

УДК: 808(075.8)

К вопросу адаптации параневральных соединительнотканых структур периферических нервов при повышенных физических нагрузках или ограничении движений

Затолокина М.А.¹, Кузнецов С.Л.²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 305041, Курск, ул. К. Маркса, д. 3

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Актуальность. Параневральные соединительнотканые структуры, образованные совокупностью фасциально-клетчаточных пространств и волокнистых образований и расположенные между эпиневрием и эпимизием прилежащих мышц, крайне тесно морфофункционально взаимосвязаны с нервным стволом. Однако, данных об адаптационных возможностях параневральных структур в условиях разной интенсивности двигательной активности конечности, в литературе недостаточно. **Целью** данной работы явилось изучение реактивных изменений параневральных структур периферических нервов ветвей плечевого сплетения в условиях повышенной и пониженной двигательной активности грудной конечности и определение их адаптационного резерва. **Методы.** Морфологическое изучение параневральных соединительнотканых структур периферических нервов ветвей плечевого сплетения было проведено на 700 органокомплексах, состоящих из нервных стволов, кровеносных сосудов, окружающих мышц и соединительной ткани. Полученные микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, по Ван Гизону, альтициановым синим, проводили иммуногистохимическое исследование и морфометрию. **Результаты.** В параневральных соединительнотканых структурах реактивные изменения были менее выражены, чем в эпиневррии. В частности, при гипокинезии в эпиневррии уменьшение объема долек белой жировой ткани происходило в начале эксперимента, а в фасциально клетчаточных пространствах параневррия к окончанию исследования. В клеточном составе абсолютное большинство приходилось на долю клеток фибробластического ряда, при этом количество клеток-резидентов было большим в параневральных структурах. При гиперкинезии, большее количество фибробластов и фиброцитов было выявлено в эпиневррии, а макрофагов и тучных клеток в параневральной ткани. По данным иммуногистохимического исследования в условиях гипокинезии степень пролиферативной активности клеток, находящихся в G1-, G2-, S- и M-фазах клеточного цикла, начиная с 21 суток эксперимента, была в 1,3 раза выше в параневральной соединительнотканной ткани, чем в эпиневральной. В условиях гиперкинезии, на фоне увеличения значений индекса пролиферативной активности, большее количество клеток, экспрессирующих Ki-67, визуализировалось в эпиневррии, что свидетельствовало об активно протекающей клеточной пролиферации и незавершенности процесса адаптации эпиневральных структур, в сравнении с параневральными соединительноткаными структурами. **Заключение.** Полученные в работе данные свидетельствуют о более выраженном адаптационном резерве параневральных соединительнотканых структур, чем в эпиневральной соединительной ткани, как в условиях гипокинезии, так и в условиях гиперкинезии.

Ключевые слова: параневральные соединительнотканые структуры, гипокинезия, гиперкинезия, индекс пролиферативной активности Ki-67, тучные клетки.

Для цитирования: Затолокина М.А., Кузнецов С.Л. К вопросу адаптации параневральных соединительнотканых структур периферических нервов при повышенных физических нагрузках или ограничении движений. Патогенез. 2018; 16(1): 42—50

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.01.42-50

Для корреспонденции: Затолокина Мария Алексеевна, e-mail: marika1212@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 18.09.2017

On adaptation of paraneural, connective-tissue structures of peripheral nerves to strenuous exercise or limitation of movements

Zatolokina M.A.¹, Kuznetsov S.L.²

¹ Kursk Medical State University, Karla Marksa Str. 3, Kursk 305041, Russian Federation

² I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation

Paraneural connective-tissue structures consisting of a combination of fascial-cell spaces and fibrous formations and located between the epineurium and epimysis of adjacent muscles are extremely closely morphologically related with the neural stem. However, data on the adaptive capabilities of the paraneural structures under conditions of different intensity of the motor activity of the limb are not enough in the literature. The aim of this work was to study the reactive changes in the paraneural structures of the peripheral nerves of the branches of the brachial plexus under conditions of increased and decreased motor activity of the thoracic extremity and the determination of their adaptive reserve. Methods. The morphological study of reactive changes in paraneural connective tissue structures of peripheral nerves performed on a model of thoracic limb hyperkinesia or hypokinesia showed that adaptive processes were more clearly pronounced in paraneural structures than in the epineurium. Results. According to the immunohistochemical study in hypokinesia, the degree of proliferative activity of cells in G1, G2, S, and M phases of the cell cycle was 1.3 times higher in the paraneural connective tissue than in the epineural tissue starting from the 21st day of experiment. In hyperkinesia associated with the increasing index of proliferative activity, a greater number of cells expressing Ki-67 was visualized in the epineurium than in paraneural connective tissue structures. Conclusion. The data obtained in the work indicate a more pronounced adaptive reserve of the paraneural connective tissue structures than in the epineural connective tissue, both in hypokinesia and in hyperkinesia.

Key words: paraneural connective tissue structures, hypokinesia, hyperkinesia, proliferative activity index Ki-67, mast cells.

For citation: Zatulokina M.A., Kuznetsov S.L. [On adaptation of paraneural, connective-tissue structures of peripheral nerves to strenuous exercise or limitation of movements]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(1): 42–50 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.01.42-50

For correspondence: Zatulokina Mariya Alekseeva, e-mail marika1212@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 18.09.2017

Введение

Определенным резервом адаптации к действию факторов внешней среды обладают все биологические ткани организма. На внешнее воздействие ткани живых организмов отвечают реакциями приспособительного характера, т.е. проявляют реактивность как свойство адаптивности живых систем. При этом проводниковый и стромальный компоненты периферических нервов не являются исключением. В литературных источниках отечественных и зарубежных авторов представлено достаточное количество данных о структурно-функциональных особенностях в норме и патологии проводникового компонента периферических нервов и окружающих их соединительнотканых оболочках, таких, как: эндо-, пери- и эпинеурии [1–3]. Относительно строения, функциональной роли и возможного механизма работы параневральных соединительнотканых структур (ПСС), данные единичные и разрозненные [4, 5]. Остается открытым вопрос об адаптационных возможностях параневральных структур к повышенным физическим нагрузкам или ограничению движений. Решение указанных проблем позволит получить не только, новые фундаментальные данные о параневральных структурах, но и возможность управлять этими структурами для сокращения сроков реабилитации после травм или оперативных вмешательств на стволах периферических нервов в практической медицине.

Целью данной работы явилось изучение реактивных изменений ПСС периферических нервов ветвей плечевого сплетения в области средней трети плеча в экспериментально созданных условиях повышенной и пониженной двигательной активности грудной конечности и определение их адаптационного резерва.

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование было выполнено на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г. Перед началом эксперимента лабораторные животные в течение двух недель находились на карантине в условиях вивария Курского государственного медицинского университета. Все манипуляции с позвоночными животными проводены в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), с правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003) и законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 104679-ГД от 01.12.1999 г.

Данная работа выполнена в соответствии с основным планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России и имеет номер государственной регистрации АААА-А16-116040760097-1.

Лабораторные животные (175 особей) были разделены на три группы, одна группа (70 животных) содержалась в условиях гипокинезии, вторая группа (70 животных) находилась в условиях гиперкинезии и третья группа составила (35 животных) контроль. Условия гипокинезии создавались путем помещения крыс в гипокинетические камеры (патент РФ на полезную модель (№82085 от 20.04.2009 г. «Гипокинетическая камера для мелких лабораторных животных»)). Условия гиперкинезии были реализованы путем ежедневного пребывания (плавания) животных в воде, продолжительностью 180 мин. Подопытных животных выводили из эксперимента на 7-е, 14-е, 21-е, 30-е, 45-е, 60-е и 90-е сутки от начала исследования по 10 особей и 2–3 контрольных животных соответственно для каждой подгруппы. Для изучения изменений пара-

невральных соединительнотканых структур периферических нервов ветвей плечевого сплетения, проводили отсечение передних (грудных) конечностей по плечевому суставу и в области средней трети плеча по латеральной поверхности иссекали органокомплекс, состоящий из мышц, кровеносных сосудов и нервных стволов с окружающей соединительной тканью. Всего для исследования было получено 700 органокомплексов.

Для морфологического изучения реактивных изменений параневральной соединительной ткани, в области средней трети плеча на латеральной поверхности, с использованием микрораспатора (рационализаторское предложение № 1762-07 от 20.05.2007 г.), проводили иссечение нервно-мышечного органокомплекса. Из полученных органокомплексов, используя препаративный столик (патент РФ №166216 от 30 марта 2015 г. «Препаративный столик для топографо-анатомического изучения и взятия материала для гистологического исследования»), изготавливали образцы размерами 10x10 мм, которые фиксировали погружением в 10% раствор формалина (рН 7,2–7,4) при комнатной температуре в течение 10 суток. Затем, материал заливали в парафин по стандартной методике, используя предложенные способы: «Способ удаления излишков парафина из металлических кассет» № 1764-07 от 18.05.2007 г. и «Способ распределения гистологического материала, залитого в парафин на деревянных блоках» № 1908-10 от 19.03.2010 г. Микротомировали и изготавливали поперечные гистологические срезы сосудисто-нервных пучков (СНП) с окружающими мышцами. Для обзорного изучения структурной организации СНП, срезы окрашивали гематоксилином и эозином; для изучения морфологических особенностей соединительной ткани, образующей оболочки нервов, в том числе и параневральные структуры — по Маллори, пикрофуксином по Ван Гизону и альциановым синим для выявления тучных клеток.

Окрашенные гистологические препараты микроскопировали и фотографировали с помощью оптической системы, состоящей из микроскопа Leica CME и окуляр камеры DCM-510 на увеличениях x100 и x400 крат с документированием снимков в программе FUTURE WINJOE, входящей в комплект поставки окуляр-камеры.

В поперечных гистологических срезах, используя «Способ визуализации морфологических структур с использованием макрофотографий» № 1907-10 от 19.03.2010 г., при световой микроскопии, изучали топографические особенности наличия и степень развития параневральных соединительнотканых структур. На микрофотографиях, с помощью программы Imago J, измеряли: площадь поперечного сечения сосудисто-нервных пучков, нервных стволов, площадь соединительной ткани, толщину общего фасциального футляра и отходящих стропных элементов, толщину эндоневрия, периневрия. В соединительной ткани эпиневирия и параневральных структур проведена количественно-качественная оценка клеточного компонента. В популяции тучных клеток, используя классификацию Д.П. Линдера 1976 г. и 1980 г., и способ оценки тучных клеток Г.В. Порядина 1991 г., было выделено четыре типа тучных клеток. Вычисляя отношение количества дегранулированных клеток к общему количеству анализированных клеток, рассчитывали индекс дегрануляции.

Для оценки степени пролиферативной активности клеток эпи- и параневральной соединительной ткани при разной степени двигательной активности грудной конечности был использован иммуногистохимический метод (ИГХ), который проводили в соответствии со стандартными протоколами системы визуализации Ultra-Vision Quanto Пероксидаза Quanto и ДАБ Quanto. Использовали моноклональные антитела к маркеру клеточной пролиферации Ki-67 (Thermo Fisher Scientific), позволяющие выделить клетки, находящиеся в активной фазе клеточного цикла. Для проведения ИГХ парафиновые срезы толщиной 5–6 мкм располагали на предметных стеклах (Super Frost Plus), предварительно обработанные поли-L-лизинном, и высушивали в течение 12 часов при $t = 37^{\circ}\text{C}$. Затем регидратировали и осуществляли демаскировку антигенов кипячением образцов в 0,01 М цитратном буфере (рН 6.0) на водяной бане. Для инактивации эндогенной пероксидазы на срезы наносили 1–3% раствор H_2O_2 в течение 10 мин. Инкубацию с первичными кроличьими антителами Ki-67 (M3060, SP6, 1:200, «Dako») проводили при комнатной температуре в течение часа. Визуализацию результатов после иммуногистохимической реакции с моноклональными кроличьими антителами осуществляли с помощью непрямого стрептавидин-биотинового пероксидазного метода («Dako», LSAB+Kit, HRP), в качестве хромогенного субстрата был использован раствор диаминобензидина («Dako», Liquid DAB+). С целью визуализации всех клеток соединительной ткани докрашивали ядра гематоксилином. Для исключения незначительных отклонений в ходе иммуногистохимической реакции все этапы выполнялись одномоментно, использовались одни и те же буферные растворы, инкубационные смеси и растворы антител. Все временные промежутки были одинаковыми. Учет результатов проводили при микроскопии x400 крат. Регистрировали клетки, осуществляющие экспрессию белка Ki-67. Подсчет количества Ki-67 позитивных клеток проводили на 100 клеток при анализе не менее 10 полей зрения. Индекс пролиферативной активности (индекс Ki-67) вычисляли как соотношение количества специфически окрашенных ядер к общему количеству всех ядер и выражали в процентах.

Статистическую обработку полученных цифровых данных выполняли в соответствии с современными представлениями о правилах математической обработки данных медицинских исследований [6, 7]. Все массивы данных были проверены на соответствие нормальному распределению, по результатам проверки был использован непараметрический критерий — U-критерий Манна—Уитни. Учитывая допустимый для экспериментальных медико-биологических исследований уровень $p < 0,05$, для подтверждения статистической гипотезы был выбран именно такой уровень значимости. Для описания выборочной совокупности данных использовали средние значения со стандартной ошибкой средних показателей ($M \pm SE$), как традиционную для гистологических исследований форму.

Результаты и обсуждение

Адаптация грудной конечности к определенной функции влечет за собой морфологические перестройки различных систем конечности, в том числе и нервной. Усилив или ослабив определенную адаптацию конечности

(например, локомоция в воде — ежедневное плавание в течение 180 мин или ограничение подвижности в результате пребывания в гипокинетической камере) и проследив за изменениями в структуре нерва, можно судить о том, за какую функцию ответственна та или иная структура и какова ее роль в целом. Именно такое сочетание эксперимента с морфологическим исследованием и позволило определить структурно-функциональные особенности ПСС в условиях гипо- и гиперкинезии.

Выбор белых лабораторных крыс в качестве экспериментальных животных, был обоснован достаточной степенью развития ПСС и хорошей их визуализацией у представителей отряда грызуны, по данным ранее проведенного исследования [8, 9]. Наиболее ярко выраженные изменения были выявлены в нерве разгибателей, что и послужило основанием для дальнейшего изучения пролиферативной активности клеток (определяли Ki-67 положительные клетки) ПСС и эпиневерия в сравнительном аспекте.

Проведенное морфологическое исследование показало, что нерв разгибателей был образован 5 нервными пучками на правой конечности и 4 на левой конечности. Форма СНП была веретеновидной, в области «брюшка» располагался самый крупный нервный пучок, площадь поперечного сечения которого составила $0,508 \pm 0,001 \text{ мм}^2$ и $0,541 \pm 0,001 \text{ мм}^2$ на правой и левой конечности соответственно. На периферии СНП визуализировались крупные кровеносные сосуды и мелкие нервные пучки разного диаметра, площадь которых варьировала от $0,046 \pm 0,000 \text{ мм}^2$ до $0,149 \pm 0,001 \text{ мм}^2$ на правой конечности и от $0,050 \pm 0,001 \text{ мм}^2$ до $0,135 \pm 0,001 \text{ мм}^2$ на левой конечности. Площадь поперечного сечения СНП была больше на правой конечности и составила — $3,059 \pm 0,012 \text{ мм}^2$, на левой — $2,755 \pm 0,004 \text{ мм}^2$ ($p < 0,05$). Площадь, занимаемая окружающей соединительной тканью, была в 1,2 раза больше справа, при этом значение соотношения площади нер-

вной ткани к соединительной было в 1,3 раза меньше, чем в нервах сгибателей. Выявленное асимметричное преобладание площади поперечного сечения СНП является проявлением билатеральной асимметрии в строении периферических нервов в области средней трети плеча.

Структуры параневрия хорошо визуализируются. Все компоненты СНП окружены общим фасциальным футляром (FF), толщина которого достоверно ($p < 0,05$) больше в 1,4 раза, чем в нервах сгибателей (FF разгибателей справа = $4,67 \pm 0,013 \text{ мкм}$, слева = $4,08 \pm 0,001 \text{ мкм}$ и FF сгибателей справа = $3,43 \pm 0,001 \text{ мкм}$ и слева = $2,96 \pm 0,004 \text{ мкм}$). Отличим в строении ПСС в сравнении с нервами сгибателей, является достоверно большее количество белой жировой ткани с тенденцией к слиянию в дольки. Нервные пучки покрыты периневрием, с хорошо выраженной послойностью. Толщина периневерия, без достоверных отличий между конечностями составила $5,234 \pm 0,015 \text{ мкм}$ и $5,562 \pm 0,012 \text{ мкм}$ на левой и правой конечности соответственно. В соединительной ткани эпиневерия, расположенной между нервными пучками, визуализировались мелкие кровеносные сосуды и нервные стволы. В межпучковом эпиневерии волокна соединительной ткани расположены более рыхло и хаотично, чем в наружном надпучковом эпиневрием. Соединительная ткань эпиневерия плавно переходит в окружающую нерв, параневральную соединительную ткань, волокна которой более структурированы и упорядочены.

В условиях эксперимента, ограничение двигательной активности грудной конечности при нахождении животных в гипокинетической камере приводило к существенным структурным перестройкам в соединительнотканых невральном оболочках. В условиях гипокинезии, происходило постепенное снижение площади поперечного сечения СНП (S_{снп}), нервных стволов (S_{нп}), окружающей соединительной ткани (S_{ст}) и толщины периневерия (d_п). Динамика изменений данных показателей представлена в табл. 1.

Таблица 1

Динамика изменения площади поперечного сечения сосудисто-нервного пучка (S_{снп}), нервной ткани (S_{нп}), окружающей соединительной ткани (S_{ст}) и толщины периневерия (d_п) нерва разгибателей в условиях гипокинезии

Сроки наблюдения	Правый нерв разгибателей				Левый нерв разгибателей			
	S _{снп}	S _{нп}	S _{ст}	d _п	S _{снп}	S _{нп}	S _{ст}	d _п
Контроль	$1,552 \pm 0,01$	$0,060 \pm 0,01$	$1,492 \pm 0,01$	$5,234 \pm 0,01$	$1,626 \pm 0,01$	$0,049 \pm 0,01$	$1,577 \pm 0,01$	$5,287 \pm 0,01$
7 сут. (n = 10)	$1,355 \pm 0,01^*$	$0,057 \pm 0,01$	$1,325 \pm 0,01^*$	$4,888 \pm 0,01$	$1,441 \pm 0,01$	$0,047 \pm 0,01$	$1,399 \pm 0,01$	$5,558 \pm 0,01$
14 сут. (n = 10)	$1,374 \pm 0,01^*$	$0,048 \pm 0,01$	$1,298 \pm 0,01^*$	$4,658 \pm 0,01$	$1,430 \pm 0,01$	$0,042 \pm 0,01$	$1,383 \pm 0,01$	$4,959 \pm 0,01$
21 сут. (n = 10)	$0,924 \pm 0,01^* \#$	$0,044 \pm 0,01$	$0,879 \pm 0,01^* \#$	$4,468 \pm 0,01^*$	$1,187 \pm 0,01^* \#$	$0,037 \pm 0,01$	$1,154 \pm 0,01^*$	$4,870 \pm 0,01$
30 сут. (n = 10)	$0,892 \pm 0,01^*$	$0,023 \pm 0,01$	$0,868 \pm 0,01^*$	$4,267 \pm 0,01^*$	$1,014 \pm 0,01^* \#$	$0,036 \pm 0,01$	$0,977 \pm 0,01^*$	$4,669 \pm 0,01$
45 сут. (n = 10)	$0,891 \pm 0,01^*$	$0,053 \pm 0,01$	$0,838 \pm 0,01^*$	$3,575 \pm 0,01^* \#$	$0,944 \pm 0,01^* \#$	$0,032 \pm 0,01$	$0,915 \pm 0,01^* \#$	$4,372 \pm 0,01^* \#$
60 сут. (n = 10)	$0,859 \pm 0,01^*$	$0,042 \pm 0,01$	$0,816 \pm 0,01^*$	$3,173 \pm 0,01^* \#$	$0,835 \pm 0,01^* \#$	$0,029 \pm 0,01$	$0,798 \pm 0,01^* \#$	$3,969 \pm 0,01^*$
90 сут. (n = 10)	$0,857 \pm 0,01^*$	$0,039 \pm 0,01$	$0,817 \pm 0,01^*$	$2,864 \pm 0,01^* \#$	$0,748 \pm 0,01^* \#$	$0,026 \pm 0,01$	$0,722 \pm 0,01^* \#$	$3,035 \pm 0,01^* \#$

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с данными в контроле, # — $p < 0,05$ при сравнении с предыдущей точкой тестирования (по критерию Манна—Уитни).

Морфометрический анализ структур нерва разгибателей выявил статистически значимое ($p < 0,05$) снижение площади поперечного сечения СНП в 2 раза на левой конечности и в 1,8 раза на правой, преимущественно за счет уменьшения площади окружающей соединительной ткани в 2 раза. Толщина периневрия к окончанию эксперимента уменьшилась в 1,7 раза на левой конечности и в 1,8 раза на правой конечности. Следует отметить, что максимальное снижение (в 1,3 раза на левой конечности и в 2 раза на правой конечности) площади поперечного сечения нервных пучков происходило в промежутке между 21-ми и 30-ми сутками эксперимента.

В окружающем нервные пучки эпиневрии и ПСС наблюдалось уменьшение количества белой жировой ткани, уплотнение расположения коллагеновых волокон, увеличение количества клеток в единице площади среза. Общий фасциальный футляр, окружающий все компоненты СНП, хорошо визуализирован, фасциально-клетчаточные пространства, заполненные дольками белой жировой ткани, уменьшались в объеме, при этом количество мелких кровеносных сосудов на единицу площади среза возрастало (рис. 1).

В клеточном компоненте преобладали фибробласты, фиброциты и тучные клетки. Необходимо отметить, что на фоне абсолютного преобладания в поле зрения клеток-резидентов на всех сроках эксперимента, динамика изменения количественного состава была различной. Так, в ПСС количество фибробластов имело тенденцию к увеличению до 30-х суток, затем происходило уменьшение их числа, что вполне объяснимо снижением пролиферативной активности клеток при гипокинезии. Количество фиброцитов увеличивалось в 1,2 раза к 30-м суткам эксперимента, а затем происходило уменьшение их числа от общего количества клеток. При этом в поле зрения визуализировалось большое количество макрофагов и тучных клеток, значения которых на 21-е сутки являлись диаметрально противоположными, затем происходило снижение количества макрофагов на фоне полуторакратного преобладания тучных клеток.

В волокнистой соединительной ткани эпиневрии наблюдаемое увеличение клеток фибробластического ряда было статистически не значимым, при этом, их относи-

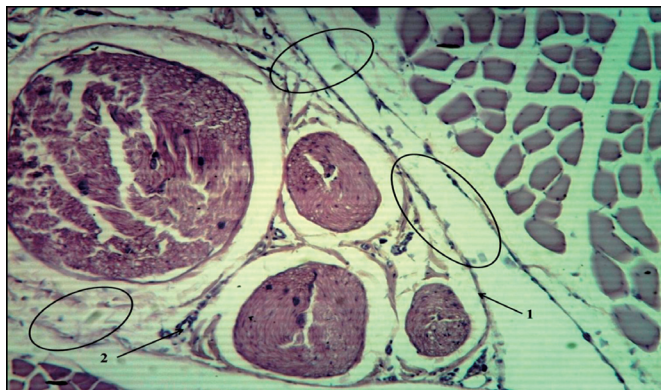


Рис. 1. Микрофотография нерва разгибателей и параневральных соединительнотканых структур в области средней трети плеча в условиях гипокинезии на 14-е сутки. Стрелками обозначены: 1 — общий фасциальный футляр, 2 — сосуды параневрия. Овалом обозначены параневральные соединительнотканые структуры. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

тельное количество на всех сроках эксперимента было значимо меньше, чем в параневральной соединительной ткани. Показатель соотношения клеток-резидентов к нерезидентам был в 1,3 раза меньше, в сравнении со значениями в ПСС. Интересно отметить, что количество макрофагов, в сравнении с параневральной тканью, на фоне меньшего их числа, имело тенденцию роста до 21-х суток эксперимента, а затем происходило резкое снижение их количества в 3,3 раза к окончанию эксперимента (на 21-е сутки количество макрофагов составило 10% от общего клеточного состава, на 90-е сутки — 3%). Подсчет количества тучных клеток в начале эксперимента выявил тотальную дегрануляцию мастоцитов в эпиневрии. По истечении месяца массивная дегрануляция наблюдалась в ПСС. В поле зрения на начальных сроках эксперимента преобладали тучные клетки в стадии накопления секрета — 0 тип. Затем, начиная с 30-х суток эксперимента, преобладали тучные клетки в стадии дегрануляции (I, II и III типы). В эпиневрии на указанном сроке, картина была диаметрально противоположной.

Наблюдаемое в параневрии, в условиях гипокинезии, двукратно меньшее количества тучных клеток (ТК в параневрии на 7-е сутки составило 9% от общего количества клеток, на 14-е сутки — 10%; ТК в эпиневрии на 7-е сутки составило 20% от общего количества клеток, на 14-е сутки — 21%), свидетельствующее о массивной дегрануляции, является адаптационной реакцией ПСС на действие экстремальных факторов, в данном случае, на гипокинезию. Учитывая стимулирующее влияние тучных клеток на усиление синтеза коллагена фибробластами, вполне объяснимо полученное нами при гипокинезии большее (в 1,5 раза) количество фибробластов в ПСС, чем в эпиневрии. По данным Е.О. Баглай (2015) стимулирующее влияние тучных клеток на процессы фиброза обусловлено активацией функции фибробластов [10]. Выделенные мастоцитами вещества при дегрануляции потенцируют митотические процессы в фибробластах. При действии экстремальных факторов ответ тучных клеток носит как системный характер, так может и проявляться хорошо выраженной местной реакцией в виде тотальной дегрануляции [11].

Выявленное большее содержание макрофагов (в 1,5 раза) на начальных сроках гипокинезии в ПСС при сравнении с эпиневрием также свидетельствует о более активно протекающих процессах пролиферации в ПСС. По данным Н.Т. Алексеевой (2012), макрофаги стимулируют пролиферацию клеток посредством секреции различных цитокинов, которые регулируют скорость размножения и характер дифференцировки клеток, в том числе и фибробластов [12—14].

Степень пролиферативной активности клеток, находящихся в G1, G2, S и M-фазах клеточного цикла, начиная с 21-х суток эксперимента, имела статистически значимые отличия между эпиневрием и ПСС. Так, на 30-е сутки индекс пролиферации (ИП) в эпиневрии был ниже на левой конечности на 23%, на правой на 22% соответственно. Через полтора месяца от начала эксперимента ИП в эпиневрии также был ниже на 23% слева и 22% справа. К окончанию эксперимента разница составляла 19% слева и 33% справа соответственно.

Оценивая пролиферативную активность клеток соединительнотканых невральных оболочек, следует отметить, что в ПСС на всех сроках эксперимента, в условиях гипокинезии, была выше, чем в эпиневрии в 1,3 раза.

Динамика изменения индекса пролиферативной активности клеток в эпи- и параневральной соединительной ткани нерва разгибателей в области средней трети плеча представлена на рис. 2.

На представленной диаграмме хорошо выражена динамика изменений индекса пролиферативной активности клеток соединительной ткани эпиневрия и ПСС. Более активно процессы пролиферации протекают в ПСС, о чем свидетельствуют значимо большие индексы пролиферации в сравнении с эпиневрием. Следует отметить, что скорость пролиферации клеток соединительной ткани, как ПСС, так и эпиневрия имела обратно пропорциональную направленность длительности эксперимента. К завершению эксперимента (на 90 сутки) индекс пролиферации снизился в параневрии в 1,5 раза, а в эпиневрии в 1,9 раза, что может свидетельствовать о более высокой степени адаптационных возможностей ПСС.

В условиях повышенной двигательной активности грудной конечности — гиперкинезии, площадь поперечного сечения СНП на правой конечности увеличилась в 1,5 раза, на левой конечности в 2,3 раза. Наблюдаемые

изменения происходили за счет достоверного увеличения не только площади соединительной ткани в 1,5—2,9 раза, но и в результате 5—7-кратного увеличения площади поперечного сечения нервных пучков. Толщина периневрива без достоверных различий между конечностями увеличилась в 1,5 раза. Изложенные закономерности представлены в табл. 2.

Анализ качественно-количественного состава клеточного компонента соединительной ткани эпиневрия и ПСС выявил преобладание клеток фибробластического ряда (количество фибробластов варьировало от 36% до 55% в эпиневрии и от 36% до 46% в параневрии). Тучные клетки, имеющие преимущественно овальную форму и находящиеся в стадии накопления секрета на начальных сроках эксперимента к окончанию переходили в стадию дегрануляции, что приводило к резкому снижению их количества на единице площади среза (количество ТК в эпиневрии на 7-е сутки составило 14% от общего клеточного состава, на 90-е сутки — 8%; в параневрии количество ТК на 7-е сутки составило 9% от общего клеточного состава, на 90-е сутки — 3%).

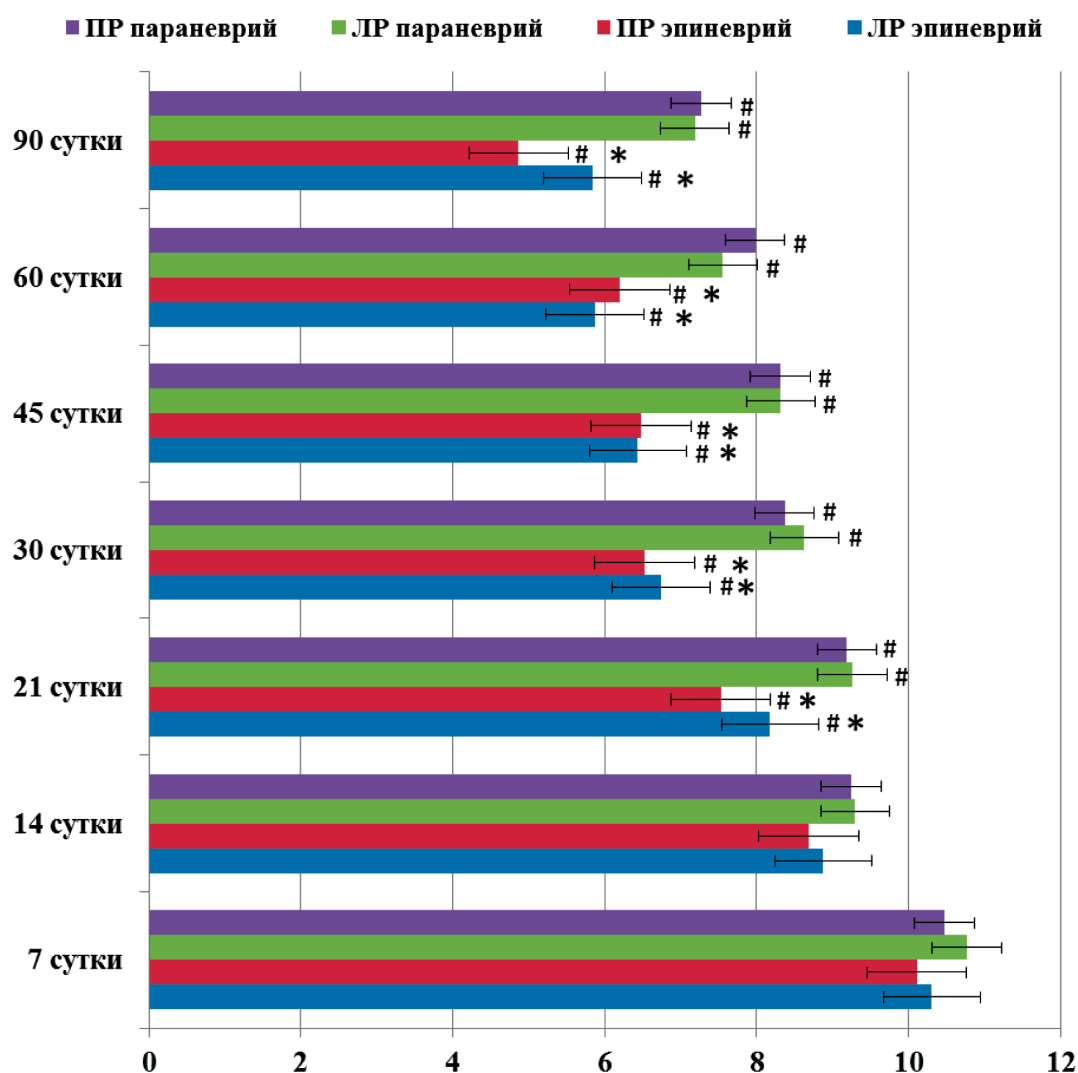


Рис. 2. Динамика изменения индекса пролиферативной активности (по горизонтальной шкале) клеток в эпи- и параневральной соединительной ткани (параневрий) нерва разгибателей (ЛР и ПР — на левой и правой конечности соответственно) в области средней трети плеча в условиях гиперкинезии.
— статистическая значимость отличий от срока обследования 7 суток ($p < 0,05$ по критерию Манна—Уитни); * — статистическая значимость различий между эпи- и параневральной соединительной ткани на соответствующей стороне ($p < 0,05$ по критерию Манна—Уитни).

Динамика изменения площади поперечного сечения сосудисто-нервного пучка (Снп), нервной ткани (Снп), окружающей соединительной ткани (Сст) и толщины периневрия (dп) нерва разгибателей в условиях гиперкинезии

Сроки наблюдения	Правый нерв разгибателей				Левый нерв разгибателей			
	Снп	Снп	Сст	dп	Снп	Снп	Сст	dп
Контроль	0,996 ± 0,01	0,030 ± 0,01	0,880 ± 0,01	3,813 ± 0,01	0,969 ± 0,01	0,025 ± 0,01	0,765 ± 0,01	5,325 ± 0,01
7 сут. (n = 10)	1,078 ± 0,01	0,073 ± 0,01*	0,939 ± 0,01*	3,929 ± 0,01	0,986 ± 0,01	0,059 ± 0,01	0,713 ± 0,01	8,056 ± 0,01*
14 сут. (n = 10)	1,102 ± 0,01	0,098 ± 0,01*	0,979 ± 0,01*	3,949 ± 0,01	1,034 ± 0,01*#	0,070 ± 0,01*	1,019 ± 0,01*#	6,043 ± 0,01#
21 сут. (n = 10)	1,117 ± 0,01	0,116 ± 0,01*	1,087 ± 0,01*#	4,698 ± 0,01*#	1,396 ± 0,01*#	0,105 ± 0,01*#	1,393 ± 0,01*#	8,386 ± 0,01*#
30 сут. (n = 10)	1,326 ± 0,01	0,139 ± 0,01*	1,253 ± 0,01*#	4,867 ± 0,01*	1,433 ± 0,01*#	0,132 ± 0,01*#	1,310 ± 0,01*#	7,807 ± 0,01*
45 сут. (n = 10)	1,449 ± 0,01	0,156 ± 0,01*	1,310 ± 0,01*	5,014 ± 0,01*	1,543 ± 0,01*#	0,163 ± 0,01*#	1,411 ± 0,01*#	7,535 ± 0,01*
60 сут. (n = 10)	1,475 ± 0,01	0,163 ± 0,01*	1,319 ± 0,01*	5,388 ± 0,01*#	2,286 ± 0,01*#	0,173 ± 0,01*	2,098 ± 0,01*#	7,865 ± 0,01*
90 сут. (n = 10)	1,502 ± 0,01	0,165 ± 0,01*	1,337 ± 0,01*	5,911 ± 0,01*#	2,304 ± 0,01*	0,188 ± 0,01*#	2,264 ± 0,01*#	8,115 ± 0,01*

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с данными в контроле, # — $p < 0,05$ при сравнении с предыдущей точкой тестирования (по критерию Манна–Уитни).

■ ПР параневрий ■ ЛР параневрий ■ ПР эпиневрй ■ ЛР эпиневрй

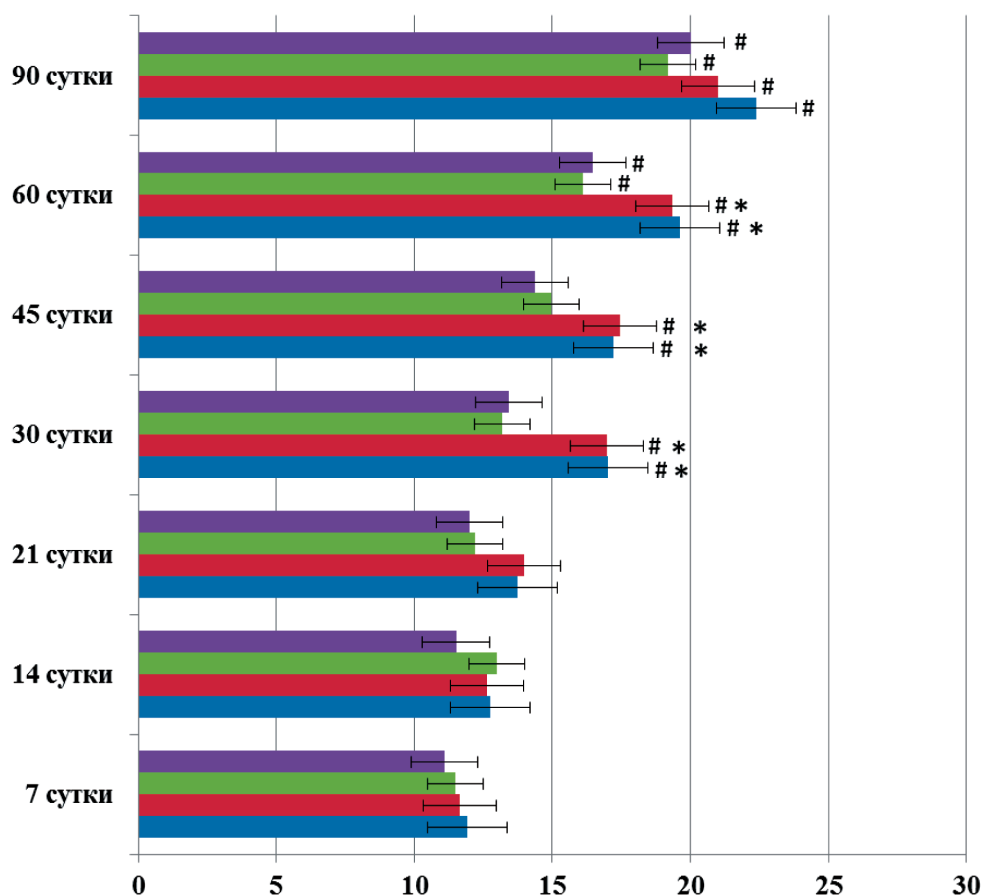


Рис. 3. Динамика изменения индекса пролиферативной активности (по горизонтальной шкале) клеток в эпиневральной и параневральной соединительной ткани (параневрий) нерва разгибателей (ЛР и ПР — на левой и правой конечности соответственно) в области средней трети плеча в условиях гиперкинезии.

— статистическая значимость отличий от срока обследования 7 суток ($p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни); * — статистическая значимость различий между эпиневральной и параневральной соединительной тканью на соответствующей стороне ($p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни).

Следует отметить, что количество макрофагов в эпиневррии имело тенденцию на уменьшение значений (на 7-е сутки количество макрофагов составило 11% от общего клеточного состава, на 90-е сутки — 1%). В параневррии наблюдался рост количества макрофагов (с 5% от общего количества клеток на 7-е сутки до 15% на 90-е сутки эксперимента) на фоне снижения в 3 раза количества тучных клеток (данные приведены выше).

В условиях гиперкинезии визуализировался утолщенный общий фасциальный футляр, образованный параллельно расположенными в одном направлении, зрелыми коллагеновыми волокнами. Расширенные параневральные фасциально-клетчаточные пространства содержали хорошо структурированные дольки белой жировой ткани. Следует отметить, что выявленное преобладание белой жировой ткани в параневррии в условиях гиперкинезии, при сравнении с условиями гипокинезии, свидетельствует об ее непосредственном участии в процессе адаптации параневральных соединительнотканых структур к повышенной двигательной активности грудной конечности. Жировой ткани отводится роль амортизационной «подушки», которая смягчает всевозможные давления и предупреждает возникновение нарушений при травмах и повреждении грудной конечности. В результате проведенного морфометрического анализа компонентов сосудисто-нервного пучка нерва разгибателей была выявлена похожая динамика в изменении показателей, с асимметричным преобладанием значений на одной из конечностей (табл. 1, 2). В параневральном фасциально-клетчаточном пространстве, представленном дольками белой жировой ткани, визуализировалось значительное количество кровеносных сосудов, в клеточном компоненте преобладали клетки резиденты.

Иммуногистохимическое исследование выявило, что в начале эксперимента пролиферативная активность клеток была практически одинаковой, как в эпиневррии, так и в ПСС. Затем, к 21-м суткам эксперимента, в эпиневррии индекс пролиферации был в 1,2 раза больше, чем в параневррии. Через месяц эксперимента, в эпиневррии его значения были наибольшими и преобладали в 1,3 раза в сравнении со значениями индекса пролиферативной активности в ПСС (рис. 3). К окончанию эксперимента, на фоне увеличения значений индекса пролиферативной активности, большее количество митотически делящихся клеток, экспрессирующих Ki-67, визуализировалось в эпиневррии, чем в ПСС, что свидетельствует о более высоких адаптационных возможностях параневральных структур.

Следует отметить, что выявленные морфологические отличия в организации эпиневральной соединительной ткани и ПСС в условиях повышения или ограничения двигательной активности грудной конечности, свидетельствуют не только о разной функциональной роли этих оболочек для периферического нерва как органа, но и о значимых отличиях в адаптационных возможностях.

Заключение

Проведенное исследование микроструктурных особенностей ПСС и эпиневррии в сравнительном аспекте при гипо- и гиперкинезии позволяет регулировать адаптационные процессы, происходящие как во внутриневральных структурах, так и в параневральных, тем самым со-

вершенствовать микрохирургические методики по восстановлению целостности посттравматических дефектов сосудисто-нервного пучка.

Список литературы

1. Сидорович Р.Р., Смеянович А.Ф., Гузов С.А., Юдина О.А. Особенности анатомии плечевого сплетения в аспекте выполнения хирургических вмешательств на его структурах. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2011; 10(2): 127-133.
2. Турсунова Ю.П., Баландина О.А., Судюков Л.В. Морфометрические показатели миелиновых и безмиелиновых нервных волокон срединного нерва. *Медицинская наука и образование Урала*. 2010; 11-3: 71-74.
3. Литвиненко Л.М. О сосудисто-нервных комплексах и формировании сосудисто-нервных пучков. *Вестник новых медицинских технологий*. 2006; 13-3: 18-19.
4. Иванов А.В. *Параневральные соединительнотканые структуры плечевого сплетения человека*. В сб.: Человек и его здоровье. Курск: 1998; 1: 52-53.
5. Польской В.С. Параневрий седалищного нерва человека. *Тезисы конференции КГМИ*. Курск, 1991: 90-92.
6. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*. Казань: Морион, 2001. 408 с.
7. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. Под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. М.: Практика, 1999. 462 с.
8. Затолокина М.А. Реактивность параневральной соединительной ткани периферических нервов плечевого сплетения при физической нагрузке. *Морфология*. 2016; 149(3): 87.
9. Zatolokina M.A., Gerasimova A.V., Tsaroeva L.K., Maleeva D.S. The morphofunctional state of connective tissue component of peripheral nerves from experimental animals' forelimbs after changing their motor activity. *International Journal Of Applied And Fundamental Research*. 2015; 1: Режим доступа: <http://www.science-sd.com/460-24760> Дата обращения: 16.10.2016.
10. Баглай Е.О., Дубикова А.И. Тучные клетки — ключевые участки патогенеза иммуновоспалительных заболеваний. *Научно-практическая ревматология*. 2015; 53 (2): 182-189.
11. Мухлынина Е.А. Состояние системы тучных клеток при действии на организм экстремальных факторов. *Молодые ученые в медицине: материалы XV Всероссийской научно-практической конференции (2-3 апр. 2010 г.)*. Казань. 2010: 288.
12. Алексеева Н.Т., Глухов А.А., Остроушко А.П. Роль клеток фибробластического дифферона в процессе заживления ран. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2012; 5(3): 601-608.
13. Арташян О.С., Юшков Б.Г., Мухлынина Е.А. Изучение функциональной активности тучных клеток при иммобилизационном стрессе. *Цитология*. 2006; 48(8): 665-668.
14. Тюриков В.М., Грачёв Ю.В. Тригеминальная невралгия: патогенетические и клинические особенности, методы патогенетически обоснованного лечения. Лекция. *Патогенез*. 2013; 11(4): 64-68.

References

1. Sidorovich R.R., Smeyanovich A.F., Guзов S.A., Yudina O.A. [Features of anatomy of the brachial plexus in the aspect of performing surgical interventions on its structures]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta [Bulletin of Vitebsk State Medical University]*. 2011; 10(2): 127-133. (in Russian)
2. Tursunova Yu.P., Balandina O.A., Sudyukov L.V. [Morphometric parameters of myelin and moth-free nerves of the median nerve]. *Medicinskaya nauka i obrazovanie Urala [Medical science and education of the Urals]*. 2010; 11-3: 71-74. (in Russian)
3. Litvinenko L.M. [About vascular-nervous complexes and formation of vascular-neural bundles]. *Vestnik novykh medicinskih tekhnologij [Bulletin of new medical technologies]*. 2006; 13-3: 18-19. (in Russian)
4. Ivanov A.V. [Paraneural connective tissue structures of human brachial plexus]. *Chelovek i ego zdorov'e: sbornik nauchnykh trudov. Kursk*. 1998; 1: 52-53. (in Russian)

5. Pol'skoi V.S. [Paraneurium of the human sciatic nerve] *Tezisy konferentsii KGMI. [Theses of the conference of KSMI]*. Kursk, 1991: 90-92 (in Russian)
6. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. [*Statistical methods in biomedical research using Excel*]. Kazan.: Morion, 2001. 408 p. (in Russian)
7. Glanc S. [*Medico-biological statistics. Per. s angl. pod red. N. E. Buzikashvili, D. V. Samojlova*]. M.: Praktika, 1999. 462 p. (in Russian)
8. Zatolokina M.A. [Reactivity of the paraneural connective tissue of the peripheral nerves of the brachial plexus under physical exertion]. *Morfologiya [Morphology]*. 2016; 3: 87. (in Russian)
9. Zatolokina M.A., Gerasimova A.V., Tsaroeva L.K., Maleeva D.S. [The morphofunctional state of connective tissue component of peripheral nerves from experimental animals' forelimbs after changing their motor activity]. *International Journal Of Applied And Fundamental Research*. 2015; 1. URL: <http://www.science-sd.com/460-24760> Retrieved: 16.10.2016
10. Baglay E.O., Dubikova A.I. [Mast cells are key participants in the pathogenesis of immunoinflammatory diseases]. *Nauchno-praktichesкая revmatologiya [Rheumatology Science and Practice]*. 2015; 53(2): 182-189. (in Russian)
11. Muhlynina E.A. [The state of the mast cell system under the action of extreme factors on the body]. *Molodye uchenye v medicine: materialy XV Vseros. nauch.-prakt. konf (2-3 apr. 2010 g)*. Kazan'. 2010; 288. (in Russian)
12. Alekseeva N.T., Gluhov A.A., Ostroushko A.P. [The Role of Fibroblastic Different Cells in the Process of Wound Healing]. *Vestnik jeksperimental'noj i klinicheskoy hirurgii [Bulletin of Experimental and Clinical Surgery]*. 2012; 5-3: 601-608. (in Russian)
13. Artashyan O.S., Yushkov B.G., Mukhlynina E.A. [Study of the functional activity of mast cells under immobilization stress]. *Citologija [Cytology]*. 2006; 48-8: 665-668. (in Russian)
14. Tyurnikov V.M., Grachev Yu.V. [Trigeminal neuralgia: pathogenetic and clinical features, methods of pathogenetically substantiated treatment. Lecture]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2013; 11(4): 64-68. (in Russian)

Сведения об авторах

Затолокينا Мария Алексеевна — доктор медицинских наук, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кузнецов Сергей Львович — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)