

12. Voter K. Z., Leigh M. W., Boat T. F. et al. Development of mucociliary transport in the postnatal ferret trachea // J. Appl. Physiol. 1992. Vol. 73(4). P. 1500–1503.
13. Yager J. A., Ellman H., Dulfano M. J. Human ciliary beat frequency at three levels of the tracheobronchial tree // Am. Revol. Respir. Dis. 1980. Vol. 121(4). P. 661–665.

Петрова Е. С., Колос Е. А.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО НЕРВА КРЫСЫ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ: ПЕРИФЕРИНА, АЛЬФА-АКТИНА, PCNA

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (заведующий – профессор РАН Д. Э. Коржевский) Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Несмотря на то, что изучение восстановления нерва после травмы имеет многолетнюю историю, проблема стимуляции регенерации периферических нервных проводников остается актуальной. Это связано с тем, что множество экспериментальных и клинических разработок в этом направлении не приводит к полному функциональному восстановлению поврежденного нерва. В настоящее время применяются различные способы ускорения регенерации нервных проводников. Используются лекарственные средства [14], влияние магнитного поля [5], применяется электростимуляция [9], совершенствуются методы шовной техники [1] и нейропластики [4], создаются специальные кондуиты, которые могли бы заменить аутотрансплантат фрагмента нерва, применяемый в хирургической практике для соединения проксимального и дистального участков травмированного нерва [8, 11]. Проводятся разработки по улучшению регенерации нервных проводников с помощью применения клеточных и генных технологий [2, 8, 11]. Для оценки степени восстановления поврежденных нервов используются разные методы. Помимо поведенческих тестов и электрофизиологических методов оценки проводимости нервных проводников важен морфологический анализ регенерирующих нервных волокон. Цель настоящей работы – отработать методы оценки степени восстановления нерва после травмы с помощью иммуногистохимического выявления периферина (PE), белка пролиферирующих клеток PCNA и альфа-актина.

Работа выполнена на крысах Вистар (n = 20). У подопытных животных на уровне верхней трети бедра повреждали седалищные нервы путем наложения лигатуры (в течение 40 с). При работе с животными руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 года). Через 21 и 30 суток после операции выделяли фрагменты нерва в области повреждения (1,5 см) и фрагменты на расстоянии 7–8 мм дистальнее места повреждения (3 мм), фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [3]. Сроки были выбраны с учетом

ранее выполненных исследований [6, 7], которые показали, что через 21 сутки в дистальном отрезке нерва уже присутствуют регенерирующие аксоны, и процессы валлеровской дегенерации не мешают их анализу.

Для выявления аксонов использовали кроличьи поликлональные антитела к периферину (PE). На поперечных срезах через нерв выявляли периферин-иммунопозитивные регенерирующие нервные волокна и кровеносные сосуды. На продольных срезах проводили подсчет PCNA⁺ шванновских клеток (нейролеммоцитов). Для оценки пролиферации нейролеммоцитов применяли мышинные моноклональные антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток PCNA (клон PC10, Dako, Дания). Альфа-актин – маркер гладкомышечных клеток – использовали с целью выявления развивающихся сосудов в эндоневрии поврежденного нерва. Для этого применяли моноклональные мышинные антитела (клон 1A4, Dako, Дания). Вторичными реагентами служили реактивы из наборов Super Sensitive Polymer-HRP Detection System (Bio Genex, США) и EnVision+ System Labeled Polymer-HRP Anti-Mouse (K4001) (Dako, Дания). При анализе поперечных срезов одного из трех стволов седалищного нерва (наиболее крупного) измеряли площадь, занятую PE-содержащими структурами, а также подсчитывали число волокон в разные сроки после операции. Подсчет PCNA-содержащих клеток осуществляли на 1000 шванновских клеток, индекс пролиферации выражали в промилле. Различия оценивали по t- и U-критерию и считали значимыми при $p < 0,05$. Количественный анализ проводили на изображениях, полученных с помощью микроскопа Leica DM 750 и цифровой камеры Leica ICC 50 при увеличениях $\times 400$ и $\times 1000$. Для подсчета использовали программу ImageJ (NIH, США).

Известно, что периферин относится к белкам промежуточных филаментов (57 кД) и экспрессируется преимущественно в тех нервных клетках, аксоны которых располагаются на периферии [10]. Его функция связана со стабилизацией диаметра аксона и обеспечением нормальной скорости проведения нервного импульса [16].

Анализ препаратов с иммуногистохимической реакцией на PE показал, что в седалищном нерве интактной крысы приблизительно 15 % площади поперечного сечения занимают PE⁺ структуры. Это осевые цилиндры периферических нервных проводников. Их миелиновые оболочки этим методом не выявляются. Наиболее тонкие аксоны, которые удается выявить с помощью реакции на PE, достигают диаметра 0,5–0,7 мкм. Морфометрический анализ показал, что через 21 сутки после наложения лигатуры в дистальном сегменте поврежденного нерва уже имеются регенерирующие волокна разного диаметра: от 0,5 до 4,0 мкм. При определении доли площади, занимаемой PE⁺ элементами, оказалось, что она достоверно изменяется в разные сроки после операции: через 21 сутки она составляла $2,00 \pm 0,09$ % от площади цифрового изображения препарата, через 30 суток – $4,32 \pm 0,40$ % ($p < 0,05$). На поперечном срезе через нерв аксоны выглядят, как правило, округлыми (иногда овальными или неправильной формы) структурами разного диаметра (рис. 1А). Подсчет числа аксонов на единицу площади препарата (с пересчетом на 1 мм²) показал, что количество регенерирующих нервных волокон к 30 суткам постепенно возрастает, но не достигает уровня интактного нерва (рис. 1Б).

Одним из показателей структурно-функционального состояния нерва после повреждения является реакция нейролеммоцитов. Нейролеммоциты (шванновские клетки) – глиальные элементы периферической нервной системы, играющие важную роль в поддержании гомеостаза нерва и в связи с этим влияющие на репаративные процессы. Их основная функция – миелинизация нервных проводников ПНС. В настоящее время установлено, что существует две популяции шванновских клеток: миелинизирующие и немиелинизирующие [15]. Есть мнение, что именно немиелинизирующие нейролеммоциты вырабатывают трофические и ростовые факторы, цитокины и белки экстрацеллюлярного матрикса, которые способствуют росту аксонов [18]. В литературе последних лет появились данные о том, что шванновские клетки обладают мультипотентностью и проявляют свойства стволовых клеток [12]. Показатели пролиферации и митотического деления шванновских клеток в норме у половозрелых крыс очень низкие [17]. Применяв иммуногистохимическое выявление антигена пролиферирующих клеток PCNA, мы практически не встречали в интактном нерве PCNA⁺ клеток. После повреждения нервного ствола их число увеличивалось (рис. 2Б). Полученные данные согласуются с результатами других исследователей [13, 17]. Пик пролиферации шванновских клеток, который мы в данном исследовании не рассматривали, приходится на ранние сроки послеоперационного периода. В период после 20 суток после повреждения пролиферативные процессы снижаются. Этим и объясняется низкий индекс пролиферации: через 21 сутки – $5,0 \pm 0,4 \%$ и через 30 сут – $6,3 \pm 0,5 \%$ ($p > 0,05$).

Для нормального развития и функционирования нерва важное значение имеет кровоснабжение. Так, в экспериментах показано, что окклюзия артерий в большеберцовых нервах крыс приводит к ишемической периферической нейропатии [13]. Поэтому еще одним показателем регенерации нервного ствола может служить состояние сети кровеносных сосудов, которые формируются после сдавливания нерва в месте повреждения и дистальнее него. Мы провели подсчет кровеносных сосудов на единицу площади поперечного среза через нервный ствол с пересчетом на 1 мм². Сосуды были выявлены с помощью иммуногистохимиче-

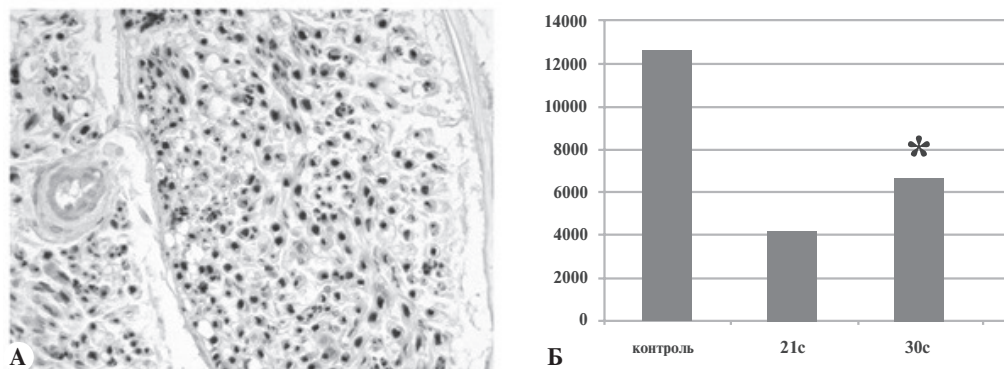


Рис. 1. Поперечный срез через один из стволов седалищного нерва крысы через 30 суток после наложения лигатуры (А) и изменение числа нервных волокон в разные сроки после повреждения (Б). Иммуногистохимическая реакция на периферин. Ув. 400×

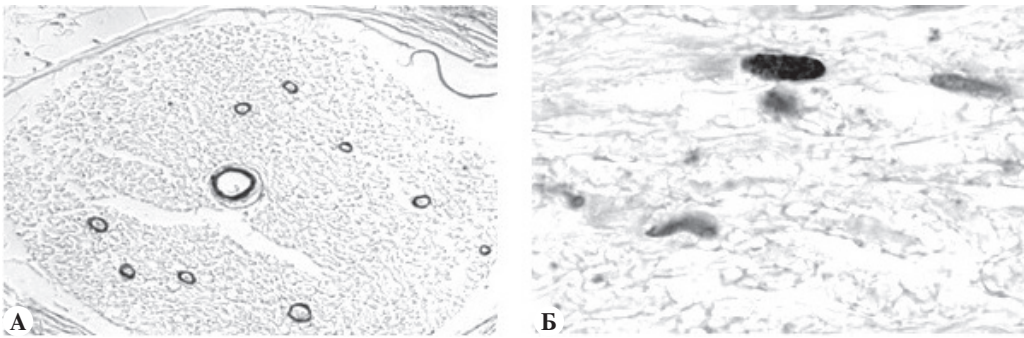


Рис. 2. Кровеносные сосуды (А) и PCNA⁺ нейролеммоцит (Б) в нервном стволе седалищного нерва крысы через 21 сутки после наложения лигатуры. Иммуногистохимические реакции на альфа-актин (А) и PCNA (Б). Докраска толуидиновым синим (Б). Ув.: А – 100×, Б – 1000×

ской реакции на маркер гладкомышечных клеток и перицитов – альфа-актин. Альфа-актин-содержащие клетки, располагающиеся непосредственно под эндотелием сосудов, четко выявлялись на неокрашенном препарате (рис. 2А). Применение этого маркера позволяет выявлять артериолы и венулы самого маленького диаметра. Количественный анализ показал, что число сосудов и их диаметр через 30 суток после лигирования увеличиваются более чем в 1,5 раза по сравнению с интактным нервом.

Заключение. С помощью иммуногистохимического метода выявления периферина, который является менее трудоемким и требует меньше времени, чем электронная микроскопия и изготовление полутонких срезов, изучена регенерация седалищного нерва крысы после травмы. Морфометрический анализ PE⁺ аксонов показал, что через 21 сутки и 30 суток после лигирования наблюдается увеличение доли площади изображения, занятой PE-содержащими структурами, и это связано с повышением числа регенерирующих волокон. Показано, что часть нейролеммоцитов в изученные сроки продолжает пролиферировать. Число содержащих PCNA клеток невелико, что характерно для регенерирующего нерва крысы в отдаленные (21–30 суток) сроки после травмы. Выявление альфа-актин-содержащих гладкомышечных клеток кровеносных сосудов позволяет изучать кровоснабжение нерва. Показано, что количество кровеносных сосудов после травмы увеличивается, что согласуется с данными, полученными другими авторами с применением общегистологических методов. Данная экспериментальная модель может быть использована для оценки восстановления поврежденного нерва после применения различных стимулирующих регенерацию воздействий, в частности, при разработке новых методов клеточной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берснев В. П., Хамзаев Р. И., Борода Ю. И. Результаты эпинеурального шва седалищного нерва // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. 2009. Т. 168, № 1. С. 61–63.
2. Карагяур М. Н., Макаревич П. И., Шевченко Е. К., Стамбольский Д. В., Калинина Н. И., Парфёнова Е. В. Современные подходы к регенерации перифериче-

- ских нервов: перспективы генной и клеточной терапии // *Гены и клетки*. 2017. Т. 12, № 1. С. 6–14.
3. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Петрова Е. С., Карпенко М. Н., Григорьев И. П., Сухорукова Е. Г., Колос Е. А., Гиляров А. В. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство / Под ред. Д. Э. Коржевского. СПб.: СпецЛит, 2014.
 4. Меркулов М. В., Голубев И. О., Крупаткин А. И., Кузьмичев В. А., Бушуев О. М., Ширяева Г. Н., Кутепов И. А. Влияние симпатэктомии на исходы аутонейропластики после травм нервов верхних конечностей // *Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Пирогова*. 2012. № 3. С. 53–58.
 5. Нинель В. Г., Норкин И. А., Пучиньян Д. М., Богомолова Н. В., Коршунова Г. А., Матвеева О. В., Айтемиров Ш. М. Гистоморфологическая оценка эффективности воздействия переменного магнитного поля и импульсного тока на регенерацию седалищного нерва крыс в эксперименте // *Медицинские науки. Фундаментальные исследования*. 2012. № 12. С. 336–340.
 6. Ноздрачев А. Д., Чумасов Е. И. Периферическая нервная система. СПб.: Наука, 1999.
 7. Петрова Е. С., Исаева Е. Н. Изучение влияния аллотрансплантатов эмбриональных закладок спинного мозга крыс на рост регенерирующих волокон нерва реципиента // *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2014. № 6. С. 549–557.
 8. Чельшев Ю. А. Регенерация в нервной системе. Руководство по гистологии: В 2 т. / Под ред. Р. К. Данилова. 2-е изд., испр. и доп. Т. 2. СПб.: СпецЛит, 2011. С. 656–665.
 9. Щудло Н. А., Борисова И. В., Щудло М. М. Морфометрическая оценка эффективности посттравматической регенерации периферического нерва при однократном и повторном курсах электростимуляции // *Морфология*. 2012. Т. 142, № 12. С. 30–35.
 10. Barclay M., Julien J. P., Ryan A. F., Housley G. D. Type III intermediate filament peripherin inhibits neuriteogenesis in type spiral ganglion neurons in vitro // *Neurosci. Lett*. 2010. Vol. 478(2). P. 51–55.
 11. Fairbairn N. G., Meppelink A. M., Ng-Glazier J. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion // *World J. Stem Cells*. 2015. Vol. 7(1). P. 11–26.
 12. Kaucká M., Adameyko I. Non-canonical functions of the peripheral nerve // *Experimental Cell Research*. 2014. Vol. 321. P. 17–24.
 13. Kobayashi M, Ishibashi S, Tomimitsu H, Yokota T, Mizusawa H. Proliferating immature Schwann cells contribute to nerve regeneration after ischemic peripheral nerve injury // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2012. Vol. 71(6). P. 511–519.
 14. Mohammadi R., Azad-Tigran M., Amini K. Dexamethasone topically accelerates peripheral nerve repair and target organ reinnervation: a transected sciatic nerve model in rat // *Injury*. 2013. № 44. P. 565–569.
 15. Monk K. R., Feltri M. L., Taveggia C. New insights on Schwann cell development // *Glia*. 2015. Vol. 63. P. 1376–1393.
 16. Portier M. M., Escurat M., Landon F. Peripherin and neurofilaments: expression and role during neural development // *C. R. Acad. Sci. III*. 1993. Vol. 316(9). P. 1124–1140.

17. *Stewart H. J., Morgan L., Jessen K. R., Mirsky R.* Changes in DNA synthesis rate in the Schwann cell lineage in vivo are correlated with the precursor Schwann cell transition and myelination // *Eur. J. Neurosci.* 1993. Vol. 5(9). P. 1136–1144.
18. *Wakao S., Matsuse D., Dezawa M.* Mesenchymal stem cells as a source of Schwann cells: their anticipated use in peripheral nerve regeneration // *Cells Tissues Organs.* 2014. Vol. 200(1). P. 31–41.

*Плакса И. Л.^{1,2}, Мавликеев М. О.³, Бозо И. Я.^{1,4},
Абызова М. С.³, Деев Р. В.^{1,5}*

РЕГЕНЕРАЦИОННЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ В ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ ПАРАОССАЛЬНЫХ ГЕМАТОМАХ У ЧЕЛОВЕКА

¹ПАО «Институт стволовых клеток человека» (директор – А. А. Исаев), Москва;

²Отделение патологической анатомии (заведующий – Н. А. Савёлов) Московской городской онкологической больницы № 62 ДЗМ, Москва;

³Кафедра морфологии и общей патологии (заведующий – проф. А. П. Киясов) Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань;

⁴Кафедра хирургической стоматологии (заведующий – проф. А. Ю. Дробышев) Московского государственного медико-стоматологического университета им. А. И. Евдокимова, Москва;

⁵Кафедра патологической анатомии с курсом судебной медицины (заведующий – Р. В. Деев) Рязанского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова, Рязань, e-mail: i.plaksa2014@yandex.ru

Несмотря на широкое внедрение в клиническую практику современных методов хирургического лечения переломов и костных дефектов, нарушение консолидации различной степени выраженности развивается у 5–48 % пациентов в зависимости от локализации повреждения и его особенностей [8, 14], что обуславливает необходимость проведения фундаментальных исследований регенерации костной ткани, которые должны быть направлены на определение «мишеней» для терапевтической коррекции нарушения консолидации. Теоретические основы учения о регенерационном гистогенезе позволяют полнее раскрыть сложные процессы, которые происходят в посттравматических регенератах со сложной клеточно-дифферонной и пространственно-временной организацией тканей [1, 2, 4, 5].

В связи с этим целью настоящей работы является исследование межклеточных молекулярных механизмов репаративной регенерации костной ткани при ее травматическом повреждении с позиции современной концепции о регенерационном гистогенезе.

Объект исследования – параоссальные гематомы, являющиеся удобным материалом для изучения ранних этапов естественного остеогистогенеза в периостальной части костного регенерата. Гематомы были получены от пациентов в ходе хирургического лечения в течение первых 12 суток после перелома (n = 12;