

УДК: 616.832-001:57.017.35:57.084

Б.Б. Жетписбаев, Т.Т. Керимбаев (д.м.н), В.Г. Алейников, А.О. Кожаметова

АО «Национальный центр нейрохирургии», г. Астана, Казахстан

ПАТОМОРФОЛОГИЯ И МОРФОГЕНЕЗ НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ РЕГЕНЕРАЦИИ СПИННОМОЗГОВОЙ ТРАВМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У КРЫС

Введение. Повреждение спинного мозга является одной из самых разрушительных травм и может приводить к тяжелым осложнениям. Лекарственная терапия, рекомендуемая для лечения травматических повреждений спинного мозга, используется, но малоэффективна. В последнее время в экспериментальных лабораторных исследованиях перспективной стратегией для лечения спинномозговой травмы считают подсадку периферических нервов с нейротрофическими факторами и трансплантацией стволовых клеток.

Цель исследования: выявить патоморфологические и морфогенетические признаки спинальной травмы, начальной стадии регенерации ее в эксперименте у крыс, которым оперативным путем была проведена подсадка периферического нерва.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 30 аутбредных крысах-самцах линии Вистар весом 180-200 грамм. 23 животных были выведены из эксперимента путем декапитации, на 14, 21, 30 и 60 сутки эксперимента. Область повреждения спинного мозга подвергалась патоморфологическому и иммуногистохимическому исследованию.

Заключение. Данные исследования показали, что патоморфологическими и морфогенетическими признаками, характеризующими начальную стадию регенерации спинномозговой травмы, явились периваскулярные нежно-волокнистые разрастания молодой фиброзной ткани, разрастания грануляционной ткани в зоне подсадки периферического нерва, периневральное нежно-волокнистое разрастание глиальной ткани с пролиферацией клеток иммунопозитивных на BrdU.

Ключевые слова: спинномозговая травма, патоморфология, морфогенез, эксперимент

Введение

Патоморфология и морфогенез структурных изменений при экспериментальной спинномозговой травме включают в себя процессы дезинтеграции, элиминации и организации в первичных очагах травмы, реакции пограничных и отдаленных тканей на сосудистые и трофические расстройства (вторичные некрозы, миелиты, глиальная реакция, развитие грануляционной ткани), восходящая и нисходящая дегенерация нервных волокон и путей [1, 2, 3, 4, 5, 6]. В морфогенезе спинномозговой травмы выделяют первичное и вторичное повреждение [1, 2]. Первичное повреждение спинного мозга, может варьировать от функциональной, обратимой его дисфункции или мелких очагов ушиба до грубой деструкции, захватывающей весь или почти весь поперечник мозга. Вторичное повреждение мозга проявляется вторичным геморрагическим и/или ишемическим некрозами; отеком и гипоксической альтерацией мозга (повреждение, сдавление или спазм сосудов и внутрисосудистые стазы и тромбозы); вторичные гистохимические нарушения (энзиматический липидный гидролиз с продукцией эйкозаноидов, свободно-радикальное липидное окисление с накоплением недоокисленных продуктов (лактатов, пируватов и др.), инфлюкс Ca⁺⁺, увеличение протеазной активности, накопление возбуждающих аминокислот, кининов, серотонина, динорфина); воспалительный нейронофагоцитоз полиморфноядерными лейкоцитами. Особое место в патоморфологии спинномозговой травмы

занимают апоптоз и выраженная воспалительная реакция мозга, в результате которых развивается отсроченная распространенная дегенерация и демиелинизация проводников спинного мозга [7, 8, 9, 10, 11].

В морфогенезе регенерации спинномозговой травмы большую роль играет пролиферация аксонов, глиоцитов, шванновских клеток мигрирующих в область повреждения, разрастание грануляционной ткани с последующим формированием глиомезодермального рубца [1, 2].

Повреждение спинного мозга является одной из самых разрушительных травм и может приводить к тяжелым осложнениям. В настоящее время лекарственная терапия, рекомендуемая для лечения травматических повреждений спинного мозга, используется, но малоэффективна [3, 12, 13, 14].

В последнее время в экспериментальных лабораторных исследованиях перспективной стратегией для лечения спинномозговой травмы считают подсадку периферических нервов с нейротрофическими факторами и трансплантацией стволовых клеток [9, 10].

Цель исследования: выявить патоморфологические и морфогенетические признаки спинальной травмы, начальной стадии регенерации ее в эксперименте у крыс, которым оперативным путем была проведена подсадка периферического нерва.

Материалы и методы: Эксперименты проведены на 30 аутбредных крысах-самцах линии Вистар весом 180-200 грамм. Животные подразделялись на контрольную и основную группы, со-



держались в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму. Моделирование полного повреждения спинного мозга проводилось на уровне шейно-грудного отдела позвоночника. В стерильных условиях под внутривенной анестезией и микроскопическим контролем, проводился разрез кожи и мягких тканей животного, скелетировались позвонки. Производилась ламинэктомия двух-трех позвонков, мобилизовался спинной мозг. Далее, под визуальным контролем производилось моделирование травмы спинного мозга путем его максимальной компрессии анатомическим зажимом Микулича в трех направлениях (под углом 90, 45 и 0 градусов). Накладывались послойные швы на рану.

После операции проводилась оценка неврологического статуса, электронной миографическое исследование для установления полного повреждения спинного мозга. Для контрольной группы животных оперативное вмешательство на этом заканчивалось.

Для основной группы животных (после оценки неврологического статуса и инструментальной верификации травмы спинного мозга) проводился 2 этап операции. В стерильных условиях под внутривенной анестезией и использованием микроскопа производился разрез длиной около 3 см. по внутреннему краю плечевой кости, мобилизовались крупные нервы обеих верхних конечностей (локтевой и срединный). Под микроскопом проводилось пропитывание приготовленным НА-гидрогелем нервов - трансплантатов (в количестве четырех). Пропитывание нервов осуществлялось инсулиновым шприцом по всей длине трансплантата. Проводился разрез по старому рубцу и осуществлялся доступ к поврежденному ранее участку спинного мозга на уровне шейно-грудного отдела позвоночника. Вскрывалась твердая мозговая оболочка. Спинной мозг мобилизовался в краниальном и каудальном направлениях до неповрежденной ткани. Производилось рассечение мягкой мозговой оболочки в проекции кортикоспинального тракта с обеих сторон выше и ниже участка повреждения, микродиссекторами раздвигалась ткань спинного мозга на глубину до 2-3 мм, устанавливались пропитанные НА-гидрогелем нервы-трансплантаты (по 2 с обеих сторон в краниальном и каудальном направлениях). Они фиксировались викриловыми швами (10/0) к мягкой мозговой оболочке. Накладывались послойные швы на рану.

23 крысы выведены из эксперимента путем декапитации на 14, 21, 30 и 60 сутки эксперимента: 10 животных из контрольной группы на 14, 21 и 60 сутки и 13 животных из основной группы на 21, 30 и 60 сутки (табл. 1).

На патоморфологическое исследование забирался фрагмент спинного мозга длиной 3-4 см (по 1,5-2 см в роstralном и каудальном направлении от эпикентра повреждения), вместе с позвонками. Материал был фиксирован в течение 24 часов

в 10% нейтральном формалине, с последующей традиционной проводкой. Применялась окраска гематоксилином и эозином, трихромом по Ван-Гизону, иммуногистохимическое исследование проводилось с применением антител – GFAP (RTU), S100 (RTU), NSE (RTU), Syn (RTU), NeuN (RTU), BrdU (RTU), MAP2b (RTU). Патоморфологическое исследование осуществлялось при помощи микроскопа Axioskop 40, Carl Zeiss, Germany, при общем увеличении X 100, X 200.

Таблица 1

Количество животных выведенных из эксперимента

№	Сутки	Контрольная группа	Основная группа
1	14	2	0
2	21	3	5
3	30	0	6
4	60	5	2

Результаты и обсуждения

У всех животных, как основной, так и контрольной групп, имела место классическая патоморфологическая картина спинномозговой травмы (рис. 1). В белом веществе спинного мозга с распространением на серое вещество определялись обширные очаги коагуляционного некроза, с формированием микрополостей вследствие липидного гидролиза, скоплениями зернистых шаров (макрофагов нагруженных липидами). В некротических массах были видны тени глиальных клеток. Серое вещество имело структуру в виде «бабочки», с неравномерно полнокровными и тромбированными сосудами, микронекрозами. В передних и задних рогах определялись деформированные нейроны, со сморщенными ядрами, цитоплазма их была с размытыми контурами, базофильная, местами разрушена - «тающие нейроны» (рис. 2). Присутствовали отек и мелкоочаговые кровоизлияния.

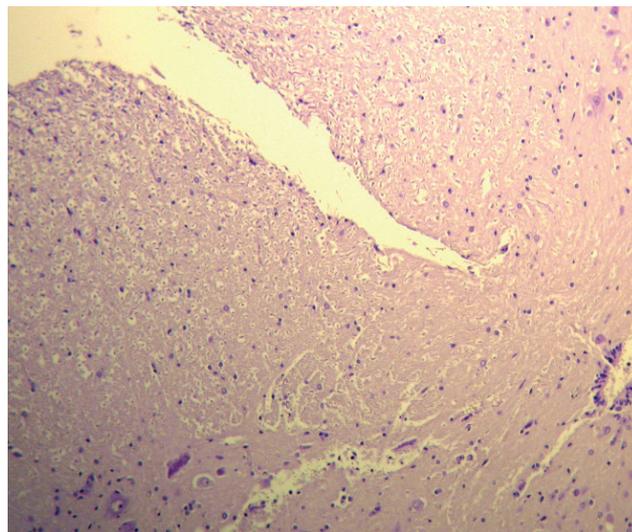


Рисунок 1 – Спинномозговая травма: некрозы и микрополости белого с переходом на серое вещество. X 100. Окраска гематоксилином и эозином

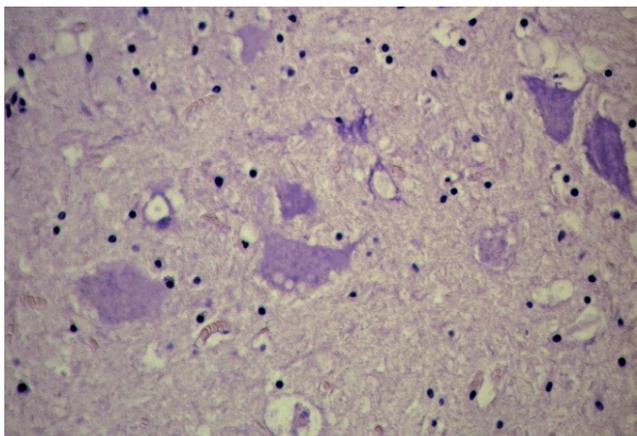


Рисунок 2 - «Тающие нейроны».
X 200. Окраска гематоксилином и эозином

У 2 крыс контрольной группы, выведенных из эксперимента на 60 сутки, в сером веществе на границе с зонами некроза белого вещества имели место периваскулярные нежно-волокнистые разрастания молодой фиброзной ткани, выявленные при гистохимической окраске трихромом по Ван-Гизону. Вероятнее всего, данные периваскулярные разрастания фиброзной ткани являются источником формирования регенерационного рубца (рис. 3).

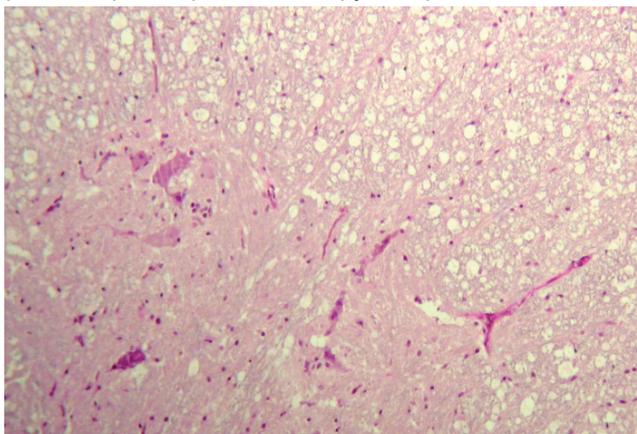


Рисунок 3 – Периваскулярные разрастания молодой фиброзной ткани.
X 100. Окраска трихромом по Ван-Гизону

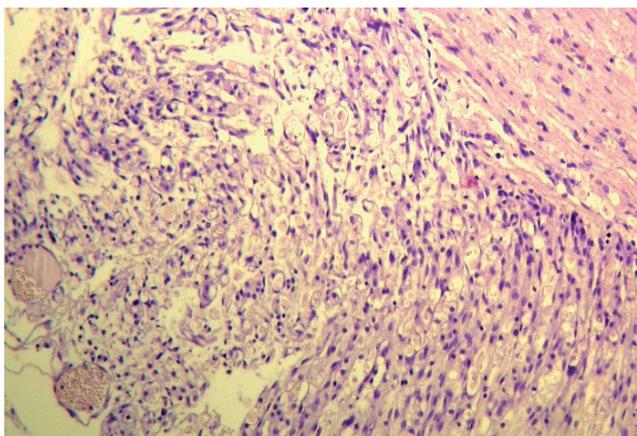


Рисунок 4 – Разрастание грануляционной ткани в зоне подсадки периферического нерва.
X 100. Окраска гематоксилином и эозином

У 4 животных основной группы выведенных из эксперимента на 21 и 30 сутки в зоне подсадки периферического нерва имели место разрастания грануляционной ткани (рисунок 4). У 1 животного из этой же группы выведенного из эксперимента на 60 сутки в области подсадки фрагмента периферического нерва определялось периневральное нежно-волокнистое разрастание глиальной ткани, иммуногистохимически позитивной на GFAP (рис. 5). На стыке глии и области подсадки периферического нерва имелись пролифераты клеток иммунопозитивных на BrdU (рис. 6).

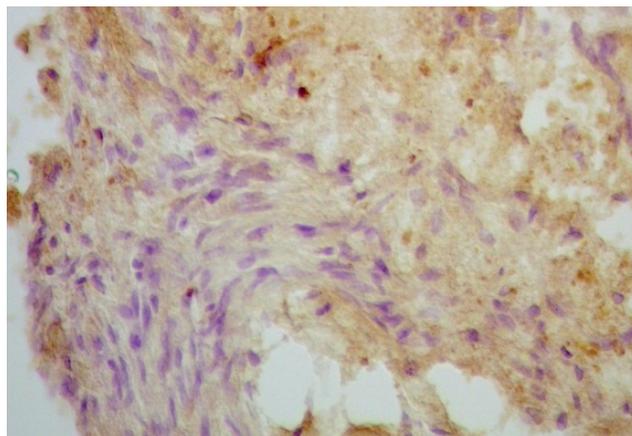


Рисунок 5 – Периневральное разрастание глии.
X 200. ИГХ: позитивная реакция на GFAP

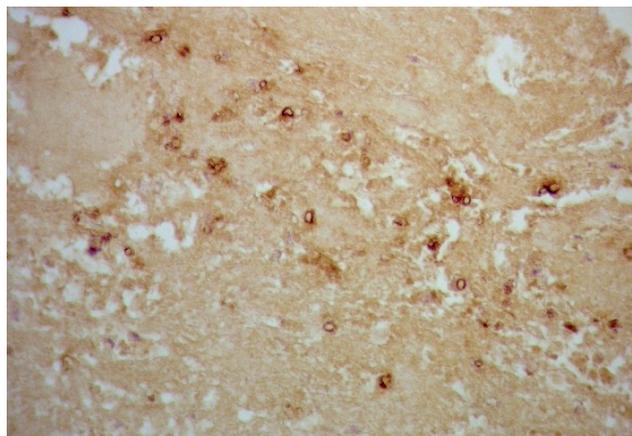


Рисунок 6 – Пролиферация клеток.
X 200. ИГХ: позитивная реакция на BrdU

Заключение

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. У всех животных, как основной, так и контрольной групп, имела место классическая патоморфологическая картина спинномозговой травмы. Процесс локализовался больше в белом веществе, с аутодеструкцией серого вещества.

2. У 2 крыс контрольной группы выведенных из эксперимента на 60 сутки в сером веществе на границе с зонами некроза белого вещества имели место периваскулярные нежно-волокнистые разрастания молодой фиброзной ткани, выявленные



при гистохимической окраске трихромом по Ван-Гизону. Вероятнее всего, данные периваскулярные разрастания фиброзной ткани являются источником формирования регенерационного рубца.

3. У 4 животных основной группы выведенных из эксперимента на 21 и 30 сутки в зоне подсадки периферического нерва имели место разрастания грануляционной ткани.

4. У 1 животного основной группы выведенного из эксперимента на 60 сутки, в области подсадки фрагмента периферического нерва определялось периневральное нежно-волоконистое разрастание глиальной ткани, иммуногистохимически позитивной на GFAP. На стыке глии и под-

саженного периферического нерва имелись пролифераты клеток иммунопозитивных на BrdU.

5. Периваскулярные нежно-волоконистые разрастания молодой фиброзной ткани, разрастания грануляционной ткани в зоне подсадки периферического нерва, периневральное нежно-волоконистое разрастание глиальной ткани с пролиферацией клеток иммунопозитивных на BrdU характеризуют морфогенез начальной стадии регенерации спинномозговой травмы.

6. Полученные результаты определяют необходимость дальнейших наблюдений за морфогенезом восстановления поврежденного спинного мозга при трансплантации периферического нерва с введением регенерационного гидрогеля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кривицкая Т.Н. Патоморфология позвоночно-спинномозговой травмы // Нейротравматология: Под ред. А.Н. Коновалова, Л.Б. Лихтермана, А.А. Потапова. - М.: Вазар-Ферро, 1994. - С.276-277.

2. Мухамедшина Я.О., Шаймарданова Г.Ф., Мухитов А.Р., Салафутдинов И.И., Ризванов А.А., Зарубина В.Н., Челышев Ю.А. Выживание и дифференцировка мигрирующих в спинной мозг эндогенных шванновских клеток под влиянием нейротрофических факторов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия Том VII. - № 3. - 2012.

3. Bekbolsynov D.A., Ogay V.B., Raimagambetov E.K., Mukhambetova A.E. Mesenchymal stem cells in hyaluronic acid scaffold as a therapeutic tool for osteoarthritis – preliminary report // Вестник КазНУ: Серия биологическая. – 2012. - 4(56). - С.355-358.

4. Далина А.Д., Мухамбетова А.Е., Батпенов Н.Д., Раймагамбетов, Е.К., Огай В.Б. Влияние ростовых факторов TGF- β 1, IGF-I, BMP-2 и BMP-4 на хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из синовиальной оболочки человека // Биотехнология: теория и практика. – 2013. - №2. – С.12-15.

5. Tom V.J., Sandrow-Feinberg H.R., Miller K., Santi L., Connors T., Lemay M.A., Houlé J.D. Combining peripheral nerve grafts and chondroitinase promotes functional axonal regeneration. in the chronically injured spinal cord // J Neurosci. - 2009. – Vol.29 (47). – P.14881-90.

6. Tom V.J., Sandrow-Feinberg H.R., Miller K., Domitrovich C., Bouyer J., Zhukareva V., Klaw M.C., Lemay M.A., Houlé J.D. Exogenous BDNF enhances the integration of chronically injured axons that regenerate

through a peripheral nerve grafted into a chondroitinase-treated spinal cord injury site // Exp Neurol. - 2013 Jan. – Vol.239. – P.91-100.

7. Fehlings MG, Vawda R. Cellular treatments for spinal cord injury: the time is right for clinical trials // Neurotherapeutics. - 2011 Oct. - Vol.8 (4). – P.704-20.

8. Parr A.M., Tator C.H., Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury // Bone Marrow Transplant. - 2007 Oct. - Vol.40(7). – P.609-19.

9. Seo J.H., Cho S.R. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials // Yonsei Med J. - 2012 Nov 1. - Vol.53 (6). – P.1059-67.

10. Vawda R., Fehlings M.G. Mesenchymal cells in the treatment of spinal cord injury: current & future perspectives // Curr Stem Cell Res Ther. - 2013 Jan. - Vol.8 (1). – P.25-38.

11. Macaya D., Spector M. Injectable hydrogel materials for spinal cord regeneration: a review // Biomed Mater. - 2012 Feb. - Vol.7 (1):012001.

12. Prestwich G.D. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine // J Control Release. - 2011 Oct 30. - Vol.155(2). – P.193-9

13. Jain A., Kim Y.T., McKeon R.J., Bellamkonda R.V. In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury // Biomaterials. - 2006 Jan. - Vol.27 (3). – P.497-504.

14. Mothe A.J., Tam R.Y., Zahir T., Tator C.H., Shichet M.S. Repair of the injured spinal cord by transplantation of neural stem cells in a hyaluronan-based hydrogel // Biomaterials. - 2013 May. - Vol.34 (15). – P.3775-83.



ТҮЙІНДЕМЕ

Б.Б. Жетписбаев, Т.Т. Керимбаев (м.ғ.д.), В.Г. Алейников, А.О. Кожаметова

«Ұлттық нейрохирургия орталығы» АҚ, Астана қ., Қазақстан

ЕГЕУҚҰЙРЫҚТАРҒА ЖАСАЛҒАН ЭКСПЕРИМЕНТТЕ ЖҰЛЫН ЖАРАҚАТЫНЫҢ ҚАЛПЫНА КЕЛУІНІҢ БАСТАПҚЫ КЕЗЕҢІНДЕГІ ПАТОМОРФОЛОГИЯСЫ ЖӘНЕ МОРФОГЕНЕЗИ

Кіріспе. Жұлынның зақымдалуы ең ауыр жарақаттардың бірі болып табылады және үлкен асқынуларға соқтыруы мүмкін. Жұлынның жарақаттық зақымдануын емдеуге ұсынылған дәрілік терапия қолданылады, бірақ тиімділігі төмен. Соңғы уақыттарда эксперименталдық зертханалық зерттеулерде жұлын жарақатын емдеуге арналған перспективалы стратегия болып нейротрофиялық факторлар және дің жасушаларын трансплантациялаумен бірге перифериялық нервтерді қондыру саналады.

Зерттеу мақсаты: операциялық жолмен перифериялық нерв қондырылған егеуқұйрықтарға жасалған экспериментте қалпына келудің бастапқы кезеңіндегі жұлын жарақатының патоморфологиялық және морфогенетикалық белгілерін анықтау.

Материалдар және әдістер. Эксперименттер салмағы 180-200 грамм болатын, Вистар ұрпағының

туыстығы жоқ 30 аталық егеуқұйрықтарына жүргізілді. 23 жануар эксперименттің 14, 21, 30 және 60 тәулігінде декапитация жолымен эксперименттен шығарылды. Жұлынның зақымданған аймағына патоморфологиялық және иммуногистохимиялық зерттеулер жасалынды.

Тұжырым. Аталған зерттеулер жұлын жарақатының қалпына келуінің бастапқы кезеңін сипаттаушы патоморфологиялық және морфогенетикалық белгілеріне жас фиброз тіннің тамыраймақтық нәзік-талшықты өсіндісі, перифериялық нервті қондыру аумағындағы түйіршіктенген тіннің өсіндісі, BrdU иммунопозитивтік жасушалар пролиферациясымен глиа тіннің периневральды нәзік-талшықты өсіндісі жататындығын көрсетті.

Негізгі сөздер: жұлын жарақаты, патоморфология, морфогенез, эксперимент.

SUMMARY

B.B. Zhetpisbayev, T.T. Kerimbayev (D.Med.Sci.), V.G. Aleynikov, A.O. Kozhakhmetova

JSC "National Centre for Neurosurgery", Astana, Republic of Kazakhstan

PATHOLOGY AND MORPHOGENESIS OF THE INITIAL STAGE OF SPINAL INJURY REGENERATION IN EXPERIMENTAL RATS

Introduction. Spinal cord injury is one of the most devastating injuries and can lead to serious complications. Drug therapy, recommended for the treatment of traumatic lesions of the spinal cord, is used, but ineffective. In recent studies, in experimental laboratory replanting of peripheral nerves with neurotrophic factors and stem cell transplantation are considered as promising strategy for the treatment of spinal injuries.

Objective: to reveal pathological and morphogenetic features of spinal cord injury, the initial stage of its recovery in an experiment in rats, in which surgically grafting of peripheral nerve was conducted.

Materials and methods. Experiments were conducted on 30 outbred male Wistar rats weighing

180-200 grams. 23 animals were removed from the experiment by decapitation at 14th, 21st, 30th and 60th days of the experiment. The area of the spinal cord injury was exposed to pathomorphological and immunohistochemical studies.

Conclusion. These studies have shown that pathologic and morphogenetic features characterizing the initial stage of the regeneration of spinal injury were perivascular soft fibrous growths of young fibrous tissue, growths of granulation tissue in the area of replanting of peripheral nerve, perineural soft fibrous growth of glial tissue with proliferation of cells immunopositive to BrdU.

Keywords: spinal injury, pathology, morphogenesis, experiment.