

# СОСТОЯНИЕ САТЕЛЛИТНОЙ ГЛИИ НЕЙРОНОВ СПИННОМОЗГОВЫХ УЗЛОВ ПРИ РАНЕВОМ ДЕФЕКТЕ ТКАНЕЙ В ОБЛАСТИ ИХ ИННЕРВАЦИИ

\*Фетисов С. О.<sup>1</sup>, Никитюк И. Б.<sup>2</sup>, Алексеева Н. Т.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра нормальной анатомии человека

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

<sup>2</sup>Кафедра анатомии человека

Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

\*Corresponding author: fetisovbiol@yandex.ru

## Abstract

### CONDITION OF SATELLITE GLIAL SURROUNDINGS OF DORSAL ROOT GANGLION NEURONS WITH THE WOUND TISSUE DEFECT IN THEIR AREA OF INNERVATION

**Background:** The article shows the results of research about the morphological state of glial environment of dorsal root ganglion neurons in the process of healing the purulent wound in the area of their innervation. The experimental factors used in wound therapy are readjustment hydropressive sanitation and injection of platelet concentrate.

**Material and methods:** The experiment was carried at 160 white male rats using classical histological techniques. Animals were distributed into 5 experimental groups: control, selective (both) and comprehensive application of the experimental therapeutic factors

**Results:** Increase in the number of satellite cells is registered. Maximum values were observed on Day 21 of the experiment in the groups with spontaneous healing and selective application of platelet concentrate.

**Conclusions:** The presence of wound defect in neuronal innervation leads DRG in parallel with a change in the structural and functional state of the nerve cells themselves, a significant restructuring of glial environment of neurons. Marked proliferation of satellite cells and change their attitude to the formation of multilayer structures in the capsule neuron. The degree of satellite cells amount correlates with the severity of the wound process – the number of satellite cells is higher, the longer the stage of inflammation and remodeling in wound defect.

**Key words:** dorsal root ganglion, satellite glial cells, purulent wound process, platelet concentrate

## Актуальность

Рассматривая с современных позиций механизмы регенерации тканевых повреждений и способы регионарной стимуляции процессов заживления необходимо отметить, что и объём ранения, особенности его течения и факторы, сопровождающие лечебные мероприятия, воздействуют и на периферический сенсорный аппарат.

Эти воздействия могут ограничиться лишь незначительными функциональными изменениями в сенсорных нейронах и их отростках, но в некоторых случаях мы можем отметить более серьёзные последствия, вплоть до гибели клеток и последующей деафферентации области повреждения. Что, учитывая значительный вклад афферентных отделов периферической нервной системы в реакции, сопровождающие раневой процесс, может привести к ухудшению, торможению процесса регенерации поврежденной области.

При этом деятельность нейронов невозможно рассматривать вне связи с глиальным окружением.

Именно глия:

- выступает в роли барьера, реагируя на любые изменения сменой фазовой активности и ионного транспорта;
- способна переносить метаболиты к нейронам;
- продуцирует трофические молекулы и участвует в доставке к нейронам питательных веществ при повышенной активности и кислорода – при гипоксии;
- разграничивает и группирует нейрональные отростки;
- опосредует захват ионов калия из внеклеточного пространства, поддерживая постоянство окружающей среды для нейронов [4, 12]

Клетки-сателлиты очень чувствительны к повреждениям периферических отростков нейронов.

После травмы периферических отделов спинномозговых нервов или тканей и органов мишеней клетки-сателлиты начинают пролиферировать в соответствующих чувствительных узлах спинномозговых нервов [3, 5, 7, 8].

В них усиливается экспрессия TGF $\beta$  и его рецепторов, что, по-видимому, стимулирует пролиферацию клеток-сателлитов.

Белок теплового шока 70, который является ключевым элементом выживания клеток в ответ на различные повреждения [5, 10], также экспрессируется шванновскими клетками, клетками-сателлитами и малыми нейронами [6].

Отмечено, что после травмы периферической части спинномозгового нерва в 7 раз увеличивается количество контактов между отростками клеток-сателлитов от различных нейронов [13].

Отмечается гибель клеток-сателлитов у новорожденных и половозрелых животных на ипсилатеральной стороне, а также контралатеральной [7, 16].

При этом пик гибели клеток-сателлитов регистрируется через 2 месяца после перерезки нерва и через 6 недель после максимальной гибели нейронов в тех же чувствительных узлах спинномозговых нервов [15].

Клетки-сателлиты, как и псевдоуниполярные нейроны, реагируют на действие нейротоксинов развитием деструктивных изменений, проявляющихся в нарушении структуры мембран и клеточных органелл [9].

Целью нашего исследования являлось изучение состояния сателлитной глии нейронов спинномозговых узлов (СМУ) при гнойной ране в области их иннервации и различных методах региональной стимуляции заживления.

## Материал и методы

Эксперимент выполнен на 160 половозрелых самцах белых беспородных крыс с начальным возрастом 4 месяца, масса тела животных варьировала от 250 до 300 граммов.

Для моделирования различного течения гнойной раны кожи были выделены следующие экспериментальные группы:

1. Естественное заживление гнойных ран (ГнР) – 40 животных.
2. Применение ОТПК в процессе заживления гнойных ран (ГнР+ОТПК) – 40 животных.
3. Использование методики ГИС при гнойном раневом процессе (ГнР+ГИС) – 40 животных.
4. Использование комплекса – гидроимпульсная санация и обогащенная тромбоцитами плазма крови при гнойном раневом процессе (ГИС+ОТПК) – 40 животных.

В соответствии с планом эксперимента были сформированы группы животных, для каждого срока эксперимента был определен свой интактный контроль (ИК). Забор материала осуществлялся на 1, 3, 5, 7, 14 и 21 сутки после моделирования раны.

В стерильных условиях на переднюю поверхность левого бедра крысы наносили разрез длиной 1 см и глубиной 0,5 см. Для моделирования гнойного раневого процесса в образовавшийся раневой дефект вносили марлевый тампон с взвесью суточной культуры *Staphylococcus aureus* с концентрацией  $10^{10}$  микробных тел в 1 мл 0,9% раствора NaCl, на рану накладывали адаптационные швы.

В качестве экспериментальных факторов, изменяющих скорость заживления раны применяли сгусток ОТПК (с концентрацией тромбоцитов не менее 1 млн/мкл) и гидроимпульсную санацию при помощи модифицированного аппарата УГОР – 1М (санация изотоническим раствором NaCl) [1, 11].

Для внесения ОТПК применяли устройство для нанесения гелеобразных лекарственных средств «УНГЛС – 01» [2].

Спинномозговой ганглий фиксировали в жидкости Карнуа (хлороформ, абсолютный спирт, ледяная уксусная кислота в соотношениях 6:3:1) с последующей заливкой в парафин после стандартной процедуры обезвоживания. Серийные продольные срезы толщиной 6-7 мкм окрашивали крезоловым фиолетовым по методике Ниссля.

Оценку глиального компонента проводили с помощью дифференцированного подсчета са-

теллитных глиальных клеток вокруг перикарионов нейронов для каждого морфофункционального и размерного типа нервных клеток (перинеурональный индекс). К сателлитам относили клетки, удалённые не далее чем на диаметр их ядра от тела нейрона.

Статистический анализ проведён с помощью компьютерной программы Statistica 10.0. Результаты подсчёта представлены в виде  $M \pm \sigma$ , где  $M$  – среднее значение исследуемого показателя при  $n = 7$ , ( $n$  – количество животных в каждой группе),  $\sigma$  – стандартное квадратичное отклонение. Для оценки характера распределения использовались графический метод построения гистограмм и критерии Колмогорова-Смирнова и Лилиенфорса, межгрупповые сравнения выполнялись с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни, непараметрического дисперсионного анализа Спирмена. Так же использовался одно- и многомерный регрессионный анализ, вычислялся коэффициент корреляции. Достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Анализ морфологической картины клеточной популяции СМУ позволил выделить 3 основных типа нейроцитов:

1. Клетки с выраженными признаками нарушения метаболизма, проявляющимися в виде крайней степени изменений тинкториальных свойств, выраженным пикнозом и процессами лизиса клеточного тела, выделяемые нами как деструктивно измененные.

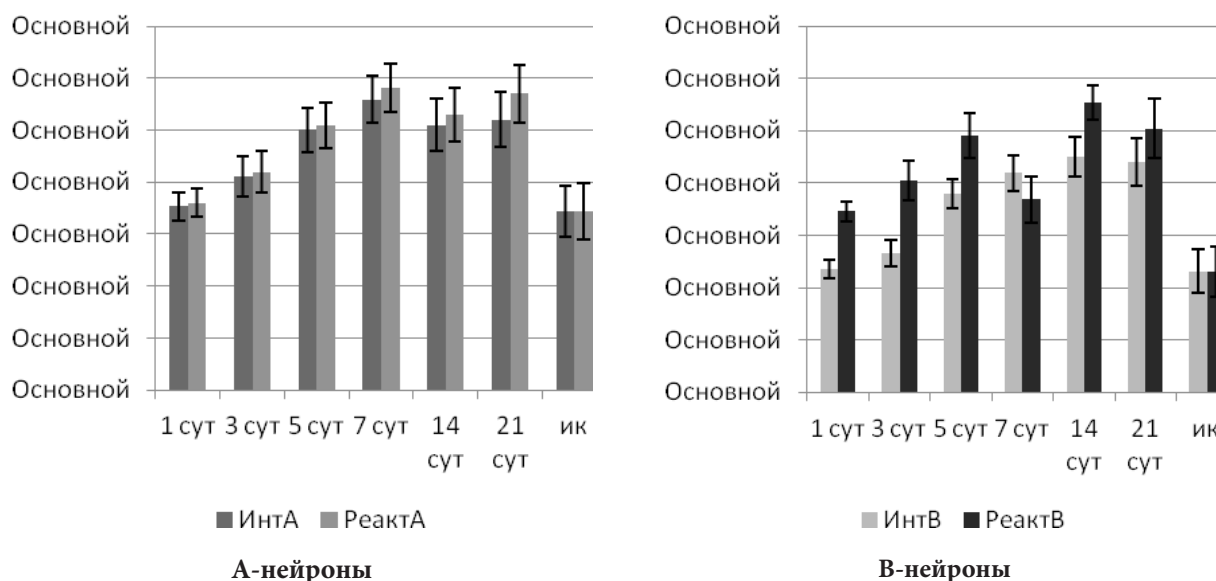
2. Оставшиеся клетки в целях наглядности нами разделены на 2-е субпопуляции: а.) тип А – крупные, светлые нейроны с отчётливыми глыбками базофильного вещества и волокнистой ядерной мембраной, одним большим центрально расположенным ядрышком или иногда с 1-2-мя мелкими ядрышками; б) тип В – мелкие, тёмные 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. В пределах указанных подтипов отмечались группы клеток отличных по своим тинкториальным характеристикам от подавляющего большинства. Данную популяцию мы расценивали как клетки с реактивными изменениями, которые могли носить разнонаправленный характер.

Проведенные исследования показали, что на фоне разнонаправленных изменений структурно-функционального состояния нейронов СМУ отмечались значительные перестройки глиального компонента. Особый интерес вызвала динамика количества сателлитных глиоцитов, как принимающих непосредственное участие в обеспечении трофики нейрона и, с другой стороны, тесно связанных с процессами дегенерации нейронов.

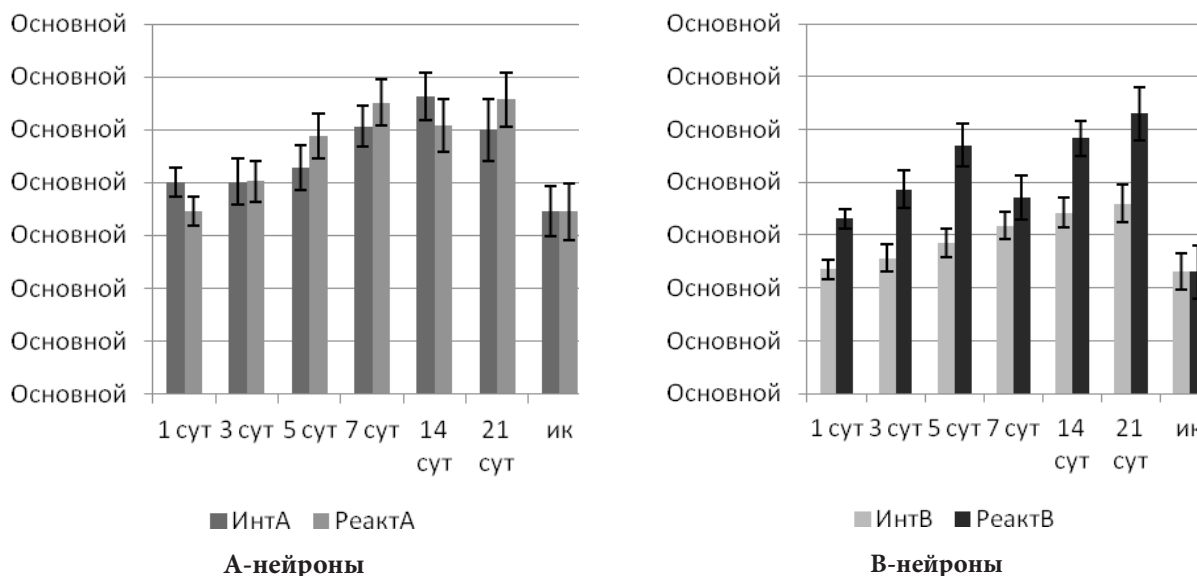
Известно, что в заключительной стадии своей гибели нейроны фагоцитируются клетками-сателлитами, таким образом, функционирование клеток-сателлитов не всегда направлено на поддержание выживания нейрона [4, 5, 7, 14, 16].

В целом необходимо отметить нарастание числа сателлитов в СМУ в динамике заживления после нанесения раны в зоне иннервации. В количественном эквиваленте при естественном заживлении он был более выражен для крупных А-нейронов и достигал к 7-м суткам максимума в  $5,8 \pm 0,52$  сателлита на один нейрон в группе с использованием ГИС при асептическом раневом процессе. Для В-нейронов рост перинеуронального индекса был менее выражен, с максимумом на 14-е сутки в  $5,5 \pm 0,57$  сателлита в той же экспериментальной группе. Необходимо отметить, что увеличение числа сателлитов часто сопровождалось пространственной перестройкой их положения в перинеурональной капсуле. Так отмечалось формирование скоплений сателлитных глиоцитов около одного из полюсов нейронов, по всей видимости в районе отхождения их отростков. Другим вариантом изменения положения сателлитных глиоцитов было формирование многослойных структур, когда сателлиты лежали в два, и более слоёв вокруг нейрона, но при этом не были удалены далее чем на диаметр их клеточного тела. Отдельный интерес представляли скопления глиальных клеток на месте лизирующихся нейронов – «глиальные узелки». Их формирование и наибольшее количество отмечалось в группах с максимально выраженной деструкцией нейронов – естественное заживление (ГнР) и селективное применение ОТПК (ГнР+ОТПК).

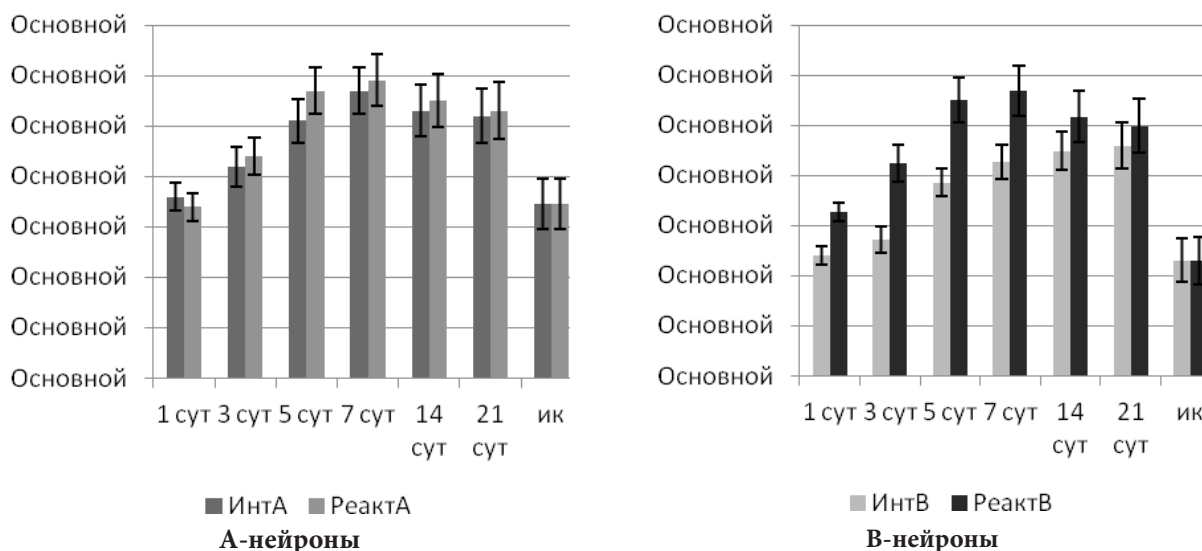
Оценка динамики перинеуронального индекса продемонстрировала преимущественный рост числа сателлитов для реактивной популяции нейронов: при спонтанном заживлении для А- и В-типов, при селективном применении ГИС и комплексном использовании ГИС+ОТПК только для В-типа. При этом максимальный рост числа сателлитов реактивно измененных В-клеток отмечался при селективном применении ОТПК. В свою очередь для популяции А-нейронов в группе с применением ГИС, в качестве терапевтического фактора, на 1 и 14-е сутки количество сателлитов около интактных клеток этой популяции превышало таковое у реактивно измененных. Возможно это являлось следствием соответствующей миграции глии от дистрофически измененных нейронов к соседним интактным клеткам, параллельно с увеличением функциональной нагрузки на них (рис. 1, 2, 3).



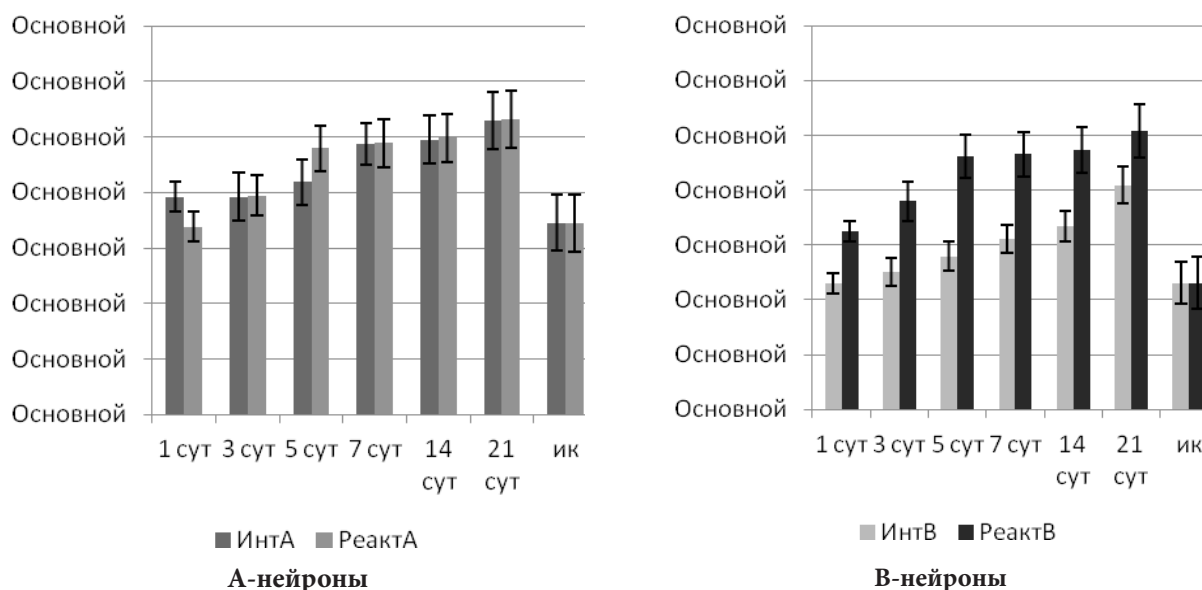
**Рис. 1.** Перинеурональный индекс нейронов СМУ при естественном заживлении гнойной раны в зоне иннервации. Ось абсцисс – сроки забора материала; ось ординат – количество сателлитных глиоцитов на один нейрон, ед.



**Рис. 2.** Перинеурональный индекс нейронов СМУ при применении ГИС для терапии гнойной раны в зоне иннервации. Ось абсцисс – сроки забора материала; ось ординат – количество сателлитных глиоцитов на один нейрон, ед.



**Рис. 3. Перинеурональный индекс нейронов СМУ при селективном применении ОТПК для терапии гнойной раны в зоне иннервации. Ось абсцисс – сроки забора материала; ось ординат – количество сателлитных глиоцитов на один нейрон, ед.**



**Рис. 4. Перинеурональный индекс нейронов СМУ при комплексном применении ГИС и ОТПК для терапии гнойной раны в зоне иннервации. Ось абсцисс – сроки забора материала; ось ординат – количество сателлитных глиоцитов на один нейрон, ед.**

Отдельный интерес представляет формирование двупиковой кривой с локальным минимумом на 7-е сутки для субпопуляции реактивных В-нейронов в группах с естественным заживлением и при селективном применении ГИС. Значительное снижение числа сателлитов на этом сроке, по всей видимости, являлось следствием с одной стороны процессов миграции сателлитных глиоцитов, с другой стороны может быть объяснено с позиции, что вследствие изменения метаболического статуса таких клеток их способность окрашиваться резко снизилась и реальное количество было подсчитано неверно.

К окончанию эксперимента (на 21-е сутки) во всех экспериментальных группах и для всех субпопуляций число сателлитов в 1,5 – 2 раза превышало показатели интактного контроля и соответствовало повышенной функциональной нагрузке на нейроны, как вследствие продолжающейся репарации раневого дефекта, так и отмеченной убыли нейронов СМУ вследствие необратимых дегенеративных изменений.

## Выводы

Наличие раневого дефекта в области иннервации нейронов СМУ приводит, параллельно с изменением структурно-функционального состояния самих нервных клеток, к значительным перестройкам глиального окружения нейронов.

Отмечается пролиферация сателлитных клеток и изменение их пространственного положения с формированием многослойных структур в капсуле нейрона.

Степень выраженности сателлитоза коррелирует с тяжестью течения раневого процесса – количество сателлитных клеток тем выше, чем длиннее стадии воспаления и ремоделирования в раневом дефекте.

## Литература

1. Алексеева Н.Т. Морфологическая оценка регенерата при заживлении гнойных кожных ран под влиянием различных методов регионального воздействия/ Н.Т. Алексеева // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2014. – Т. 3, №2 (10). – С. 14-18.
2. Гистохимический анализ репаративных процессов в асептических экспериментальных ранах при использовании гидроимпульсной санации и тромбоцитарного концентрата / А.А. Глухов [и др.]// Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2010. – Т.3, №4. – С. 368-373.
3. Изменения состояния нейроцитов и нейрон-глиальных соотношений в спинномозговых узлах собак после удлинения конечности / Г.Д. Сафонова [и др.] // Гений ортопедии – 2005. – №2. – С. 14-18.
4. Клетки-сателлиты чувствительных нейронов при различных типах травм седалищного нерва крысы. / С.С. Архипова [и др.] // Морфология – 2009. – Т. 135. №3. – С. 29-34.
5. Рагинов И.С. Взаимодействие чувствительных нейронов и клеток-сателлитов при стимуляции регенерации нерва / И.С. Рагинов, Ю.А. Чельшев, Т.Ф. Шагидуллин // Морфология.– 2002. – Т. 122, № 4. – С. 37–39.
6. Apoptotic stress is counterbalanced by survival elements preventing programmed cell death of dorsal root ganglions in subacute type 1 diabetic BB Wor Rats/ H. Kamiya [et al.] // Diabetes. –2005. –Vol. 54. –P. 3288-3295.
7. Butt A. Glial Neurobiology/ A. Butt, A. Vekhratsky. – Chichester:Wiley, 2007. – 217 p.
8. Chen Y. Brain-skin connection: stress, inflammation and skin aging / Y. Chen, J. Lyga // Inflammation and allergy. – 2014. – Vol. 13. – P. 177-190.
9. Corsetti G. Ultrastructural study of the alterations in spinal ganglion cells of rats chronically fed on ethanol /G. Corsetti //Ultrastruct. Pathol.– 1998. –Vol. 22, N4. –P. 309-319.
10. Dublin P. Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain / Dublin P., Hanani M. // Brain Behav. Immun. – 2007. – Vol. 21.-№5. P. 592-598.
11. Effect of neural-induced mesenchymal stem cells and plateletrich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve injury model / H.H. Cho [et al.]// Laryngoscope. — 2010.— V.120, N5. — P.907–913.
12. Elson K. Satellite cell proliferation in murine sensory ganglia in response to scarification of the skin / K. Elson, A. Simmons, P. Speck // Glia.– 2004.– Vol. 45, N 1. – P. 105-109.
13. Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function / M. Hanani // Brain Res. Rev.– 2005. – Vol. 4, N 3. –P.457-476.
14. Nathaniel E.J. Oligodendroglial response to degeneration of dorsal root fibers in adult rat spinal cord/ E.J. Nathaniel, D.R. Nathaniel // Exp Neurol. – 1977. – Vol. 54. – No.2. – P. 217-232.
15. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination / A. McKay-Hart [et al.]// Exp. Brain Res. – 2002. – Vol. 142, N 3. – P. 308-318.
16. Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connectingpreviously separate perineuronal sheaths / E. Pannese [et al] // Anat. Embryol. (Berl). – 2003. -Vol. 206. – №5. – P. 337-347.