

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 616.834.4–018–001.4.004.36
doi:10.18499/2225-7357-2023-12-4-9-21
1.5.22 – клеточная биология



Морфофункциональная характеристика нейронов спинномозговых узлов в динамике заживления гнойной раны

Д. Б. Никитюк^{1, 2}, С. О. Фетисов³✉, С. В. Ключкова⁴, Н. Т. Алексеева³

¹Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

⁴Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Россия

Аннотация. Цель исследования – оценка связи морфологического и функционального состояния нейронов спинномозговых узлов с динамикой заживления гнойной раны экспериментального животного при ее естественном течении и комплексной терапии гидроимпульсной санацией (ГИС) и внесением обогащенной тромбоцитами плазмы крови (ОТПК). **Материал и методы.** В эксперименте на 100 белых беспородных крысах моделировали гнойную рану боковой поверхности бедра, внесением суточной культуры *Staphylococcus aureus*. Сформировали две группы: естественное заживление и заживление после терапии гидроимпульсной санацией раны изотоническим раствором NaCl с последующим внесением обогащенной тромбоцитами аутоплазмы крови. Материал для исследования забирали на 1-, 3-, 5-, 7-, 14-, 21-е сутки. Площадь раны и динамику ее заживления оценивали планиметрическим методом. Для исследования брали поясничные спинномозговые узлы (СМУ) сегментов LIII–LV. На светооптическом уровне после окраски крезиловым фиолетовым по Нисслю и азуром В по методу S.Shea измеряли площадь нервных клеток, производили фотометрию содержания РНК, подсчитывали количество сателлитных глиоцитов. Полученные данные обрабатывали методами статистического анализа. **Результаты.** Процесс заживления гнойной раны кожи завершался формированием рубца на 7–14-е сутки для обеих экспериментальных групп. Применение ГИС и ОТПК демонстрировало лучшую динамику закрытия дефекта – уменьшение площади раны на $59,35 \pm 3,4\%$ ($p=0,018$) в период с 3-х по 5-е сутки, в сравнении с $40,05 \pm 2,9\%$ ($p=0,009$) при естественном заживлении. **Заключение.** Гнойная рана вызывает комплекс неспецифических реакций в нейронах СМУ. В динамике заживления раны нейроны с реактивными изменениями демонстрировали чаще двухфазную динамику, более выраженную для В-типа клеток с первичной реакцией на 1-е – 3-и сутки и дальнейшим переходом в регенерационную гипертрофию или деструкцию. Регенерационные изменения нейронов СМУ имели тесную корреляционную связь с процессами регенерации раневого дефекта.

Ключевые слова: гнойная рана; площадь раны; нейроны спинномозговых узлов; морфометрия; РНК; сателлитная глия

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Никитюк Д.Б., Фетисов С.О., Ключкова С.В., Алексеева Н.Т. Морфофункциональная характеристика нейронов спинномозговых узлов в динамике заживления гнойной раны // Журнал анатомии и гистопатологии. 2023. Т. 12, №4. С. 9–21. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2023-12-4-9-21>

ORIGINAL ARTICLES

Original article

Morphofunctional Characteristics of Dorsal Root Ganglion Neurons in the Dynamics of Healing of a Purulent Wound

D.B. Nikityuk^{1, 2}, S. O. Fetisov³, S.V. Klochkova⁴, N. T. Alexeeva³

¹The Federal Research Centre of Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russia

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

³N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia

⁴Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. The aim of the study is assessment of the connection between the morphological and functional state of spinal ganglia neurons and the dynamics of healing of a purulent wound in an experimental animal during its natural course and complex therapy with hydropulse sanitation (HIS) and the addition of platelet-rich blood

plasma (PRP). **Material and methods.** In an experiment on 100 white outbred rats, a purulent wound on the lateral surface of the thigh was modeled by introducing a daily culture of *Staphylococcus aureus*. Two groups were formed: natural healing and healing after therapy with hydropulse sanitation of the wound with an isotonic NaCl solution followed by the addition of platelet-enriched autoplasm. The material for the study was taken on the 1st, 3rd, 5th, 7th, 14th, and 21st days. The area of the wound and the dynamics of its healing were assessed using the planimetric method. For the study, lumbar spinal ganglia (SG) of segments L_{III}–L_V were taken. At the light-optical level, after staining with cresyl violet according to Nissl and azure B according to the S. Shea method, the area of nerve cells was measured, photometry of RNA content was carried out, and the number of satellite gliocytes was counted. The obtained data were processed using statistical analysis methods. **Results.** The healing process of a purulent skin wound ended with the formation of a scar on days 7–14 for both experimental groups. The use of GIS and PRP demonstrated better dynamics of defect closure - a reduction in wound area by $59.35 \pm 3.4\%$ ($p=0.018$) in the period from 3 to 5 days, compared with $40.05 \pm 2.9\%$ ($p=0.009$) with natural healing. The response of SG neurons during healing was characterized by pronounced polymorphism. The maximum number of cells with reactive changes during natural healing was observed on the 5th day of the experiment ($17.2 \pm 3.2\%$ for A-neurons and $36.7 \pm 4.3\%$ for B-neurons). Complex therapy led to a decrease in the proportion of both reactively altered and destructive neurons. The cell area, RNA content, and the number of satellite glia increased on average by the 7th day of the experiment. Separate close correlations were identified between the dynamics of changes in the wound area and the studied quantitative characteristics. **Conclusion.** A purulent wound causes a complex of nonspecific reactions in the neurons of the SG. In the dynamics of wound healing, neurons with reactive changes more often demonstrated biphasic dynamics, more pronounced for B-type cells with a primary reaction on days 1–3 and a further transition to regenerative hypertrophy or destruction. Regenerative changes in SG neurons had a close correlation with the processes of regeneration of the wound defect.

Keywords: purulent wound; wound area; spinal ganglion neurons; morphometry; RNA; satellite glia

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Nikityuk D.B., Fetisov S.O., Klochkova S.V., Alexeeva N.T. Morphofunctional characteristics of dorsal root ganglion neurons in the dynamics of healing of a purulent wound. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2023. V. 12, №4. P. 9–21. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2023-12-4-9-21>

Введение

Сенсорные нейроны спинномозговых узлов (СМУ) представляют собой одну из наиболее полезных моделей для изучения нейро-регенерации. При этом функциональные изменения в них могут происходить как после повреждения ствола периферического нерва, так и при патологических процессах в районе их периферических отростков. Установлено, что помимо передачи афферентной информации в вышележащие отделы нервной системы, имеется определенное влияние со стороны нейронов на иннервируемые ткани. Комплекс указанных, периферически направленных по отношению к нейронам СМУ, реакций обеспечивается за счет совокупности эффектов, обусловленных выделением ряда биологически активных веществ, поступающих в ткани с аксоплазматическим током и действующих на периферические мишени: различные популяции клеток иммунной системы, тучные клетки, клетки сосудистой стенки – структуры, принимающие участие в регенерации в том числе раневых дефектов кожных покровов. Роль уровня активности нервной системы для развития данного комплекса реакций была подтверждена в ряде экспериментальных работ, в том числе посвященных изменению процессов репарации кожных ран при денервации или повреждении спинного мозга [1, 5]. Исследования характера реактивных изменений в узлах при различных травмах и заболеваниях органов многочисленны [7, 8, 9, 11, 12, 14]. Они опираются на широкий спектр количественных характеристик – морфометрических, гистохимических, иммуногистохимических. Проведена оценка как структу-

ры нейронов, так и глиального окружения, что достаточно однозначно связывается со значительным влиянием сателлитных глиоцитов как на трофику нейронов, так и непосредственно на процессы регенерации отростков нейронов [2, 3]. Отдельный интерес представляет неоднозначность в определении связанности и созависимости процессов на периферии и состояния нейронов и нервных проводников. В части работ отмечается наличие достаточно сильных корреляционных связей между динамикой морфологических изменений и функциональным состоянием регенерирующих нервов [9, 10]. При этом другие авторы указывают на отсутствие корреляционных связей или специфическую слабую корреляцию между морфологическими характеристиками нервных проводников, их физиологией и количественными оценками экспериментальных воздействий [4, 6, 13]. Таким образом, данный вопрос остается изученным недостаточно полно, учитывая развитие и внедрение методов стимуляции регенерации и необходимость всесторонней оценки их эффективности. Одним из таких методов является использование обогащенной тромбоцитами аутоплазмы крови (ОТПК) для стимуляции регенерации покровных тканей, как самостоятельно, так и в комплексе с другими методиками.

Целью нашего исследования являлась оценка связи морфологического и функционального состояния нейронов спинномозговых узлов с динамикой заживления гнойной раны экспериментального животного при ее естественном течении и комплексной терапии гидроимпульсной санацией и внесением обогащенной тромбоцитами плазмы крови.

Материал и методы исследования

Эксперимент проведен на 100 белых беспородных крысах-самцах в возрасте 4 мес. к началу эксперимента. Для моделирования раневого процесса крысе наносили линейный разрез на передней поверхности бедра размерами 1,0×0,5 см. Гнойную рану формировали внесением суточной культуры *Staphylococcus aureus* с концентрацией 10¹⁰ микробных тел. На 2-е сутки от начала эксперимента 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. Были сформированы 2 экспериментальные группы и соответствующие им интактные (без хирургических манипуляций) группы контроля. В первой группе «ГнР» лечение ран не проводилось (n=40). Животным второй группы «ГнР+ГИС+ОТПК» однократно в начале эксперимента применяли комбинацию гидроимпульсной санации раневого дефекта (ГИС) и внесения обогащенной тромбоцитами аутоплазмы крови (ОТПК). ОТПК получали путем центрифугирования аутологической крови крысы, забранной из хвостовой вены животного. Концентратом считали плазму с содержанием тромбоцитов не менее 1 000 000 тромбоцитов на 1 микролитр плазмы. Для внесения сгустка ОТПК применяли устройство для нанесения гелеобразных лекарственных средств «УНГЛС – 01». Для осуществления ГИС раны использовали модифицированный аппарат УГОР – 1М, который способен формировать мелкодисперсный поток раствора с заданным давлением. Санацию раны осуществляли изотоническим раствором NaCl, струю направляли под углом 45° к условной поверхности дна раны. Животных выводили из эксперимента на 1-е, 3-и, 5-, 7-, 14-, 21-е сутки равными группами, включая группу контроля – животные соответствующих возрастных групп, без нанесения раны. Проводили клинические наблюдения процессов заживления экспериментальных ран. Оценивали характер воспалительной реакции, состояние краев и дна раны, сроки очищения от некротических тканей и начала грануляции и эпителизации. В качестве объективного фактора, использующегося для математического анализа, использовали изменение площади ран. Для вычисления площади на рану накладывали стерильную прозрачную пленку и наносили контур раны. Полученный рисунок переносили на миллиметровую бумагу и подсчитывали площадь раны в квадратных миллиметрах.

Для изучения реакций нервных структур иссекали поясничные спинномозговые узлы сегментов L_{III}–L_V как соответствующие зональной иннервации области нанесенной раны.

Все хирургические манипуляции по моделированию раневого процесса в соответствии с принципами биоэтики и правилами лабораторной практики выполнялись на животных под ингаляционным эфирным рауш-наркозом. Эвтаназия животных осуществлялась декапитацией после предварительной наркотизации нембуталом и транскардиальной перфузии 5% раствором формалина на фосфатном буфере (pH 7,4). Протокол эксперимента одобрен этическим комитетом ВГМУ им. Н.Н.Бурденко Минздрава от 16.04.2012 года.

Для морфометрического анализа серийные продольные срезы СМУ толщиной 6–7 мкм окрашивали крезильовым фиолетовым по методике Ниссля в модификации И.В. Викторова. Анализ клеток проводился в группе интактного контроля и двух опытных группах по следующим параметрам: площади поперечного среза клетки, площади ядра, значениям ядерно-цитоплазматического индекса (ЯЦИ). Микрофотосъемку проводили 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. С помощью дифференцированного подсчета сателлитных глиальных клеток вокруг перикарионов нейронов для каждого морфофункционального и размерного типа нервных клеток оценивали перинеурональный индекс. К сателлитам относили клетки удаленные не далее чем на диаметр их ядра от тела нейрона. Относительное содержание РНК в нейронах выявляли окрашиванием азуром В по методу S. Shea и проводили цитофотометрию.

Основываясь на бимодальном характере распределения морфометрических показателей нейронов СМУ, мы выделяли 2 основные популяции нейронов: А-клетки со светлым перикарионом и глыбчатым распределением субстанции Ниссля, поперечником более 30 мкм; В-клетки с темным перикарионом и диффузным распределением вещества Ниссля, средним поперечником меньше или равным 30 мкм [5, 14]. Внутри обеих популяций нейронов выделяли клетки без выраженных на светооптическом уровне изменений – интактные (Инт); нейроны с измененной морфологией – дезагрегацией хроматофильного вещества, вакуолизацией, пикнозом – реактивные (Реакт). Для нейронов в стадии необратимой деструкции («Дестр.») измерения не проводили. Статистический анализ проведен с помощью компьютерной программы Statistica 10.0. Для оценки характера распределения использовались графический метод построения гистограмм и критерии Колмогорова–Смирнова и Лилиенфорса. Результаты

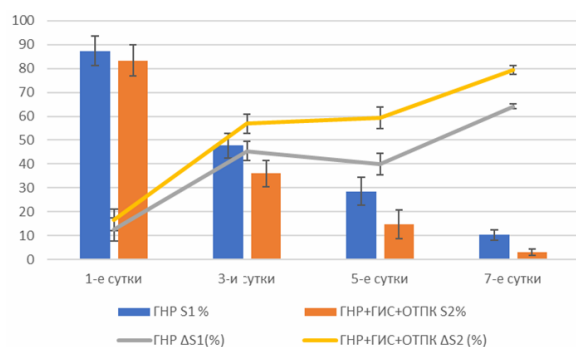


Рис. 1. Динамика изменения площади раны. Столбцы – изменение площади относительно начального размера раны, в %; кривые – относительное изменение площади между точками взятия материала, в %. «ГНР» – гнойные раны без лечения, «ГНР+ГИС+ОТПК» – гнойные раны с комплексным применением гидрои импульсной санации и внесением обогащенной тромбоцитами аутоплазмы крови. Fig. 1. Dynamics of changes in the area of the wound. Columns – the changes in area relative to the initial size of the wound, in %; curves – the relative change in the area between the points of material intake, in %. "GHP" – purulent wounds without treatment, "GHP+GIS+OTPK" – purulent wounds with the complex use of hydraulic pulse sanitation and the introduction of PRP.

подсчета нормально распределенных показателей представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее значение исследуемого показателя при $n=7 \times 30$, (n – количество измерений, 7 – количество животных в каждой группе, 30 – минимальное количество нейронов подвергнутых измерению), σ – стандартное отклонение; при распределении отличном от нормального определяли медиану и межквартильный размах. Межгрупповые сравнения выполнялись как с помощью параметрического t -критерия Стьюдента, так и непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. В качестве критерия, отражающего интенсивность взаимосвязей изучаемых характеристик нервных клеток и динамики заживления раны, на основании изменения площади, применяли непараметрический критерий – коэффициент ранговой корреляции Спирмена, в качестве дополнительного категориального предиктора использовали сроки взятия материала. Достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Клиническая картина заживления характеризовалась различием в скорости протекания воспалительных и регенераторных процессов для двух экспериментальных групп. Так смена фаз гидратации и дегидратации в случае применения ГИС и ОТПК происходила в среднем на 2-е сутки, в сравнении с естественным течением, где данные процессы отмечались к 3-м суткам течения раневого процесса. Очистка раны и начало репаративных яв-

лений отмечались на 3-и – 5-е сутки, для группы с комплексным лечением эти процессы происходили быстрее, опережая естественное заживление в среднем на 1 день. На 7-е сутки, в обеих экспериментальных группах раневой дефект полностью заполнялся грануляционной тканью с выраженными явлениями эпителизации.

Для получения количественного эквивалента динамики заживления раны использовали площадь раны – объективный показатель процесса регенерации. Средняя площадь раны перед началом лечения составляла $50,03 \pm 0,04$ мм². Для определения динамики процесса вычисляли показатель относительного уменьшения площади раны между измерениями ΔS , вычисляемый по формуле $\Delta S = 100\% - ((S_{n+1} \times 100\%) / S_n)$. Где S – площадь раны, n – срок забора материала. К исходу первых суток уменьшение площади раны при естественном заживлении составило $12,6 \pm 1,3\%$ ($p=0,083$). При этом во второй группе, за счет эффекта гидрои импульсной обработки раны, способствующей эффективному вымыванию некротизированных тканей и микробных тел и, соответственно, более раннему купированию воспаления, площадь уменьшилась на $16,6 \pm 0,9\%$ ($p=0,037$). В период с 1-х по 3-и сутки отмечалось ускорение динамики заживления в обеих экспериментальных группах до $45,5 \pm 2,8\%$ ($p=0,012$) при естественном заживлении, и до $56,9 \pm 3,1\%$ ($p=0,022$) – при применении комплексного лечения. Следующий период (3-и – 5-е сутки), при продолжающемся уменьшении площади ран, отличался снижением динамики процесса для естественного течения до $40,05 \pm 2,9\%$ ($p=0,009$) и незначительным приростом во второй группе, до $59,35 \pm 3,4\%$ ($p=0,018$). К 7-м суткам скорость уменьшения площади ран значительно возрастала, достигнув $79,4 \pm 1,8\%$ ($p=0,021$) при применении комплексной терапии (рис. 1). На 14-е сутки эксперимента окончательно формировался рубец, так как глубина раневого дефекта превышала уровень сосочкового слоя кожи.

При морфологической характеристике реакций нейронов СМУ следует отметить функциональные перестройки, выражающиеся в возникновении измененных нервных клеток, дальнейшем нарастании их количества с частичным переходом в деструкцию, что приводило к значительным сдвигам в соотношении морфофункциональных типов нейронов. Так при гнойном течении раневого процесса в случае естественного заживления отмечалось постепенное снижение долей интактных нейронов: для А-нейронов с 29,9% на 1-е сут до 15,9% на 7-е сут ($p>0,05$); для В-нейронов с 54,1% на 1-е сут до 23,1% на 14-е сутки ($p<0,05$). К окончанию эксперимента доля интактных нейронов проявляла тенденцию к восстановлению. Так на 21-е сут количество интактных нейронов А-типа

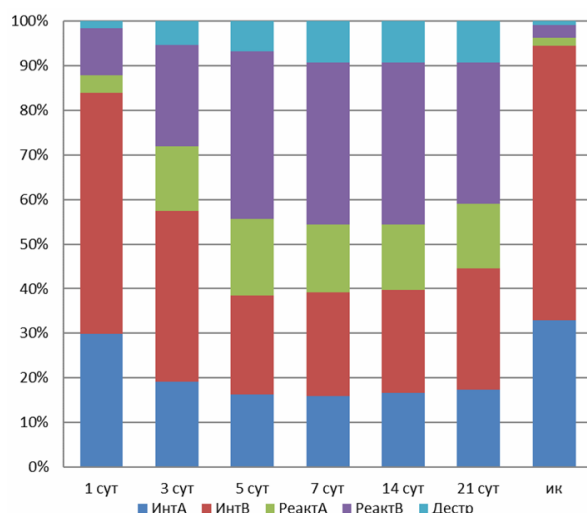


Рис. 2. Соотношение долей интактных и измененных нейронов обеих размерных популяций при естественном заживлении инфицированной раны. Ось абсцисс: сроки забора материала; ось ординат: доля в процентах изучаемых подтипов клеток. "ИнтА" – доля неизмененных (интактных) нейронов А-типа; "ИнтВ" – доля неизмененных (интактных) нейронов В-типа; "РеактА" – доля нейронов А-типа с признаками реактивных изменений; "РеактВ" – доля нейронов В-типа с признаками реактивных изменений; "Дестр" – суммарная доля нейронов обеих популяций с необратимыми деструктивными изменениями; "ик" – группа интактного контроля. Данные представлены – среднее арифметическое для $n=210$.

Fig.2 The ratio of the proportions of intact and altered neurons of both size populations during the natural healing of an infected wound. The abscissa axis: the timing of material collection; the ordinate axis: the percentage of cell subtypes. "IntA" – the proportion of unchanged (intact) A-type neurons; "IntB" – the proportion of unchanged (intact) B-type neurons; "ReactA" – the proportion of A-type neurons with signs of reactive changes; "ReactB" – the proportion of B-type neurons with signs of reactive changes; "Destr" is the total proportion of neurons in both populations with irreversible destructive changes; "ic" is the intact control group

составляло 17,4%, В-типа – увеличивалось до 27,1%. Соответственно вышеописанным сдвигам нарастало число нейронов с признаками реактивных изменений. На 1-е сутки отмечались преобладающие явления центрального хроматолиза, более выраженные для малых В-нейронов – 10,6% клеток ($p<0,05$), доля измененных А-клеток в этом сроке была незначительной и составляла 3,9% от всего числа оцененных клеток СМУ. С 3-х по 5-е сутки был зафиксирован активный рост доли измененных нейронов, среди которых возникали клетки с тотальным хроматолизом, явлениями эктопии ядра и различными пикнотическими изменениями (рис. 2). В максимуме на 5-е сутки доля измененных А-нейронов составляла 17,2%, В-нейронов – 37,6% соответственно (по отношению к контролю $p<0,05$).

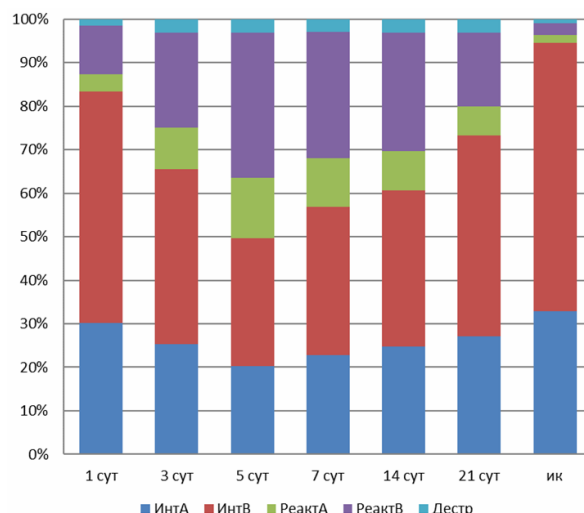


Рис.3. Соотношение долей интактных и измененных нейронов обеих размерных популяций при комплексном применении ГИС и ОТПК для терапии инфицированной раны в зоне иннервации СМУ. Ось абсцисс: сроки забора материала; ось ординат: доля в процентах изучаемых подтипов клеток. "ИнтА" – доля неизмененных (интактных) нейронов А-типа; "ИнтВ" – доля неизмененных (интактных) нейронов В-типа; "РеактА" – доля нейронов А-типа с признаками реактивных изменений; "РеактВ" – доля нейронов В-типа с признаками реактивных изменений; "Дестр" – суммарная доля нейронов обеих популяций с необратимыми деструктивными изменениями; "ик" – группа интактного контроля. Данные представлены – среднее арифметическое для $n=210$.

Fig.3. The ratio of the proportions of intact and altered neurons of both size populations with the combined use of hydraulic pulse sanitation and PRP for the treatment of a purulent wound in the innervation zone of DRG. The abscissa axis: the timing of material collection; the ordinate axis: the percentage of cell subtypes. "IntA" – the proportion of unchanged (intact) A-type neurons; "IntB" – the proportion of unchanged (intact) B-type neurons; "ReactA" – the proportion of A-type neurons with signs of reactive changes; "ReactB" – the proportion of B-type neurons with signs of reactive changes; "Destr" is the total proportion of neurons in both populations with irreversible destructive changes; "ic" is the intact control group

В продолжении эксперимента доля измененных А-нейронов незначительно снижалась к 21-м суткам до 14,5% ($p>0,05$), В-клетки продемонстрировали более значительное снижение с 36,3% на 14-е сутки до 31,8% на 21-е сутки ($p<0,05$). Однако в целом необходимо отметить, что к окончанию эксперимента в данной экспериментальной группе доля измененных клеток была достаточно большой. Отдельный интерес вызывало нарастание с 3-х суток доли погибающих нейронов, которая продолжала оставаться на уровне 9,2% вплоть до окончания эксперимента (по отношению к контролю $p<0,05$).

Комплексное применение ГИС и ТК продемонстрировало отличный от естественного заживления характер. Схожий рост количества измененных клеток наблюдался

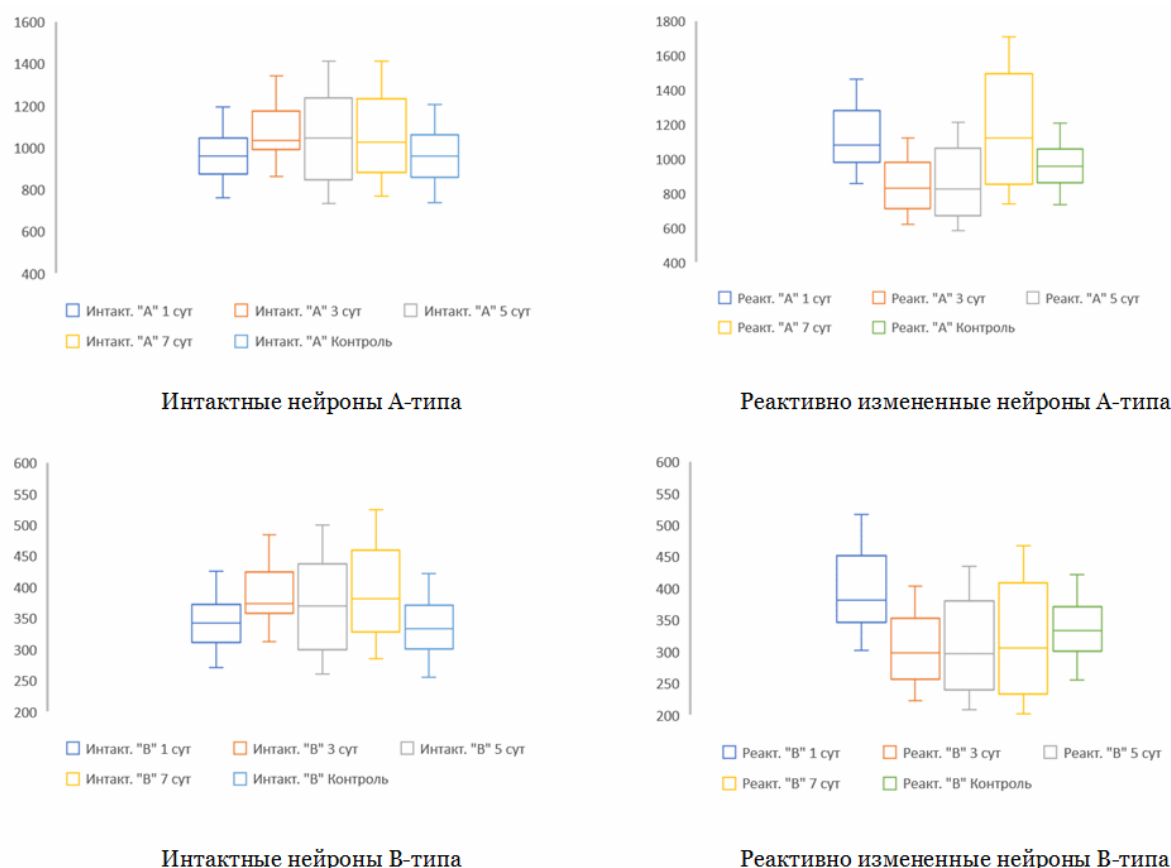


Рис. 4. Динамика площади среза нейронов СМУ без изменения тинкториальных свойств (Инт) и с признаками реактивных реакций (Реакт) для двух субпопуляций при спонтанном заживлении гнойной раны. Ось абсцисс – сроки взятия материала; ось ординат – площадь в μm^2 . Данные представлены – медиана и межквартильный размах; планки погрешностей – «min – max».

Fig. 4. Dynamics of changes in the cross-section area of DRG neurons without changes in tinctorial properties (Int) and with signs of reactive reactions (Peakm) for two subpopulations during spontaneous healing of a purulent wound. The abscissa axis – time of material intake; the ordinate axis – the area, μm^2 . The data are presented – median and interquartile range; error bars – "min – max".

лишь на протяжении первых 5 суток эксперимента. При этом надо отметить, что при максимальном показателе доли измененных А- и В-нейронов на 5-е сутки 13,8% и 33,4% соответственно ($p < 0,05$), среди них преобладали клетки с компенсаторными реакциями, пикнотические изменения были выражены слабее. В подтверждение этого можно отметить значительно менее выраженную деструкцию: максимальное количество таких клеток отмечалось на 21-е сутки и составило всего лишь 3,1% от общего количества нейронов ($p > 0,05$). А также достоверное по отношению ко всем остальным группам снижение доли обратимо измененных нейронов на 21-е сутки эксперимента: 6,8% и 16,8% для А- и В-нейронов соответственно (рис. 3).

Для оценки корреляционных связей количественных показателей и скорости заживления раны, вследствие полного закрытия раневого дефекта к 14-м суткам и перехода планиметрических характеристик раны к гистоморфологической характеристике рубца, нами был выбран период с 1-х по 7-е сутки эксперимента.

Результаты измерений планиметрических характеристик нейронов суммарно отра-

жали преобладающие на различных этапах неспецифические изменения тинкториальных свойств нейронов обеих субпопуляций. Для интактных нейронов, не демонстрирующих проявлений клеточной дистрофии, была характерна динамика увеличения размера клеточного тела с выходом на максимальные значения в пике регенерационных процессов в раневом дефекте. Для реактивных нейронов была свойственна нелинейная динамика изменения площади в случае естественного заживления. Большая часть реактивных нейронов двух подтипов демонстрировала быстрый рост на 1-е сутки, на стадии первичного раздражения, который сменялся уменьшением площади, с возможностью перехода к сморщиванию (рис. 4). В дальнейшем большая часть нейронов переходила к повторному увеличению размеров и восстановлению полноценной функциональной активности. Однако в случае спонтанного течения гнойного процесса остановка роста размеров могла смениться тенденцией к снижению размеров не только к уровню интактных животных, но и ниже него, соответствуя пикнотическим изменениям, что проявлялось в значительном увеличении диапазона значений площади к

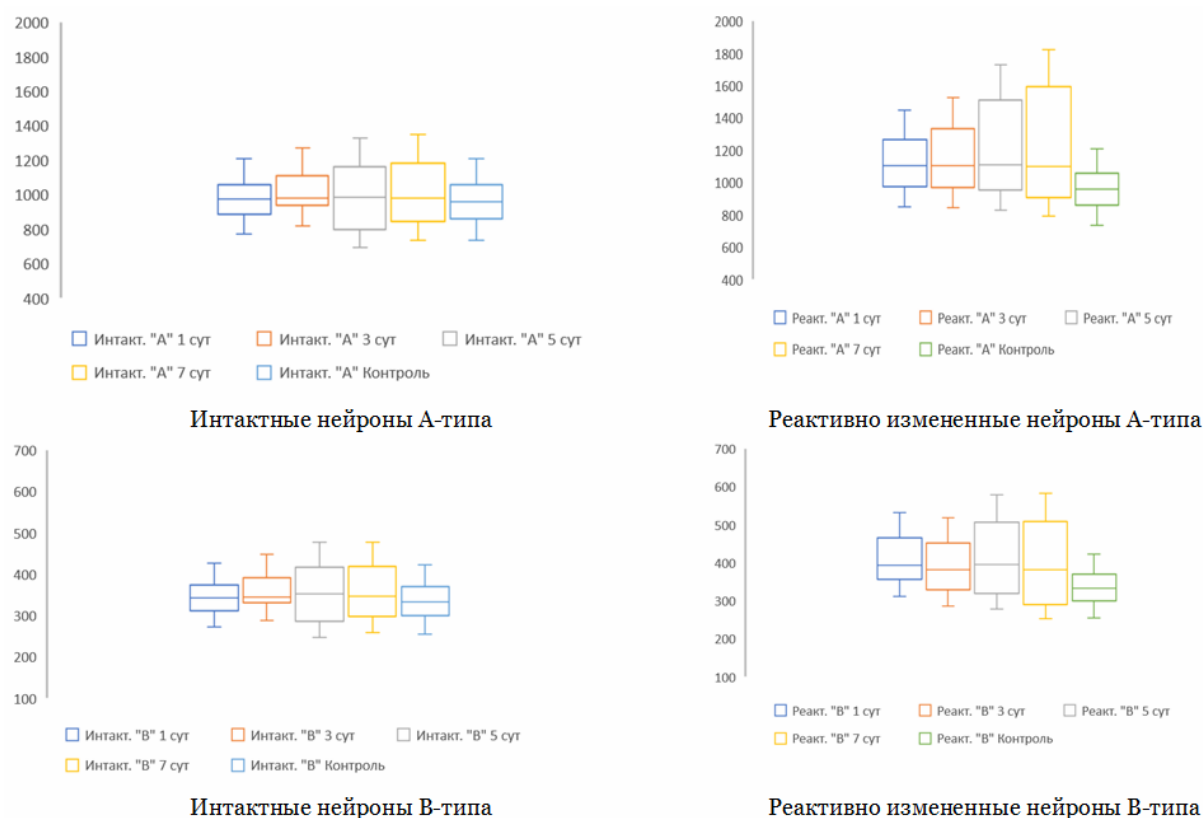


Рис. 5. Динамика площади среза нейронов СМУ без изменения тинкториальных свойств (Инт) и с признаками реактивных реакций (Реакт) для двух субпопуляций при комплексной терапии гнойной раны. Ось абсцисс – сроки взятия материала; ось ординат – площадь в $\mu\text{м}^2$. Данные представлены – медиана и межквартильный размах; планки погрешностей – «min – max».

Fig. 5. Dynamics of changes in the cross-section area of DRG neurons without changes in tinctorial properties (Инт) and with signs of reactive reactions (Реакт) for two subpopulations in the complex therapy of a purulent wound. The abscissa axis – time of material intake; the ordinate axis – area, μm^2 . The data are presented – median and interquartile range; error bars – "min – max".

7-м суткам эксперимента. Причем с такой динамикой отмечались и интактные, по всем признакам нейроны. В случае применения комплексной терапии изменение размеров клеточных тел демонстрировало более линейный характер и меньшую долю пикнотически измененных нейронов, в особенности в период с 3-х по 5-е сутки (рис. 5).

Корреляционный анализ, проведенный для установления связи между изменениями размеров нервных клеток и динамикой заживления раны, продемонстрировал полиморфный характер корреляционных связей. Сильная корреляция отмечалась на 1-е сутки эксперимента, что может быть объяснено динамическими изменениями нейронов при первичном раздражении. Преобладание в дальнейшем отрицательных корреляций возможно свидетельствовало о сильном увеличении полиморфизма в популяции нейронов СМУ и наличии временного сдвига: нарастание регенерационной гипертрофии запаздывало по отношению к регенерационным процессам в ране, являясь их следствием, а не причиной (табл. 1).

При изучении активности гистохимических маркеров белковосинтетической активности при отсутствии лечения в интактных

А-нейронах максимальное значение оптической плотности РНК в рассматриваемом временном периоде выявлялось к 7-м суткам. При этом реактивные субпопуляции нейронов А- и В-типов демонстрировали двухфазный процесс роста: первый этап – 1-е – 3-и сутки, второй – 5–7-е сутки. Для А-нейронов первый этап характеризовался незначительным ростом содержания РНК, второй этап – резким ростом, с одновременным увеличением полиморфизма выборки. Это можно объяснить тем, что нанесенная рана приводила к прямому повреждению отростков лишь для части клеток ганглия, другая часть при этом характеризовалась лишь компенсаторной функциональной реакцией. Для реактивно измененных В-нейронов первая фаза характеризовалась снижением оптической плотности РНК ниже контрольных значений и соответствовала хроматолитической реакции. Вторая фаза – резкий рост показателя с вовлечением почти всей совокупности клеток и переходом их в гиперхромное состояние (рис. 6). Сочетанное применение ОТПК и ГИС, при схожей для А-клеток картине, для малых В-нейронов демонстрировало снижение хроматолитических реакций на первом этапе. Так на 3-и сутки оптическая плотность РНК уже превышала как

Таблица 1 / Table 1

Значение коэффициента корреляции «rs» при попарном анализе площади нейрона и динамики уменьшения площади раны
The value of the correlation coefficient "rs" in the pairwise analysis of the neuron area and the dynamics of the reduction of the wound area

Тип течения раневого процесса	Размерная группа	Тип нейронов	Коэффициент корреляции "rs" Площадь нейрона/ ΔS (%)			
			1-е сут	3-е сут	5-е сут	7-е сут
ГНР	А-тип	Интакт	0,6754	0,7873	0,2728	0,2615
		Реакт	0,7511	-0,2256	0,6808	0,9065
	В-тип	Интакт	0,6229	0,7742	0,2617	0,2513
		Реакт	0,7375	-0,2101	0,6315	0,7697
ГНР ГИС+ОТПК	А-тип	Интакт	0,8643	0,6161	-0,2978	-0,4571
		Реакт	0,5647	-0,8587	-0,2920	-0,1405
	В-тип	Интакт	0,8899	-0,4731	-0,6102	-0,5706
		Реакт	0,9474	-0,9266	0,8983	-0,3411

Примечание: жирным шрифтом выделены сильные корреляционные связи для n=210.



Рис. 6. Оптическая плотность РНК в субпопуляциях нейронов СМУ при спонтанном заживлении гнойной раны. Ось абсцисс – сроки взятия материала; ось ординат – значение оптической плотности в усл. ед. Данные представлены – медиана и межквартильный размах; планки погрешностей – «min – max».

Fig. 6. Optical density of RNA in subpopulations of DRG neurons during spontaneous healing of a purulent wound. The abscissa axis – time of material intake; the ordinate axis – optical density value in conventional units. The data are presented – median and interquartile range; error bars – "min – max".

показатели интактного контроля, так и естественного заживления на данном сроке (рис. 7).

Корреляционный анализ в данном случае закономерно продемонстрировал связь динамики заживления и содержания РНК в реактивно измененных нейронах, выраженную для обеих субпопуляций во всех экспериментальных группах. Сильная корреляция отмечалась с 5-х суток эксперимента, а при комплексной терапии, для В-типа нейронов – уже с 3-х суток (табл. 2).

При оценке глиального окружения следует отметить тенденцию соответствия численности сателлитных глиоцитов и функциональной активности нейронов. Оценка динамики перинейронального индекса на фоне раневого процесса продемонстрировала преимущественный рост числа сателлитов для реактивной популяции нейронов: при спонтанном заживлении для А- и В-типов, при применении терапии в большей степени для В-типа. При этом для субпопуляции реактивных В-нейронов отмечалось формирование характерной кривой с локальным

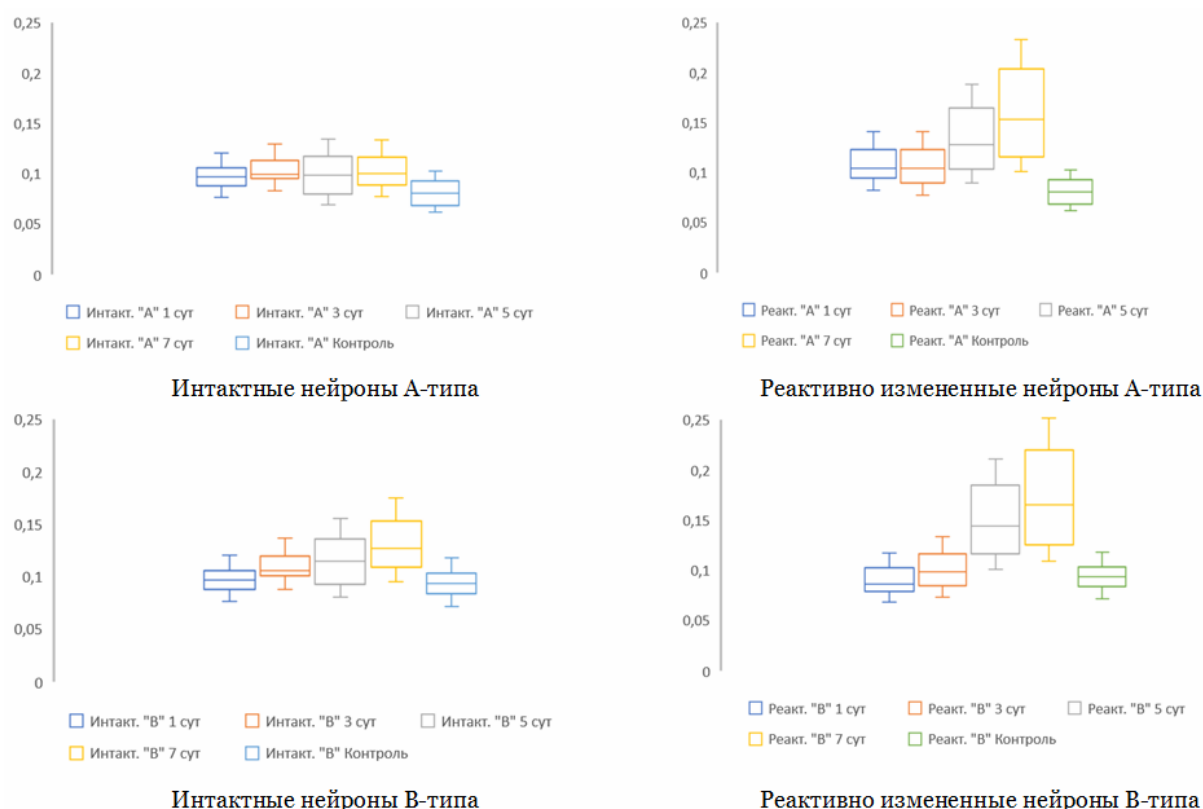


Рис. 7. Оптическая плотность РНК в субпопуляциях нейронов СМУ при комплексном применении ГИС и ОТПК для терапии гнойного раневого процесса в зоне иннервации. Ось абсцисс – сроки взятия материала; ось ординат – значение оптической плотности в усл. ед. Данные представлены – медиана и межквартильный размах; планки погрешностей – «min – max».

Fig. 7. Optical density of RNA in DRG neuron subpopulations with the combined use of hydraulic pulse sanitation and PRP for the treatment of purulent wound process in the innervation zone. The abscissa axis – time of material intake; the ordinate axis – optical density value in conventional units. The data are presented – median and interquartile range; error bars – "min – max".

Таблица 2/ Table 2

Значение коэффициента корреляции «rs» при попарном анализе оптической плотности РНК и динамики уменьшения площади раны
The value of the correlation coefficient "rs" in the pairwise analysis of the optical density of RNA and the dynamics of the reduction of the wound area

Тип течения раневого процесса	Размерная группа	Тип нейрона	Коэффициент корреляции "rs" РНК/ ΔS (%)			
			1-е сут	3-и сут	5-е сут	7-е сут
ГНР	А-тип	Интакт	0,2623	0,1743	0,4669	0,2991
		Реакт	0,2877	0,3905	0,8192	0,8614
	В-тип	Интакт	0,2830	0,2211	0,4566	0,4485
		Реакт	0,2242	-0,4313	0,8312	0,9431
ГНР ГИС+ОТПК	А-тип	Интакт	0,6106	0,6428	0,3093	-0,2788
		Реакт	0,2378	-0,3748	0,7831	0,8626
	В-тип	Интакт	0,2918	0,3888	0,4040	0,5075
		Реакт	0,1853	0,7126	0,7687	0,9142

Примечание: жирным шрифтом выделены сильные корреляционные связи для n=210.

минимумом на 7-е сутки в группе с естественным заживлением. Значительное снижение числа сателлитов на этом сроке по всей видимости являлось следствием, с одной стороны процессов миграции сателлитных глиоцитов, с другой – может быть объяснено с позиции, что вследствие изменения метаболического статуса таких нейронов их способность окрашиваться резко снизилась и реальное количество было подсчитано неверно (рис. 8). Данная особенность не наблюдалась в случае применения терапии, однако отмечался спе-

цифический максимум на 1-е сутки эксперимента для реактивно измененных В-клеток. Так же можно отметить в целом меньший разброс перинеуронального индекса в случае применения комплексной терапии (рис. 9).

При оценке корреляции между числом сателлитной глии и динамикой заживления раны нужно отметить, что нарастание числа сателлитов соответствует как увеличению трофики нейрона, так и процессам нейронной дегенерации. Известно, что в заключительной стадии своей гибели нейроны фагоцитируют-

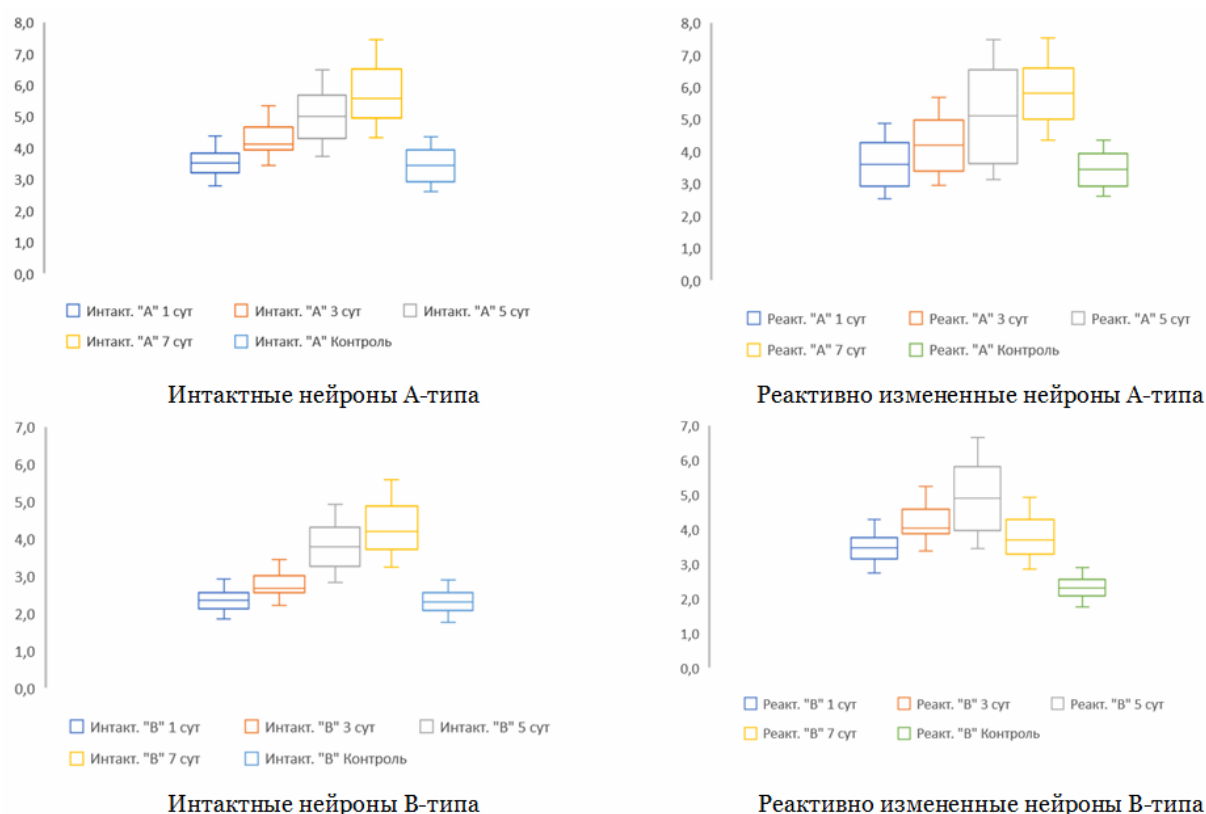


Рис. 8. Перинейрональный индекс нейронов СМУ при естественном заживлении гнойной раны в зоне иннервации. Ось абсцисс – сроки забора материала; ось ординат – количество сателлитных глиоцитов на один нейрон, ед. Данные представлены – медиана и межквартильный размах; планки погрешностей – «min–max».

Fig. 8. The perineuronal index of DRG neurons during the natural healing of a purulent wound in the innervation zone. The abscissa axis – time of material collection; the ordinate axis – number of satellite gliocytes per neuron, units. The data are presented – median and interquartile range; error bars – "min – max"

Таблица 3 /Table. 3

Значение коэффициента корреляции «rs» при попарном анализе количества сателлитной глии и динамики уменьшения площади раны
The value of the correlation coefficient "rs" in the pairwise analysis of the amount of satellite glia and the dynamics of the reduction of the wound area

Тип течения раневого процесса	Размерная группа	Тип нейронов	Коэффициент корреляции "rs" Сателлитная глиа/ ΔS (%)			
			1-е сут	3-и сут	5-е сут	7-е сут
ГНР	А-тип	Интakт	0,5873	0,6747	0,4559	0,8466
		Реакт	0,6121	0,6334	0,7250	0,8668
ГНР	В-тип	Интakт	0,5767	0,6534	0,8768	0,7632
		Реакт	0,1253	0,6512	0,7494	0,7960
ГНР ГИС+ОТПК	А-тип	Интakт	0,5782	0,4142	0,2531	0,4529
		Реакт	0,5014	0,7320	0,7145	-0,3261
	В-тип	Интakт	0,4690	0,4872	0,3921	0,4968
		Реакт	0,4473	0,8497	0,8319	0,4533

Примечание: жирным шрифтом выделены сильные корреляционные связи для n=210.

ся клетками-сателлитами, поэтому функционирование клеток-сателлитов не всегда направлено на поддержание выживания нейрона. В целом, можно отметить достаточно высокий уровень корреляционных связей числа сателлитов с динамикой заживления раны, что легко объясняется относительной линейностью и сонаправленностью этих процессов. При этом, в группе с комплексной терапией раны, тесные корреляционные связи выявлялись преимущественно для реактивно измененных нейронов обеих субпопуляций на 3-и – 5-к сутки эксперимента. При естественном

течении раневого процесса корреляции достигали максимальных значений на 5–7-е сутки, включая при этом и окружение интактных нейронов, что соответствует более высокому количеству сателлитов в этой группе (табл. 3).

Морфологическая оценка изменений в нейронах СМУ на фоне раневого процесса демонстрировала общую тенденцию изменения тинкториальных свойств и динамики размеров нейронов, имеющую, по всей видимости, связь со стадиями раневого процесса. Качественно эти изменения обладали схожими

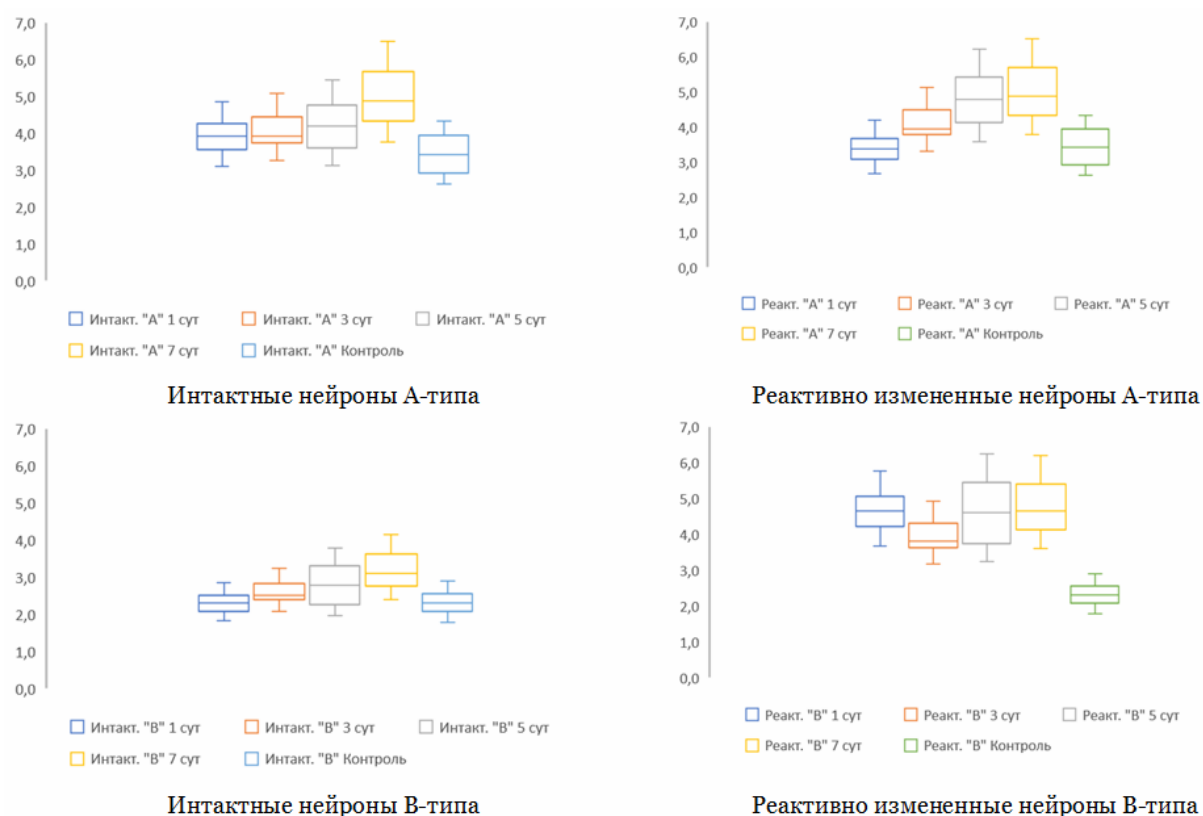


Рис. 9. Перинеурональный индекс нейронов СМУ при комплексном применении ГИС и ОТПК для терапии гнойной раны в зоне иннервации. Ось абсцисс – сроки взятия материала; ось ординат – количество сателлитных глиоцитов на один нейрон, ед. Данные представлены – медиана и межквартильный размах; планки погрешностей – «min – max».

Fig. 9. The perineuronal index of DRG neurons in the combined use of hydraulic pulse sanitation and PRP for the treatment of a purulent wound in the innervation zone. The abscissa axis – time of material collection; the ordinate axis – number of satellite gliocytes per neuron, units. The data are presented – median and interquartile range; error bars – "min – max".

свойствами с реакциями нейронов в экспериментах с прямой травмой нервов вследствие перерезки или раздавливания [4, 5]. Так 1-е сутки после ранения характеризовались явлениями первичного раздражения нейронов, вследствие как повреждения их периферических отростков, так и повышенной афферентной импульсации из зоны раневого дефекта. Для одной части нейронов это выражалось в увеличении их размеров, без изменения тинкториальных свойств, и отражало их повышенную активность в ответ на массивное раздражение [5, 14]. Для другой части клеток, чьи отростки оказались непосредственно поврежденными в раневом дефекте, явления первичного раздражения дополнялись первыми проявлениями дистрофических реакций в виде локального или центрального хроматолиза. На протяжении воспалительной фазы в раневом дефекте нейроны с неповрежденными отростками продолжали компенсаторно увеличивать свои размеры. Для поврежденных клеток в этот период было свойственно все разнообразие проявлений дистрофии в нервной ткани. Часть таких нейронов, исчерпав потенциальную к регенерации, входила в стадию острого набухания и тотальных хроматолических реакций, увеличивалась в размерах,

вследствие диссоциации тигроида бледнела и в большинстве случаев с течением времени переходила в стадию лизиса, сопровождающуюся разрушением мембранных структур ядра и перикариона. Отмечено, что такая реакция в большей степени была свойственна крупным А-нейронам. Другой путь подразумевал длительный период повышенной функциональной активности, сопровождавшийся усилением базофилии с формированием гиперхромной окраски и часто конформационными нарушениями клеточного тела – нейронопикноза. Данный тип реакций в значительной степени был свойственен популяции реактивных В-нейронов. Параллельно закрытию раневого дефекта, нейроны полностью или частично утратившие связь с органами-мишенями разделялись на две группы: для части из них процесс регенерации поврежденных окончаний проходил успешно, такие нейроны сохраняли повышенную базофилию и увеличивались в размерах, сглаживая свои контуры; нейроны, не восстановившие связи с иннервируемыми ими тканями приобретали крайне интенсивную окраску и, по всей видимости, погибали по механизму коагуляционного нейроннекроза. На этом фоне анализ количественных морфометрических

характеристик для интактных субпопуляций показал однофазный рост показателей, с максимумами в пике регенерации на 7-е сут, и двухфазный – для реактивных субпопуляций: первый максимум на 1-е сутки – фаза первичного раздражения и второй, на 7–14-е сутки – пик регенераторных процессов. Наблюдавшиеся изменения, в той или иной степени, коррелировали с показателями синтетической активности нервных клеток, измеряемыми по оптической плотности продуктов реакции на РНК. Применение комплексной терапии – гидроимпульсой санации раны и внесения ОТПК характеризовалось качественно сходными реакциями. Однако количественная оценка демонстрировала уменьшение уровня проявлений первичного раздражения на начальных сроках и увеличение скорости компенсаторных реакций, выражавшееся в сдвиге на более ранние сроки пиков морфологических и гистохимических характеристик.

Исследование корреляций между изменением состояния нервных проводников при различных воздействиях в литературных источниках чаще носит характер попытки установления корреляции между характеристиками структуры периферической части нерва и его функциональной оценкой. Результаты этих исследований демонстрируют наличие тесных корреляционных связей лишь для некоторых показателей, чаще функциональных, чем морфометрических [4, 6, 13]. Проведенный корреляционный анализ показателей нейронов СМУ и динамики заживления в нашем эксперименте также продемонстрировал наличие значимых корреляций лишь для отдельных этапов заживления раны, как для морфометрических показателей, так и для гистометаболических показателей. В среднем более сильные корреляционные связи закономерно отмечались для реактивно измененных нервных клеток. Причиной низкой корреляции в других случаях, по всей видимости, можно считать временной сдвиг реакций непосредственно тел нейронов при наличии динамических процессов в районе их периферических отростков и наличие двухфазных изменений морфо-функциональных свойств, на фоне практически линейного процесса регенерации раневого дефекта.

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что гнойная рана вызывает комплекс неспецифических реакций в нейронах соответствующих ипсилатеральных спинномозговых узлов, включающий образование нескольких популяций нервных клеток: относительно неизмененных, реактивно измененных и в стадии деструкции. На протяжении заживления раны реактивно измененные нейроны демонстрировали чаще двухфазную динамику, более выраженную для В-типа кле-

ток – первичная реакция на 1-е – 3-и сутки с дальнейшим переходом в регенерационную гипертрофию или деструкцию. Регенерационные изменения в этом случае могут иметь тесную корреляционную связь с процессами восстановления раневого дефекта.

Список источников / References

1. Attwell CL, van Zwieten M, Verhaagen J, Mason MRJ. The Dorsal Column Lesion Model of Spinal Cord Injury and Its Use in Deciphering the Neuron-Intrinsic Injury Response. *Developmental Neurobiology*. 2018 May 11;78(10):926–51. doi: 10.1002/dneu.22601
2. Avraham O, Deng PY, Jones S, Kuruvilla R, Semenov CF, Klyachko VA, et al. Satellite glial cells promote regenerative growth in sensory neurons. *Nature Communications*. 2020 Sep 29;11(1):4891. doi: 10.1038/s41467-020-18642-y
3. Avraham O, Feng R, Ewan EE, Rustenhoven J, Zhao G, Cavalli V. Profiling sensory neuron microenvironment after peripheral and central axon injury reveals key pathways for neural repair. *eLife*. 2021 Sep 29;10. doi: 10.7554/eLife.68457
4. Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery*. 1989;10(3):220–5. doi: 10.1002/micr.1920100316
5. Donnerer J. Regeneration of Primary Sensory Neurons. *Pharmacology*. 2003;67(4):169–81. doi: 10.1159/000068405
6. Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic Function Index, Nerve Conduction Tests, Muscle Contraction, and Axon Morphometry as Indicators of Regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1996 Dec 1;98(7):1264–71. doi: 10.1097/00006534-199612000-00023
7. Mahar M, Cavalli V. Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018 Apr 17;19(6):323–37. doi: 10.1038/s41583-018-0001-8
8. Malushte TS, Kerns JM, Huang CC, Shott S, Safanda J, Gonzalez M. Assessment of recovery following a novel partial nerve lesion in a rat model. *Muscle & Nerve*. 2004 Oct 19;30(5):609–17. doi: 10.1002/mus.20152
9. Martins RS, Siqueira MG, Silva CF da, Plese JPP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2006 Sep;64(3b):750–6. doi: 10.1590/s0004-282x2006000500010
10. Shen N, Zhu J. Application of sciatic functional index in nerve functional assessment. *Microsurgery*. 1995;16(8):552–5. doi: 10.1002/micr.1920160809
11. Teng FYH, Tang BL. Axonal regeneration in adult CNS neurons signaling molecules and pathways. *Journal of Neurochemistry*. 2006 Mar;96(6):1501–8. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03663.x
12. Tran AP, Warren PM, Silver J. The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. *Physiological Reviews*. 2018 Apr;98(2):881–917. doi: 10.1152/physrev.00017.2017

13. Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabrita AMS. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *Journal of Neuroscience Methods*. 2001 Jul;108(1):1–9. doi: 10.1016/S0165-0270(01)00378-8
14. Welin D, Novikova LN, Wiberg M, Kellerth JO, Novikov LN. Survival and regeneration of cutaneous and muscular afferent neurons after peripheral nerve injury in adult rats. *Experimental Brain Research*. 2007 Dec 5;186(2):315–2. doi: 10.1007/s00221-007-1232-5

Информация об авторах

✉ Фетисов Сергей Олегович – канд. биол. наук, ассистент кафедры нормальной анатомии человека Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко; ул. Студенческая, 10, Воронеж, 394036, Россия; fetisovbiol@yandex.ru

Алексеева Наталья Тимофеевна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой нормальной анатомии человека Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко; alexeevant@list.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1510-8543>

Клочкова Светлана Валерьевна – д-р мед. наук, профессор кафедры анатомии человека Российского университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы; swetlana.chava@yandex.ru;

<https://orcid.org/0000-0003-2041-7607>

Никитюк Дмитрий Борисович – д-р мед. наук, профессор, акад. РАН, директор ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи; dimitrynik@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2259-1222>

Information about the authors

✉ Sergei O. Fetisov – Cand. Sci. (Biol.), teaching assistant of human anatomy department of N.N. Burdenko Voronezh State Medical University; ul. Studencheskaya, 10, Voronezh, 394036, Russia;

fetisovbiol@yandex.ru

Nataliya T. Alexeeva – Doct. Sci. (Med.), Prof.; head of human anatomy department of N.N. Burdenko Voronezh State Medical University;

alexeevant@list.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1510-8543>

Svetlana V. Klochkova – Doct. Sci. (Med.), Professor of human anatomy department of Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia; swetlana.chava@yandex.ru;

<https://orcid.org/0000-0003-2041-7607>

Dmitrii B. Nikityuk – Doct. Sci. (Med.), Professor, Acad. of RAS, head of Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety; dimitrynik@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2259-1222>

Статья поступила в редакцию 28.08.2023; одобрена после рецензирования 20.11.2023; принята к публикации 26.09.2023.
Submitted 28.08.2023; Revised 20.11.2023; Accepted 26.09.2023.