

УДК 616-001.4-018.84.001.6

© Фетисов С.О., Семенов С.Н., 2011

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОНОВ СПИНОМОЗГОВЫХ УЗЛОВ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА

Фетисов С.О., Семенов С.Н.

ГБОУ ВПО Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, Россия

Фетисов С.О., Семенов С.Н. Морфологические особенности нейронов спинномозговых узлов у экспериментальных животных при моделировании раневого процесса // Украинський морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 71-73.

В эксперименте на 216 самцах белых беспородных крыс изучали изменения, возникающие в нейронах спинномозговых узлов (СМУ) при различных моделях заживления глубоких ран кожи. Моделировали естественное заживление раны и осложненное гнойным процессом, а также процесс заживления асептических и гнойных ран при применении тромбоцитарного концентрата (ТК) в качестве экспериментального лечебного фактора. Изучали морфометрические особенности нейронов СМУ различных размерных групп. Установлена связь между выраженностью проявлений морфологических изменений нейронов СМУ и скоростью заживления кожных ран. Наименее выраженные изменения соответствуют асептическим ранам при применении ТК, наиболее выраженные – гнойным ранам при введении ТК.

Ключевые слова: спинномозговые узлы, А- и В-нейроны, глубокие раны кожи, тромбоцитарный концентрат.

Фетисов С.О., Семенов С.Н. Морфологічні особливості нейронів спинномозгових вузлів у експериментальних тварин при моделюванні раневого процесу // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 71-73.

В експерименті на 216 самцях білих беспородних щурів вивчали зміни, що у нейронах спинномозгових вузлів при різних моделях загоєння глибоких ран шкіри. Моделювали природне загоєння рани і ускладнений гнійним процесом, а також процес загоєння асептичних і гнійних ран при застосуванні тромбоцитарного концентрату (ТК) як експериментального лікувального фактора. Вивчали морфометричні особливості нейронів спинномозгових вузлів різних розмірних груп. Встановлено зв'язок між вираженістю проявів морфологічних змін нейронів СМУ і швидкістю загоєння шкірних ран. Найменш виражені зміни відповідають асептичним ран при застосуванні ТК, найбільш виражені – гнійних ран при введенні ТК.

Ключові слова: спинномозкові вузли, А- і В-нейрони, глибокі рани шкіри, тромбоцитарний концентрат.

Fetisov S.O., Semenov S.N. Morphological features of neurons of spinal knots for experimental animals at the design of ranewo process // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 71-73.

In an experiment on 216 male white rats studied the changes occurring in the neurons of the dorsal root ganglion (DRG) for different models of healing the deep wounds of the skin. Simulated natural healing wounds and purulent complicated process, as well as the healing of aseptic and purulent wounds in the application of platelet concentrate (PC) as an experimental treatment factor. We studied the morphometrical characteristics of DRG neurons different size groups. The connection between the severity of the manifestations of morphological changes in neurons and rate of skin wounds healing is established. The least pronounced changes correspond to aseptic wounds in the application of the PC, the most prominent – purulent wounds with the introduction of the PC.

Key words: dorsal root ganglion, A- and B-type of neurons, deep skin wounds, platelet concentrate.

Трофическое влияние нервной системы на пластические процессы в тканях является одной из её функций. Чувствительные нейроны реагируют на изменение структурной целостности органа, его компонентов и участвуют в поддержании этой целостности и обеспечении нейроэндокринной регуляции процессов, сопровождающих заживление раны [1, 2, 3].

Целью нашего исследования являлось изучение изменений нейронов спинномозговых узлов поясничных сегментов L_{III}-L_V в динамике раневого процесса с различной скоростью заживления. Нами были использованы следующие модели раневого процесса:

1. Естественное заживление условно асептических ран.
2. Естественное заживление ран осложненных гнойной инфекцией.
3. Заживление условно асептических и гнойных ран при использовании тромбоцитарного концентрата (ТК) в качестве экспериментального фактора изменяющего скорость течения раневого процесса [4, 5].

Не детализируя клинические особенности течения раневого процесса и механизмы действия тромбоцитарного концентрата, следует заметить, что его применение при асептических ранах обеспечивало наибольшую скорость заживления, второе место по скорости заживления занимали условно асептические раны при их естественном течении. Фаза активного воспаления занимала 1-2 суток, фаза пролифе-

рации завершалась в среднем на рубеже 5-х суток, после чего процессы, происходящие в ране, были направлены на реорганизацию рубца. Гнойные раны демонстрировали заметное утяжеление раневого процесса и замедление репарации кожи. Модель наиболее осложненного течения представляли гнойные раны при внесении тромбоцитарного концентрата. Для тяжелого течения раневого процесса было характерно удлинение всех стадий заживления раневого дефекта на 1-3 суток.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на базе кафедры нормальной анатомии человека и Института хирургических инфекций ВГМА им. Н.Н. Бурденко. Работа выполнена на 216 самцах взрослых белых беспородных крыс массой 250-280 г. В стерильных условиях на переднюю поверхность левого бедра острым скальпелем наносили разрез длиной 1 см и глубиной 0,5 см. Были сформированы 5 групп животных: группа интактного виварного контроля (ВК) и 4 экспериментальные. У первой экспериментальной группы лечение ран не производили (условно асептические раны – АР), второй группе животных в раневой дефект однократно вносили суспензию тромбоцитарного концентрата с концентрацией тромбоцитов не менее 1 млн/мкл (применение ТК – АР+ТК). Для моделирования гнойного раневого процесса образовавшийся раневой дефект вносили марлевый тампон с взвесью суточной культуры *Staphylococcus aureus* с концентрацией 10¹⁰ микробных тел в 1 мл 0,9% раствора NaCl, на рану накладывали адаптационные пввы. На вторые сутки от начала

експеримента в ранах появлялись признаки воспаления: гиперемия и отечность кожи, просачивание по линии швов гнойного экссудата. На 3-и сутки развивалась модель острого гнойного воспаления с обильным гнойным отделяемым. Швы с раны снимали, края раны разводили, удалялся марлевый тампон. Из раневого дефекта выделялось около 2-3 мл гноя. В результате получалась модель гнойной раны (ГнР), части животных с данной моделью однократно вносили ТК (ГнР+ТК).

Животные выводились из эксперимента на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 14-е, 28-е сутки равными группами по 7 животных в каждой, включая группу виварного контроля. Производили иссечение поясничных ганглиев L_{III}-L_V как соответствующих нервам, иннервирующим область нанесенной раны. Взятый материал фиксировали в смеси Карнуа и заливали по стандартной методике в смесь парафин-гистомикс, затем на микротоме готовили срезы толщиной 6 мкм. Полученные срезы окрашивали крезоловым фиолетовым по методике Ниссля.

На светооптическом уровне изучали следующие характеристики нервных клеток: площадь профильного поля нейрона, площадь ядра, производили вычисление ядерно-цитоплазматического индекса. Для определения площади ядер и профильного поля нейронов производили цифровую микрофото съемку, полученные изображения обрабатывали с использованием графического планшета и программы ImageJ ver. 1.68. Полученные значения площади в пикселях переводили в мкм² при помощи встроенного в программу и предварительно откалиброван-

Таблица 1. Значения площади профильного поля нейрона СМУ при естественном заживлении (АР), гнойном течении процесса (ГнР), при применении ТК (АР+ТК, ГнР+ТК) и для группы виварного контроля (ВК)

Сроки исследования	Площадь профильного поля нейрона S мкм ²				
	А-клетки				
	ВК	АР	АР+ТК	ГнР	ГнР+ТК
1сут	2347±94,2	2665±114,3	2862±97,6*	2421±88,7*^	2440±83,6*#~
3сут	2339±96,7	2768±95,8*	3026±93,2*#	2636±94,8*^	2703±88,9*#~
5сут	2359±88,7	2858±103,6*	3004±81,6*	2963±107,6*^	2817±91,2*#~
7сут	2421±95,5	3053±95,5*	3139±78,8*#	2957±103,3*	2583±78,8*#~
14сут	2366±94,1	3577±87,8*	3404±95,3*	3136±93,3*#^	2643±88,8*#~
28сут	2422±102,2	3381±83,2*	3178±90,1*#	3054±86,1*^	2987±87,4*#~
	В-клетки				
1сут	967±17,1	988±18,3	974±19,4	986±27,4	993±28,6
3сут	973±16,3	1011±16,5*	986±22,2	1024±29,4*^	1087±30,1*#^
5сут	971±16,6	1218±19,8*	1027±20,5*#	1312±30,5*#^	1235±33,8*~
7сут	968±16,5	1114±20,1*	1123±22,3*#	1093±30,7*	1149±30,4*
14сут	971±17,1	1061±20,3*	1009±25,5*#	947±35,3*#^	1062±29,2*~
28сут	972±17,4	1033±21,2*	979±22,4*#	966±34,8*#	1043±27,6*~

Примечание: Значения выражены в виде M±tm, где M – значение планиметрического показателя, tm – доверительный интервал. * - достоверное отличие от ВК (p<0,05), # - достоверное отличие от АР (p<0,05), ^ - достоверное отличие от АР+ТК (p<0,05), ~ - достоверное отличие от ГнР (p<0,05).

Если наиболее выраженные изменения площади В-клеток отмечались на 5-е сутки, то основной пик изменений размеров А-клеток был характерен для 14-ти суток. Естественно, что в данном случае измерения проводились в сохранившихся клетках СМУ, вследствие этого размеры нейронитов при тяжелом течении воспаления в меньшей мере отличались от значений контроля. А в группах асептических ран выявленные изменения размеров также отражали состояние реактивно-измененных клеток.

Оценивая динамику изменения ЯЦИ для А-типа нейронов СМУ можно отметить, что при естественном процессе заживления кожной раны наблюдалось плавное снижение показателя ЯЦИ по отношению к контрольным значениям до 14-ти суток наблюдения включительно (рис. 1).

Применение ТК, равно как и наличие в ране гнойного процесса, кардинально меняло направ-

ного конвертера. Опираясь на литературные данные [6, 7] и анализ результатов морфометрических исследований, показавший бимодальный характер распределения морфометрических показателей нейронов СМУ, мы выделяли 2 основные группы нейронов: А-клетки со средним поперечником более 30 мкм, светлым перикарионом и глыбчатым распределением субстанции Ниссля; В-клетки со средним поперечником меньше или равным 30 мкм, округлые клетки с темным перикарионом и диффузным распределением вещества Ниссля. Эти типы нейронов СМУ традиционно связывают с проводниками различных типов чувствительности: малые В-клетки относят к протопатической чувствительности, крупные А-клетки - к эпикритической.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета Statistica 6.0. Статистический анализ выборок абсолютных значений исследованных признаков показал их отклонения от закона нормального распределения. Вследствие этого их сравнение в отдельных группах проводили с использованием Mann-Whitney test (u), достоверными считались результаты при p<0,05. Сравнение относительных показателей проводили с использованием метода Фишера.

Результаты исследования. Рассматривая полученные данные можно отметить, что раневой процесс вызывал достоверные изменения морфометрических показателей нейронов СМУ крысы. При этом относительные изменения размеров А- и В-клеток происходили не только с различной выраженностью, но и в разные сроки раневого процесса (табл. 1).

ленность изменений показателя ЯЦИ. Вместо его снижения регистрировался рост показателя до 7-х суток эксперимента в группах АР+ТК и ГнР, при этом значения ЯЦИ были ниже контрольных показателей. Модель наиболее осложненного течения ран (ГнР+ТК) демонстрировала увеличение ЯЦИ в период с 5-х по 14-е сутки эксперимента и превышала соответствующие значения контрольной группы.

Для малых В-клеток наблюдаемые изменения ЯЦИ имели во многом отличную от А-клеток динамику (рис. 2). В большей части наблюдений значения ЯЦИ достоверно превышали значения контроля и в основной своей массе демонстрировали рост, с максимумом на 14-е сутки эксперимента. Наименьший диапазон изменений показателя ЯЦИ был характерен для модели естественного заживления ран, наибольший - для гнойных ран. Также высокими

значеннями ЯЦИ характеризувались нейрони СМУ у живих тварин з асептичними ранами при примененні ТК, на протязенні більшості експерименту превышавші показателі других груп.

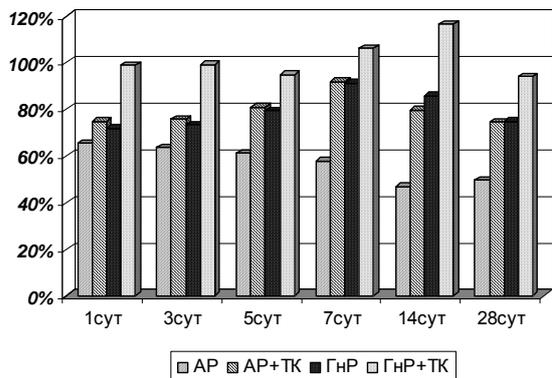


Рис. 1. Динамика значення ядерно-цитоплазматического индекса нейронов А-типа в СМУ крыс для различных моделей раневого процесса в % к контролю.

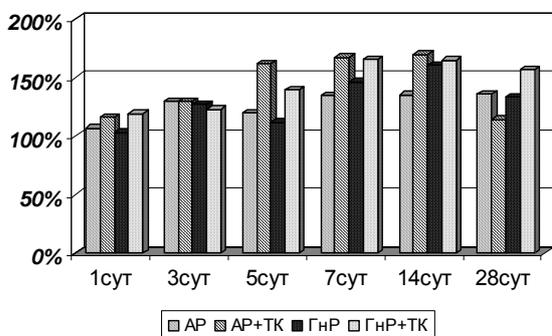


Рис. 2. Динамика значення ядерно-цитоплазматического индекса нейронов В-типа в СМУ крыс для различных моделей раневого процесса в % к контролю.

Функциональные изменения в нейронах, сопровождающие процесс заживления раны, могут приводить к разнонаправленным сдвигам морфометрических характеристик цитоплазмы и ядер, что необходимо учитывать при трактовке показателей ядерно-цитоплазматического индекса (ЯЦИ). Увеличение индекса может являться следствием нескольких процессов: уменьшения площади профильного поля клетки вследствие её пикноза, увеличения размера ядра нейрона и комбинации этих двух факторов.

Анализ динамики соотношения изученных групп нейронов, дифференцированных на основании показателя площади, показывает, что на протяжении всего эксперимента наблюдался процесс их перестройки (рис. 3).

В начальные сроки (до 3-х суток включительно) происходило снижение относительного количества нейронов В-типа, сменяющееся затем постоянным приростом их доли до последнего экспериментального срока включительно. Клетки А-типа демонстрировали противоположную динамику. Обнаруживается связь между динамикой изменений и экспериментальными факторами: применение ТК в чистых ранах уменьшало выраженность перестройки соотношений в начальные сроки, а наличие гнойного процесса увеличивало амплитуду колебания соотношения между группами клеток пропорционально тяжести раневого процесса. Изменение соотношения различных размерных групп клеток являлось, по-видимому, следствием нескольких процессов: увеличением

или уменьшением площади изучаемых клеток и возникновением необратимых деструктивных изменений в разные сроки эксперимента, приводившим к элиминации клеток разного размера [8].

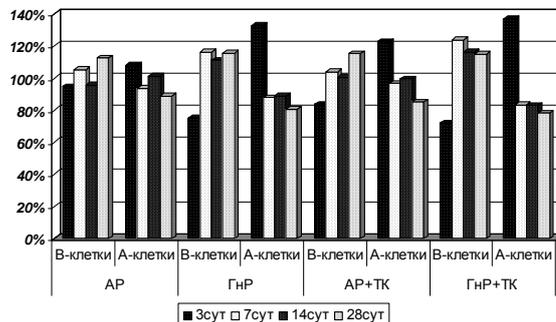


Рис. 3. Изменение соотношений типов нейронов при естественном (АР), гнойном (ГнР) течении раневого процесса и при применении тромбоцитарного концентрата (АР+ТК, ГнР+ТК) в выборочные сроки, в % к контролю.

Выводы: Нейроны СМУ реагируют на глубокое ранение кожи с подлежащими тканями комплексом компенсаторно-приспособительных реакций, вследствие чего происходили изменения планиметрических показателей и соотношения нейронов различных типов. Изменения размеров клеток сохранившихся нейронов СМУ и их ЯЦИ свидетельствует о сложных морфофункциональных перестройках, сопровождающих различное течение раневого процесса.

Наличие гнойного процесса и его утяжеление вызывает большую выраженность изменений в нейронах СМУ во все сроки эксперимента.

Наибольшую скорость восстановления показателей демонстрирует модель условно асептических ран при применении ТК.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Галабов Г.П. Морфологический и гистохимический анализ клеток спинного мозга и спинальных ганглиев в условиях различных травм и регенерации периферических нервов / Г.П. Галабов // Структура и функция нервной системы. – М.: Медицина, 1962. – С. 65-73.
2. Ansel J. Skin-nervous system interactions / J. Ansel, A. Kaynard, C. Armstrong et al. // J. of investigative dermatology. – 1996. – Vol.106, №1. – P. 198-204.
3. Burbach G. The neurosensory tachykinins substance P and neurokinin a directly induce keratinocyte nerve growth factor / G. Burbach, K. Kim, A. Zivony et al. // J. of investigative dermatology. – 2001. – Vol.117, №5. – P. 1075 – 1082.
4. Глухов А.А. Гистохимический анализ репаративных процессов в асептических экспериментальных ранах при использовании гидроимпульсной санации и тромбоцитарного концентрата / А.А. Глухов, С.Н. Семенов, Н.Т. Алексеева, А.П. Остроушко // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2010. – Том 3, №4 – С. 368-373.
5. Foster T. Platelet-Rich Plasma: From basic science to clinical application / T. Foster, B. Puskas, B. Mandelbaum et al. // The Am J Sports Med. - 2009. - vol.37. - P.2249-2251.
6. 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.
7. Gardner E., Martin J., Jessel T. The bodily senses / E. Gardner, J. Martin, T. Jessel // Principles of neural science. – New-York: McGraw – Hill Medicine, 2000. – P. 430-449.
8. Ермолин И. Л. Морфология спинномозгового узла в норме и в условиях деафферентации у взрослой крысы: автореф. дис. ...доктора биол. наук / И. Л. Ермолин; Нижегородская мед. акад. – Нижний Новгород, 2006. – 29 с.

Надійшла 11.09.2011 р.

Рецензент: доц. В.М.Волошин