмма распределения площадей срезов нейронов поясничных СМУ у интактных крыс. Бимодальный характер распределения. Обозначения: по оси абсцисс – площадь среза нейрона в мкм² (S , мкм²), по оси ординат – число наблюдений.

при этом нейроны каждой подгруппы

обладали заметными особенностями в состоянии и распределении хроматофильной субстанции. Основываясь на этом факте, а также данных литературы [4, 6, 11, 13], нами было выделено у экспериментальных животных в СМУ спинномозговых сегментов L_{III}–L_V две группы нейроцитов – А и В типов.

А-тип нервных клеток – это крупные, светлые нейроны с отчётливыми глыбками базофильного вещества и волонкнистой ядерной мембраной, одним большим центрально расположенным ядрышком (иногда с 1–2 мелкими ядрышками) и чаще с миелинизированным аксоном. Считается, что клетки А-типа обеспечивают эпикритическую чувствительность [10, 11, 13]. В контрольной группе доля таких клеток составляла $33.3 \pm 2.6\%$. По данным морфометрии средняя площадь центрального среза таких нейронов составляла 958.3 ± 12.4 мкм².

Нейроциты В-типа – мелкие, темные клетки с диффузным распределением базофильного вещества, часто со светлым ореолом в центре клетки, гладкой ядерной мембраной, с одним или более мелкими ядрышками, часто расположенными на периферии ядра, снабжены преимущественно немиелинизированными отростками. Такие нейроны являются висцеросенситивными, а также передают термическую и тактильную протопатическую чувствительность [10, 11, 13]. Доля таких нейронов у интактных животных составляла $66.7 \pm 6.8\%$. Средняя площадь среза нейрона равнялась 332.5 ± 37.2 мкм². Учитывая особенности строения двух типов нейронов и выполняемые ими различные функции, дальнейшее изучение их морфофункциональных особенностей проводилось отдельно для каждой популяции нервных клеток.

Результаты гистологического исследования через сутки после нанесения раны показали, что на фоне подавляющего большинства неизменённых нейронов были выявлены нервные клетки с такими же ретроградными изменениями, которые описаны при перерезке ветвей спинномозгового нерва. Уже через 24 часа после нанесения ранения в структуре изучаемых ганглиев были обнаружены изменения реактивно-деструктивного характера. У некоторых нейронов отмечены признаки “первичного раздражения”. Тела клеток – набухшие с различной степенью лизиса тигроида: от распыления в

центре до почти полного исчезновения. Ядра смещались к одному из полюсов (у $18.1 \pm 0.7\%$ нейронов), ядрышко при этом так же нередко принимало эксцентричное положение. Отдельные нейроны имели признаки центрального хроматолиза, эктопии и набухания ядра, распыления вокруг него хроматофильного вещества. Встречались клетки на различных стадиях гидропической дистрофии с расширенным перицеллюлярным пространством, вакуолизацией цитоплазмы, эктопией и деформацией ядер. У многих животных наблюдались более глубокие формы деструкции, такие как пикноз нервных клеток и их гиперхроматоз. При этом размеры клеточного тела уменьшались, его контуры становились более четкими, глыбки тигроида сближались и сливались в компактную, темно-окрашенную массу. Ядро часто имело палочковидно вытянутую форму. Нейроны с такими признаками деструктивных изменений обнаруживались среди обеих популяций клеток ганглиев. Среди нейроцитов доля клеток А-типа на 1-е сутки эксперимента составляла $7.6 \pm 0.8\%$, для В-клеток $8.3 \pm 0.7\%$. Некоторые из таких клеток в дальнейшем подвергались цитолизу. В некоторых нейрочитах необратимые изменения проявлялись в виде вакуолизации нейроплазмы, кариоцитоза или пикноза ядра. В отдельных ганглиях среди всей популяции нервных клеток начинали проявляться глубокие изменения нервных клеток с грубым нарушением структуры всех основных элементов: цитоплазмы, ядра и ядрышка. Контур у таких клеток – неровные, нечеткие, ядро и ядрышко слабо или совсем неразличимы. В далеко зашедших стадиях дегенеративных изменений цитоплазма подвергалась лизису. В большинстве случаев не было возможности отнести такие нейроны к той или иной популяции клеток СМУ. На 1-е сутки исследования доля таких клеток была незначительной и составляла $1.1 \pm 0.9\%$. Вследствие изменений в структуре нейронов, проявляющихся уже к 1 суткам наблюдения, отмечались сдвиги в соотношении между двумя популяциями нейронов. При этом незначительно снижалась доля А-нейроцитов до $31.4 \pm 1.1\%$, соответственно доля В-клеток несколько увеличивалась до $68.6 \pm 1.3\%$. Анализ гистогаммы распределения нервных клеток на основании планиметрических характеристик показал большую гетерогенность

популяции нейронов СМУ: увеличивался диапазон минимальных и максимальных размеров клеток, возникали клетки с промежуточными показателями площади среза. Однако бимодальность распределения сохранялась, что позволяло нам учитывать морфологические показатели в обеих группах нейронов (рис. 2).

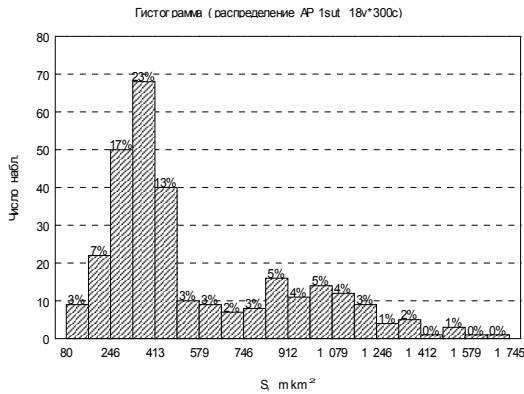


Рис. 2. Интервальная гистограмма распределения площадей срезов нейронов СМУ на 1 сутки при естественном заживлении раны. Обозначения: по оси абсцисс – площадь среза нейрона в мкм² (S, мкм²), по оси ординат – число наблюдений.

На 3 сутки после нанесения ранения реакция со стороны нейронов СМУ характеризовалась увеличением количества клеток с дегенеративно-дистрофическими изменениями. Так, в нейронах обеих популяций нарастали явления хроматолиза, выражающиеся в увеличении просветленной области между ядром и хроматофильной субстанцией, смещенной на периферию цитоплазмы. Нарастали явления пикноза и гидропических изменений свойств коллоидов цитоплазмы. Количество А-клеток с реактивными изменениями составляло $11.2 \pm 1.3\%$, В-клеток – $15.5 \pm 0.8\%$. Данные морфометрии отражали увеличение площади среза нейронов как для А-клеток (1021 ± 18 мкм²), так и для В-клеток (416 ± 28 мкм²). В обоих случаях показатели достоверно ($p < 0.05$) отличались от биологического контроля и статистически достоверно не отличались ($p = 0.057$) от предыдущего срока наблюдения. Распределение клеток и соотношение типов нейронов по размерным признакам были сходными с аналогичными показателями, выявляемыми на 1 сутки эксперимента (рис. 3). Однако необходимо отметить незначительное увеличение полиморфизма среди малых В-нейроцитов.

На 5-е сутки эксперимента изменения носили сходный с предыдущим сроком исследования характер. Наблюдались очаговые изменения нейронов с преобладанием реактивных изменений, сопровождающихся центральным и тотальным хроматолизом; возникали цитокариопикноз, у некоторых нейронов – гиперхрома-

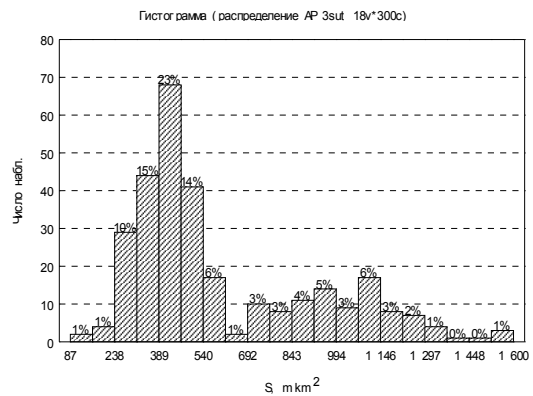


Рис. 3. Интервальная гистограмма распределения площадей срезов нейронов СМУ при естественном заживлении асептической раны на 3 сутки эксперимента. Увеличение полиморфизма малых В-нейроцитов. Обозначения: по оси абсцисс – площадь среза нейрона в мкм² (S, мкм²), по оси ординат – число наблюдений.

тоз цитоплазмы. У многих клеток отмечались полости между цитолеммой и перинейрональной капсулой, содержание которых составило $10.5 \pm 2.1\%$ и $19.3 \pm 1.6\%$ для А- и В-нейронов соответственно. На этом фоне продолжалось увеличение полиморфизма в размерах малых нейронов. При увеличении среднего значения площади среза А- и В-клеток до 1134 ± 25 мкм² и 468 ± 21 мкм² соответственно возрастало количество нейронов с площадью среза менее 200 мкм², а также – в диапазоне 550–700 мкм². В первом случае снижение планиметрического показателя происходит вследствие нарастания реактивных изменений в малых клетках. Во втором случае увеличение числа клеток отражает возникновение переходных по планиметрическим показателям форм нейронов вследствие роста средней площади малых клеток и пикноза больших А-нейронов (рис. 4).

Через неделю после нанесения раны продолжало увеличиваться количество деструктивно измененных клеток с признаками хроматолиза, эксцентрично расположенным ядром ($38.2 \pm 1.4\%$ от всех нейронов). Отмечалась вакуолизация

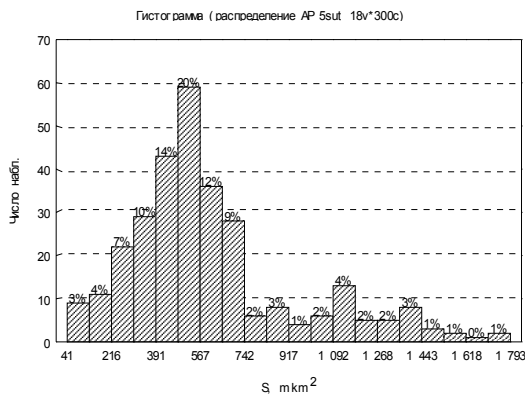


Рис. 4. Интервальная гистограмма распределения площадей срезов нейронов СМУ при естественном заживлении асептической раны на 5 сутки эксперимента. Обозначения: по оси абсцисс – площадь среза нейрона в мкм² (S , мкм²), по оси ординат – число наблюдений.

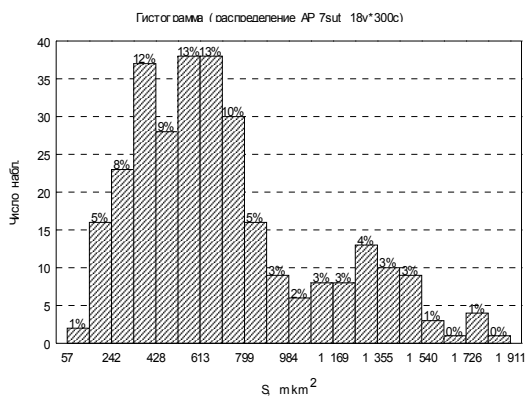


Рис. 5. Интервальная гистограмма распределения площадей срезов нейронов СМУ при естественном заживлении асептической раны на 7 сутки эксперимента. Обозначения: по оси абсцисс – площадь среза нейрона в мкм² (S , мкм²), по оси ординат – число наблюдений.

цитоплазмы и ядра. Хроматофильная субстанция находилась в различном состоянии: от полного распыления и лизиса до интенсивной реакции с красителем с образованием крупных глыбок вблизи цитолеммы.

Во многих исследованных СМУ увеличивался размер очагов с деструктивно измененными нервными клетками. Количество измененных А-нейроцитов составляло $12.8 \pm 1.9\%$, В-нейроцитов – $22.4 \pm 1.4\%$. Вследствие необратимых ретроградных изменений значительно (в 5.5 раз до $16.4 \pm 1.3\%$) увеличивалось число нейронов с признаками кариорексиса и цитолиза. По данным морфометрии, отмечались значительные перестройки как в соотношении двух популяций клеток на

(10% уменьшилась популяция больших нейронов), так и внутривидовые перестройки (рис. 5). Внутри основной группировки малых нейронов возникла дополнительная бимодальность, отделяющая, по всей видимости, отдельную группу дистрофически измененных нейронов. Среди крупных нейронов отдельную группу составляли клетки с увеличенными размерами, находящиеся, вероятно, в состоянии регенерационной гипертрофии. При этом параметры клеток с дистрофическими изменениями, возможно, смещались в сторону увеличенных в размерах клеток в диапазоне 550–700 мкм² и сливались с ними.

Через 14 суток процессы клеточной деструкции в ганглиях проявлялись наиболее заметно. Отмечалось значительное количество ($33.4 \pm 4.7\%$ от общего числа клеток) гиперхромных веретеновидных клеток с неразличимым или лизированным ядром, а также бледных лизированных клеток-теней с глиальными элементами в цитоплазме нейрона. В результате нейрофагии формировались локальные плотные скопления сателлитных глиоцитов – “глиальные узелки”. Количество реактивно измененных А-нейронов клеток продолжало возрастать до $18.2 \pm 1.8\%$. Доля реактивно измененных В-нейронов, напротив, снижалась и составляла $20.6 \pm 2.4\%$. Среди таких нейронов начинали преобладать клетки с явлениями компенсаторной гипертрофии – крупными глыбками базофильного вещества, эктопированными ядрами, содержащими 2 и более ядрышек. Явлениям регенерационной гипертрофии соответствовали и возросшие в большей степени размеры тел нервных клеток: размеры А-клеток увеличивались до 1427 ± 36 мкм², В-клеток – 567 ± 29 мкм². Распределение площадей срезов нейронов внутри их субпопуляций отражало бимодальность и преобладание нейронов с показателями, близкими к верхней границе диапазонов, соответствующих двум подтипам нейронов. Наличие самых малых В-нейронов и сдвиг их распределения вправо являлся возможным отражением продолжающихся дистрофических изменений (рис. 6).

К 28 суткам исследования по величине структурно-функциональных показателей нейронной популяции СМУ наблюдалась тенденция к их нормализации. Большая часть нервных клеток находи-

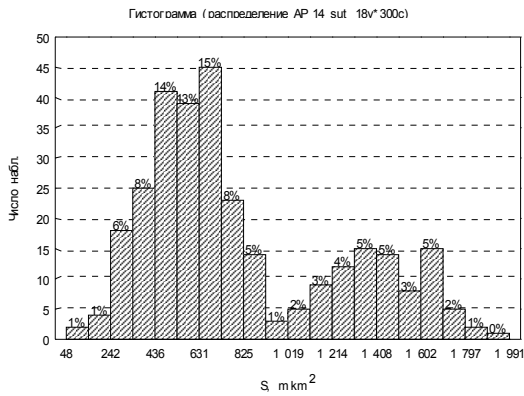


Рис. 6. Интервальная гистограмма распределения площадей срезов нейронов СМУ при естественном заживлении асептической раны на 14 сутки эксперимента. Обозначения: по оси абсцисс – площадь среза нейрона в мкм² (S, мкм²), по оси ординат – число наблюдений.

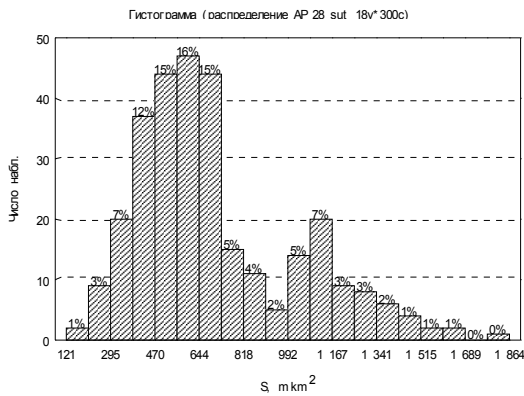


Рис. 7. Интервальная гистограмма распределения площадей срезов нейронов СМУ при естественном заживлении асептической раны на 28 сутки эксперимента. Обозначения: по оси абсцисс – площадь среза нейрона в мкм² (S, мкм²), по оси ординат – число наблюдений.

лась в неизменном состоянии. Реактивные изменения носили в основном компенсаторный характер, и были выражены в большей степени для В-клеток (16.1±3.8%), чем для А-нейроцитов (9.1±1.3%). Среди таких нейронов была распространена гиперхромная окраска цитоплазмы с выраженными глыбками базофильного вещества. Деструктивно измененные нейроны были представлены фрагментированными лизирующимися элементами и интенсивно пикнотизированными безъядерными нейрочитами. Доля таких клеток в сравнении с предыдущим экспериментальным сроком снижалась до 27.8±3.6%. Это свидетельствовало о вступлении процессов клеточной

дегенерации в завершающую стадию и начале реорганизации клеточной популяции СМУ. Характер распределения групп нейронов по своим размерам приближался к показателям контроля, как по форме огибающей кривой, так и по амплитуде значений площадей срезов тел нервных клеток с поправкой на больший полиморфизм показателя у малых клеток и общий сдвиг его в сторону больших значений (рис. 7). Размеры клеток снижались по сравнению с 14 сутками и составляли 1118±19 мкм² и 552±35 мкм² для А- и В-нейронов соответственно. При этом данные значения достоверно превышали показатели первой недели эксперимента и значения у контрольных животных.

Выводы

Обобщая вышесказанное, можно отметить, что на протяжении различных стадий раневого процесса отмечаются перестройки в популяциях нейронов СМУ. Их характер обусловлен как изменением функционального состояния нейроцитов, проявляющемся в перестройке хроматофильного вещества и функциональном изменении размеров клеток, так и возникновением нейронов с признаками реактивных и альтеративных изменений. Отмеченные отличия в реакциях нейронов А- и В-типа подтверждают гипотезу о различной скорости развития дегенеративных и репарационных процессов в их чувствительных отростках и, как следствие, изменения морфофункционального состояния тел нейронов СМУ на различных этапах раневого процесса.

Список литературы

1. Ермолин И. Л. Размерные группы нейронов спинномозгового узла T13 в норме и в условиях периферической деафферентации // Нижегородский медицинский журнал. 2006. № 2. С. 29–34.
2. Семенов С. Н., Глухов А. А., Алексеева Н. Т. и др. Морфофункциональные изменения нейронов спинномозговых узлов при ранах мягких тканей // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2011. Т.IV, № 3. С. 557–561.
3. Семенов С. Н., Фетисов С. О. Роль сенсорных нейронов и их морфофункциональное состояние при раневом процессе // Журнал анатомии и гистопатологии. 2012. Т. 1, № 4. С. 25–33.
4. Чайковский Ю. Б., Втюрин Б. В. Некоторые ультраструктурные особенности

- нервных клеток спинальных ганглиев // Архив анатомии. 1973. Т. 64, № 4. С. 5–9.
5. Чельшев Ю. А., Рагинов И. С., Гусева Д. С., Масгутов Р. Ф. Выживание и фенотипическая характеристика аксотомированных нейронов спинальных ганглиев // Морфология. 2004. Т. 125, № 3. С. 45–49.
 6. Andres K. H. Untersuchungen uber den Feinbau von Spinal-ganglien // Z.Zellforsch. 1961. Vol. 55, № 1. P. 1–48.
 7. Ansel J., Kaynard A., Armstrong C. et al. Skin-nervous system interactions // J. of investigative dermatology. 1996. Vol. 106, № 1. P. 198–204.
 8. Cruise B., Xu P., Hall F. Wounds increase activin in skin and a vasoactive neuropeptide in sensory ganglia // Developmental biology. 2004. Vol. 271. P. 1–10.
 9. International review of neurobiology: essay on peripheral nerve repair and regeneration. Ed. by S. Geuna. Elsevier. 2009. 548 p.
 10. Head H., Sherren J. The consequences of injury to the peripheral nerves in man // Brain. 1905. Vol. 23, Issue 2. P. 116–120.
 11. Price J. An immunohistochemical and quantitative examination of dorsal root ganglion neuronal subpopulation // The J. of neuroscience. 1985. Vol 5, N. 8. P. 2051–2059.
 12. Rook J., McCarson K. Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release // Biochem Pharmacol. 2007. № 74. P. 752–757.
 13. Tandrup T. A method for unbiased and efficient estimation of number and mean volume of specified neuron subtypes in rat dorsal root ganglion // J Comp Neurol. 1993. Vol. 329, № 2. P. 269–276.
 14. Tandrup T., Woolf C. J., Coggeshall R. E. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve // J Comp Neurol. 2000. Vol. 422, № 2. P. 172–180.

Информация об авторах

Семенов Сергей Николаевич – д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО “Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко” Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10.

Алексеева Наталья Тимофеевна – к.м.н., доцент, и.о. зав. кафедрой нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО “Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко” Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10.

Фетисов Сергей Олегович – ассистент кафедры нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО “Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко” Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10.

Поступила в редакцию 27.02.2013 г.