

УДК 612.112.9:616.833.58–003.93–092.9

## ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ СОБАК ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА

Щудло Н.А., Щудло М.М., Сбродова Л.И.

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия»  
им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, Курган, e-mail: nshchudlo@mail.ru

Проведен анализ морфологии лимфоцитов периферической крови и структурных характеристик регенерации нерва после перерезки и микрохирургического шва седалищного нерва у 18 собак. Абсолютное и относительное содержание лимфоцитов не выходило за пределы диапазонов нормы в течение двух месяцев опыта ни на одном из 10 сроков исследования. У 12 собак содержание реактивных лимфоцитов в ближайшем послеоперационном периоде не превышало 20%, у остальных шести варьировало от 27 до 66%. Выделенные группы значительно отличались выраженностью колебаний абсолютного и относительного содержания лимфоцитов, нейропатических проявлений и лимфоцитарной экстравазации в эпинеурии регенерирующего нерва, а также количественными показателями регенерации.

**Ключевые слова:** нерв, регенерация, морфометрия, периферическая кровь, лимфоциты

## VARIANTS OF CHANGES IN MORPHOLOGY OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES FOR CANINE SCIATIC NERVE INJURY AND REGENERATION

Shchudlo N.A., Shchudlo M.M., Sbrodova L.I.

FSBI «Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF  
Ministry of Health, Kurgan, e-mail: nshchudlo@mail.ru

Changes in morphology of peripheral blood lymphocytes and structural characteristics of nerve regeneration after sciatic nerve transection and microsurgical suturing in 18 dogs were analyzed. Absolute and relative lymphocytes content were in normal ranges in 10 terms of research. In 12 dogs the rate of reactive lymphocytes in the nearest postoperative period didn't exceed 20%, in next six dogs varied from 27 to 66%. The divided groups significantly differed in oscillations of absolute and relative lymphocytes contents, neuropathic signs and lymphocytic epineurial extravazation and also numerical parameters of nerve regeneration.

**Keywords:** nerve, regeneration, morphometry, peripheral blood, lymphocytes

Несмотря на развитие реконструктивно-восстановительной хирургии и восстановительной медицины, результаты лечения травм нервов в клинике у многих пациентов далеки от удовлетворительных. Одно из объяснений – сложность молекулярно-биологических механизмов, лежащих в основе взаимодействия нейронов, глиальных и иммунных клеток, обеспечивающих регенерацию повреждённых нервных волокон.

Многочисленные экспериментальные исследования и обзоры посвящены роли клеток воспалительного ряда в аксональной регенерации и генезе нейропатической боли: нейтрофилы мигрируют в зону повреждения нерва и выделяют цитокины, рекрутирующие гематогенные макрофаги, но после первых суток подвергаются апоптозу; макрофаги помимо участия в валлеровской дегенерации совместно с мастоцитами регулируют реваскуляризацию и ремоделирование межклеточного матрикса, а также дополнительное рекрутирование лейкоцитов, в том числе лимфоцитов [3, 5]. Т-лимфоциты, инфильтрирующие повреждённый нерв через 3 дня после повреждения и достигающие пика концентрации в период от 14 до 28 дней, выделяют про- и противовоспалительные цитокины, регулируя деятельность макрофагов и промоти-

руя аксональную регенерацию [4]. Получен положительный эффект параневральной трансфузии культивированных лимфоцитов на скорость проведения по лицевому нерву, регенерирующему после перерезки и шва [10]. Сведения об изменениях лимфоцитов при повреждениях и регенерации нервов получены в опытах на грызунах. Неизвестна их роль в нейрорегенерации у других видов животных. Данные об изменениях лимфоцитов периферической крови при повреждении и регенерации нервов в доступной литературе также отсутствуют.

**Цель работы** – выявить количественные и качественные изменения лимфоцитов периферической крови при повреждении и регенерации седалищного нерва у собак.

### Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 18 взрослых беспородных собаках, оперированных под внутривенным барбитуровым наркозом в асептических условиях операционной. Из внепроекторного доступа обнажили седалищный нерв на уровне средней трети бедра. Затем выполняли его полную перерезку ножницами Millesi и эпи-перинеуральный шов с применением микрохирургической техники. Использовали инструментарий фирмы Aescular AG (Германия), нити фирмы Ethicon LTD (UK), марка 8/0 Ethilon, оптическое увеличение 8-16х операционного микроскопа Zeiss OPMI-6 фирмы Opton (Германия). Животные

содержались в виварии, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения Российской Федерации к работе экспериментально-биологических клиник, а также «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом.

В период от 3 до 63 дней после операции проводили еженедельное исследование морфологии периферической крови. Кровь забирали из подкожной латеральной вены голени. Количество лейкоцитов в периферической крови подсчитывали в камере Горяева, лейкоцитарную формулу – в мазке крови, окрашенной по Романовскому-Гимза, который изготавливали из дозированного объёма крови в виде монослоя. По стандартной методике определяли аб-

солютное и относительное содержание лимфоцитов в периферической крови. С целью оценки содержания реактивных лимфоцитов применили алгоритм компьютерного анализа цифровых изображений лимфоцитов, описанный нами ранее [2], однако в данном исследовании оценивали процентное содержание реактивных лимфоцитов только двух типов: R1 и R2. К типу R1 относили малые и средние лимфоциты до 10 мкм диаметром со сниженным ядерно-цитоплазматическим отношением (ободок цитоплазмы > 2 мкм), цитоплазма тёмно-базофильная с мелкими гранулами или вакуолями, ядро как правило эксцентричное (рис. 1) с глубокими вдавлениями или дольчатое. К реактивным светлым большим лимфоцитам типа R2 относили клетки более 12 мкм диаметром с обильной светлой цитоплазмой и базофилией в основном по контуру клетки; многие из этих клеток имели полигонально-отростчатую форму, обтекающую эритроциты (рис. 2).

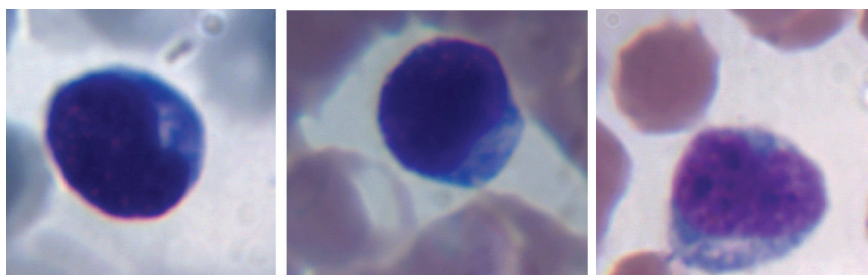


Рис. 1. Реактивные лимфоциты первого типа в мазке периферической крови собак. Окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1250х

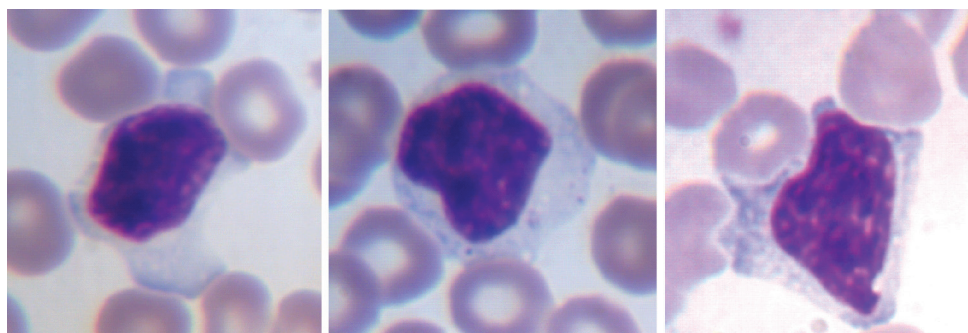


Рис. 2. Реактивные лимфоциты второго типа в мазке периферической крови собак. Окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение 1250х

С учётом различий в содержании реактивных лимфоцитов собак распределили в две группы, о чём более подробно написано в разделе «Результаты». Через два месяца после операции шесть собак из 18 (по три от каждой группы) эвтаназированы с целью морфологического исследования регенерирующего нерва, остальные приняли участие в других экспериментах. Для гистологического исследования иссекли седалищный нерв в пределах оперированного бедра и его ветви (большеберцовый и поверхностный малоберцовый нервы) на голени. После альдегидно-осмиевой фиксации кусочки нервов измельчали, заливали в эпоксидные смолы. Поперечные полутонкие (толщиной 1 мкм) срезы нервов дистальнее уровня швов и соответствующих участков интактных нервов получали на ультратомах фирмы LKB (Швеция)

и окрашивали по Уикли. Микроскопию срезов проводили на больших исследовательских микроскопах фирмы «Ortop» (Германия), оцифровку и анализ изображений – на аппаратно-программном комплексе «ДиаМорф» (Москва). С каждого нерва оцифровывали 30 полей зрения (увеличение 1250) с изображениями не менее 300 миелинизированных нервных волокон (Mf). Измеряли диаметры волокон (Dmf), их аксонов (Dax), толщину миелина (Lmyel). Используя электронную версию тестовой решетки [1], определяли объёмную плотность нейральных элементов (VVneur). Рассчитывали численные плотности миелинизированных нервных волокон (NAmf) и ядросодержащих профилей лимфоцитов в составе нервных волокон (NAnc), процентную долю нервных волокон с признаками вторичной дегенерации (Deg%). Гипо-

тезы о различиях проверяли с помощью критериев Вилкоксона-Манна-Уитни и Пагуровой в компьютерной программе Attestat, версия 9.3.1 (разработчик И.П.Гайдышев, свидетельство об официальной регистрации Роспатента № 2002611109).

### Результаты исследования и их обсуждение

Анализ содержания реактивных лимфоцитов через 3 и 7 суток после операции выявил неоднородность выборки, что заставило распределить исследуемых животных на две группы. У 12 собак из 18 суммарная доля R1+R2 не превышала 20%, причём доля  $R2 \leq R1$  (группа 1). У остальных шести собак R2 было значительно больше R1, а сумма R1+R2 варьировала от 27 до 66% (группа 2). Клиническое наблюдение показало, что группа 2 отличается от группы 1 более выраженной аллодинией и гиперальгезией. В дооперационном периоде и в сроки более 7 суток опыта указанные группы не различались по содержанию реактивных лимфоцитов.

Абсолютное и относительное содержание лимфоцитов у собак обеих групп не выходило за пределы референтных диапазонов, однако дооперационные значения и динамика изменений этих показателей в выделенных группах имела существенные различия (рис. 3). Для группы 1 характерны более высокие дооперационные значения содержания лимфоцитов и умеренно выраженные их колебания в послеоперационном периоде, через одну и четыре недели после операции наблюдаются повышения абсолютного содержания по сравнению с дооперационным уровнем. В группе 2 абсолютное и относительное содержание лимфоцитов в дооперационном периоде имеет меньшие значения, чем в группе 1, а в послеоперационном периоде подвержены значительным колебаниям. Пики абсолютного содержания лимфоцитов в группе 2 наблюдаются через две и пять недель после операции, через шесть недель после операции происходит значительное снижение показателя, а затем следует его прирост до конца опыта.

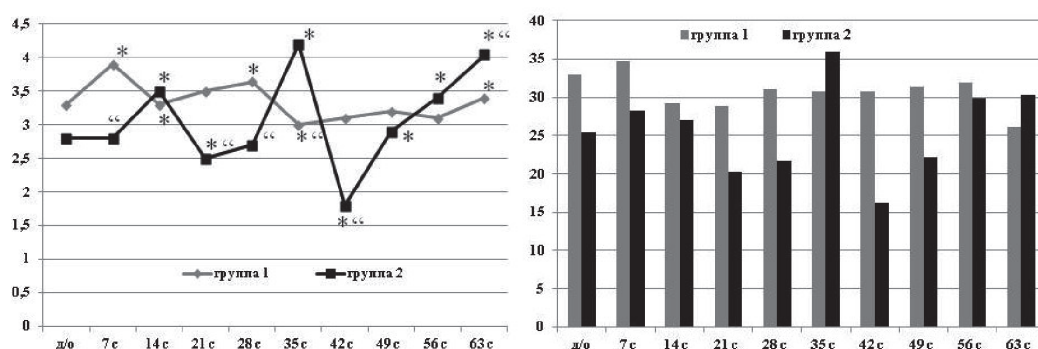


Рис. 3. Динамика изменений содержания лимфоцитов периферической крови. Абсциссы – срок опыта (до/о – до операции, с – сутки опыта). Ординаты: слева – значения абсолютного содержания (в  $\times 10^9/l$ ), справа – относительного содержания (в процентах): \* – статистически значимая разница значения параметра по сравнению с предыдущим сроком опыта; \*\* – статистически значимая разница между группами ( $p < 0,05$ )

Через 9 недель после операции в эндоневрии оперированного седалищного нерва и его ветвей на голени у животных обеих групп обнаружено большое количество регенерирующих миелинизирующихся и безмиелиновых волокон (рис. 4). Наряду с регенерирующими нервными волокнами берцовые нервы содержат значительное количество продуктов валлеровской дегенерации – нагруженных липидными вакуолями макрофагов в эндоневрии и расширенных субпериневральных пространствах, многие периневральные клет-

ки тоже содержат липидные вакуоли. Основное визуальное отличие микропрепаратов животных группы 2 от группы 1 – более часто встречающиеся фигуры аксональной атрофии и вторичной дегенерации нервных волокон. Кроме того в отличие от группы 1 у животных группы 2 вокруг некоторых кровеносных сосудов эпинеурия обнаружены скопления клеток воспалительного ряда (рис. 5). Состояли они главным образом из лимфоцитов, многие из которых были с признаками активации или деления.

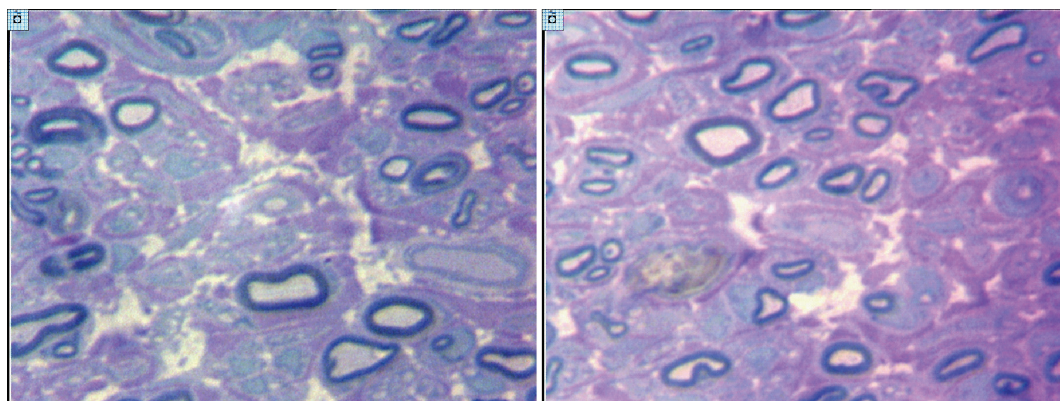


Рис. 4. Фрагменты поперечных полутонких срезов дистального отрезка седалищного нерва через 2 месяца после перерезки и микрохирургического шва. Регенерировавшие безмиелиновые и миелинизирующиеся нервные волокна в эндоневрии. Слева – собака из группы 1, справа – из группы 2. Окраска метиленовым синим-основным фуксином. Увеличение 1250х

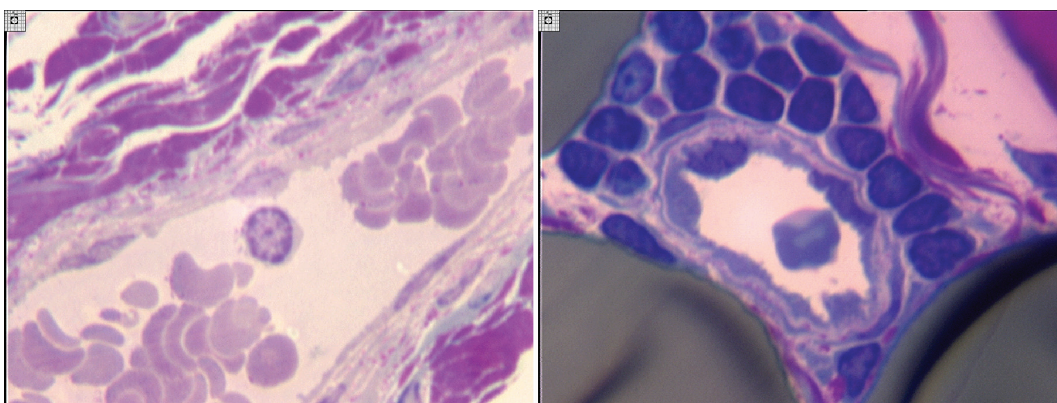


Рис. 5. Фрагменты поперечных полутонких срезов дистального отрезка седалищного нерва через 2 месяца после перерезки и микрохирургического шва. Кровеносные сосуды (вены) в эпиневррии. Слева – собака из группы 1, справа – из группы 2. Окраска метиленовым синим-основным фуксином. Увеличение 1250х

Морфометрический анализ (таблица) показал, что объёмная плотность нейральных элементов в эндоневрии дистального отрезка регенерирующего нерва и численная плотность ядер лимфоцитов в составе регенерирующих волокон достоверно больше в группе 2 – на 43,9% и 30,6% соответственно, но численная плотность регенерировавших миелинизированных волокон на 13,2% меньше.

Средний диаметр регенерировавших миелинизированных нервных волокон и их аксонов, а также толщина миелиновых оболочек достоверно больше в группе 2 по сравнению с группой 1 – на 12,8%, 10,9% и 14,7% соответственно. Среднее аксо-миелиновое отношение больше в группе 1, а доля вторично дегенерировавших миелинизированных нервных волокон – в группе 2.

Средние стереологические параметры эндоневрия дистального отрезка регенерировавшего нерва и морфометрические показатели миелинизирующихся регенерировавших нервных волокон ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ )

Параметр	VVneur	NANuc	NAMf	Dmf	Dax	Lmyel	G	Deg%
Группа 1	37,8%	9140 ±920	26417 ± 1125	3,20 ±0,07	1,84 ±0,05	0,68 ±0,01	0,78	1,9%
Группа 2	54,4%*	11938* ±848	22933* ± 986	3,61** ±0,07	2,04** ±0,05	0,78* ±0,01	0,57*	4,8%*
Δ%	+43,9%	+30,6%	-13,2%	+12,8%	+10,9%	+14,7%	-26,9%	

Статистически значимая разница между группами: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

В результате исследования установлено, что при регенерации седалищного нерва после перерезки и микрохирургического шва у собак наблюдаются два варианта изменений качественного состава и количественного содержания лимфоцитов периферической крови. Различия касаются прежде всего представительства реактивных лимфоцитов в первую неделю после операции. Термин «реактивные лимфоциты» используется для обозначения их доброкачественных трансформаций, которые происходят под влиянием антигенной стимуляции и включают увеличение объема ядра и цитоплазмы, появление вдавлений ядра, вакуолей, гранул, изменение структуры хроматина и наличие выраженных ядрышек; эти лимфоциты осуществляют первичные либо Т-хелперные иммунные реакции в очагах воспаления [9]. Известно, что одни типы хелперов (Th1) опосредуют провоспалительный ответ и неконтролируемые вторичные повреждения тканей, другие (Th2) противодействуют им [8]. Именно последним отводится благотворная роль в нейропротекции и нейрорегенерации [6]. В то же время характер влияния и лимфоцитов, и макрофагов на выживание и регенерацию аксонов различен у животных разных генетических линий [7].

Таким образом, при незначительном представительстве реактивных форм лимфоцитов в первую неделю после операции их общее абсолютное и относительное содержание в периферической крови на протяжении последующих восьми недель меняется незначительно. Если доля реактивных лимфоцитов в первую неделю после операции велика (в данном исследовании 27% и более), общее содержание лимфоцитов в последующий период наблюдения колеблется в широких пределах. Такие колебания отражают перераспределения лимфоцитов из крови в ткани регенерирующего нерва, поэтому выраженные лимфоцитарные экстравазаты в этой группе животных представляется закономерным. Гистоморфометрический анализ свидетельствовал о более интенсивном глиозе и невротизации дистального отрезка нерва, ускоренной дифференцировке регенерировавших миелинизированных нервных волокон, однако представительство нервных волокон с признаками аксональной атрофии и вторичной дегенерации у таких животных также было большим. С учётом сходства морфологии реактивных лимфоцитов у эксперимен-

тальных животных и человека [9] выявленные взаимосвязи могут быть использованы в клинической практике для разработки скрининговых тестов, определяющих показания для углублённого иммунологического обследования и иммунотерапии, направленной на оптимизацию нейрорегенерации.

### Заключение

Повышение количества реактивных лимфоцитов в периферической крови в первую неделю после повреждения и шва седалищного нерва у собак ассоциировано с последующими более выраженными колебаниями общего количества лимфоцитов, нейронапатическими проявлениями, периваскулярной лимфоцитарной инфильтрацией в эпиневррии, более активной регенерацией и дифференцировкой нервных волокон, но риском истощения компенсаторно-приспособительных возможностей нейронов, о чём свидетельствуют признаки аксональной атрофии и вторичной дегенерации значительной части регенерирующих волокон.

### Список литературы

1. Щудло М.М., Ступина Т.А., Щудло Н.А. Количественный анализ метахромазии суставного хряща в телепатологии // Известия Челябинского НЦ (УРО РАН). – 2004. – Специальный выпуск (25). – С. 17-22.
2. Щудло М.М., Щудло Н.А., Сбродова Л.И. Применение телематики для экспресс-анализа морфологии лимфоцитов периферической крови при посттравматической регенерации нерва // Украинский журнал телемедицины – медицинской телематики, 2013. – Т.11, №1. – С.153-157.
3. Benowitz L.I., Popovich P. Inflammation and axon regeneration // *Current Opinion in Neurology*, 2011. – V.24, 6. – P. 577-583.
4. Functional recovery and facial motoneuron survival are influenced by immunodeficiency in crush-axotomized mice. / T. Beahrs, L. Tanzer, V.M. Sanders, K.J. Jones // *Exp Neurol.*, 2010. – V. 221. – P. 225–230. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.11.003.
5. Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system // *J. Bone Joint Surg. [Br]*, 2005. – V. 87-B. – P. 1309-1319.
6. Hendrix S., Nitsch R. The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration // *J. Neuroimmunology*, 2007. – V. 184. – P. 100–112.
7. Influence of macrophages and lymphocytes on the survival and axon regeneration of injured retinal ganglion cells in rats from different autoimmune backgrounds / Luo J.-M., Zhi Y., Chen Q., Cen L.-P., Zhang C.-W., Lam D. S. C., Harvey A. R., Cui Q. // *European J. of Neuroscience*, 2007. – V. 26. – P. 3475–3485. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05957.x
8. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease // *Altern. Med. Rev.*, 2003. – №8. – P.223–246.
9. Levy R.A., Johari V.P., Pantanowitz L. Non-Neoplastic Disorders of White Blood Cells, in Non-Neoplastic Hematopathology and Infections (eds H. D. Cualing, P. Bhargava and R. L. Sandin), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2012 – doi: 10.1002/9781118158562.ch1.
10. The effect of peripheral blood lymphocyte cell cultured and induced in vitro on the facial nerve regeneration / Wang L., Ge P., Liu Y., Yu X., Gao Z. // [Article in Chinese] *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.*, 2006. – V. 20, №16. – 755-757.