© ЩУДЛО Н. А., КИРСАНОВА А. Ю.

УДК: 616.832-06-036.4-089-092.4

DOI: 10.20333/2500136-2019-5-66-71

ДИНАМИКА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СПИННОГО МОЗГА В ПЕРВЫЕ СУТКИ ПОСЛЕ ОСЛОЖНЁННОГО ПЕРЕЛОМА ПОЗВОНОЧНИКА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Н. А. Щудло, А. Ю. Кирсанова

Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова, Курган 640014, Российская Федерация

Цель исследования. Изучение динамики морфологических изменений в спинном мозге в первые сутки после осложнённого перелома позвоночника.

Материал и методы. В опытах на 6 собаках выполнена полная поперечная остеотомия LIV позвонка со смещением его фрагментов в сагиттальной и фронтальной плоскостях и уменьшением диаметра позвоночного канала на 50-70 %. Для гистологического исследования спинного мозга животные выведены из опыта через 2, 4 и 24 часа после травмы. Серийные парафиновые поперечные срезы спинного мозга на уровне LIV-LVII окрашивали гематоксилином и эозином, тионином и трёхцветным методом Массона.

Результаты. Через 2 часа после травмы выявлены кровоизлияния в центральном канале преимущественно на уровне LVII, интрамедуллярные кровоизлияния, реактивные изменения нейронов (фуксинофилия ядрышек, отёк ядра, вакуолизация цитоплазмы), появление амёбодных глиоцитов, признаки нейронафагии мелких нейронов. Через 4 часа после травмы выражен отёк и реактивные изменения сосудов спинного мозга. К концу первых суток деструктивные процессы и гибель нейронов преобладают над сосудистыми нарушениями.

Заключение. Взаимодействие сосудистых нарушений и воспалительной ответной реакции запускают механизм вторичного повреждения тканей спинного мозга, приводя к быстрому формированию необратимых изменений.

Ключевые слова: спинной мозг, травма, эксперимент, ранний период, морфология, вторичное повреждение.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Щудло НА, Кирсанова АЮ. Динамика гистологических изменений спинного мозга в первые сутки после осложненного перелома позвоночника (экспериментальное исследование). *Сибирское медицинское обозрение*. 2019;(5):66-71. DOI: 10.20333/2500136-2019-5-66-71

DYNAMICS OF HISTOLOGICAL CHANGES IN SPINAL CORD THE FIRST DAY AFTER COMPLICATED SPINE FRACTURE (EXPERIMENTAL STUDY)

N. A. Shchudlo, A. Yu. Kirsanova

Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics», Kurgan 640014, Russian Federation

The aim of the research is to study the dynamics of morphological changes in spinal cord in the first day after complicated spine fracture.

Material and methods. In experiments, a complete transverse LIV osteotomy of vertebra was performed in 6 dogs with the displacement of its fragments in sagittal and frontal planes and a decrease of spinal canal diameter by 50-70%. For histological examination of spinal cord, the animals were withdrawn from the experiment in 2, 4, and 24 hours after the injury. Serial paraffin cross sections of spinal cord at LIV-LVII level were stained by hematoxylin and eosin, thionine and by Masson's three-color method.

Results. In 2 hours after injury, hemorrhages in central channel were detected mainly at LVII level, intramedullary hemorrhages, reactive changes in neurons (nucleoli fuchsinophilia, nucleus edema, cytoplasm vacuolization), appearance of amoeboid gliocytes, signs of neuronophagy of small neurons. In 4 hours after the injury, edema and reactive changes in vessels of spinal cord are pronounced. By the end of the first day, destructive processes and neurons death prevail over vascular disorders.

Conclusion. Interaction of vascular disorders and inflammatory response start the mechanism of secondary damage of spinal cord tissues, leading to rapid irreversible changes.

Key words: spinal cord, trauma, experiment, early period, morphology, secondary damage.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Shchudlo NA, Kirsanova AYU. Dynamics of histological changes in spinal cord the first day after complicated spine fracture (experimental study). *Siberian Medical Review*. 2019;(5):66-71. DOI: 10.20333/2500136-2019-5-66-71

Введение

Переломы позвоночника с пространственной дезорганизацией его анатомических структур и уменьшением размеров позвоночного канала закономерно приводят к повреждениям спинного мозга формированию неврологического дефицита [1, 2].

Травматическое повреждение спинного мозга не ограничивается локальным разрушением структур, а активизирует ряд взаимосвязанных клеточных и биохимических процессов, приводящих к вторичному повреждению и к гибели изначально неповрежденных глии и нервных клеток [3, 4].

Известно, что процессы развития вторичных повреждений в травмированном спинном мозге обычно запускаются до медицинского вмешательства, вследствие чего лечение осуществляется в период, когда уже сформировались значительные морфологические изменения, что в конечном итоге ведёт к существенному ухудшению неврологического исхода [4]

Следовательно, понимание механизмов возникновения и развития процессов, происходящих в спинном мозге при его повреждении, является достаточно актуальным при планировании лечения.

Поэтому целью нашего исследования является изучение структурных изменений в тканях поясничного отдела спинного мозга в течение 24 часов после его повреждения.

Материал и методы

Эксперимент выполнен на 6 взрослых беспородных собаках обоего пола. Оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Для получения модели открытого осложнённого перелома позвоночника наркотизированным животным выполняли латеральный доступ к телу LIV позвонка, далее, под визуальным контролем осуществляли полную поперечную остеотомию LIV позвонка со смещением его фрагментов в сагиттальной и фронтальной плоскостях. При этом достигали уменьшения диаметра позвоночного канала, как минимум,

на 50-70 % (рис. 1 а). Для достоверности получения данной модели проводили миелографию поврежденного отдела позвоночника. Операционную рану послойно и наглухо ушивали.

Неврологический статус животных оценивался после пробуждения. Через 2 (n = 2), 4 (n = 2) и 24 (n = 2) часа после травмы животные выведены из опыта передозировкой наркотических средств. Рентгенографическое исследование позвоночного столба выполняли с помощью аппарата «Premium Vet» (Sedecal, Испания) до операции и после получения модели травматического повреждения спинного мозга. Для гистологических исследований иссекали фрагмент на уровне поясничных позвонков. Его фиксировали в смеси равных объемов 2 % глутарового и параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) с добавлением пикриновой кислоты в течение 3-5 суток, после чего проводили вырезку сегментов LV-LVII. Их по стандартной методике заливали в парафин, разлагали на санном микротоме на поперечные срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, тионином и трёхцветным методом Массона. Микропрепараты исследовали с помощью светового микроскопа (Orton, Германия), цифровые изображения получали посредством встроенной фотокамеры и аппаратно-програмного комплекса «ДиаМорф» (Россия) в программе «Color». С учётом того, что исследование носило описательный характер, статистическая обработка данных не проводилась, размер выборки предварительно не рассчитывался.

Рисунок 1. Спинномозговая травма: а – рентгенограмма с введением контрастного вещества после получения модели, прямая проекция; б – макропрепарат спинного мозга через 2 часа после травмы; в – макропрепарат спинного мозга через 4 часа после травмы; г – макропрепарат спинного мозга через 24 часа после травмы. Стрелками указано место перелома позвонка.

Figure 1. Spinal injury: a – radiograph with the introduction of contrast medium after receiving the model, direct projection; b – gross specimen of spinal cord in 2 hours after the injury; c – gross specimen of spinal cord in 4 hours after the injury; g – gross specimen of spinal cord in 22 hours after the injury. The arrows indicate the location of the spine fracture.

Результаты и обсуждение

Клинически у животных после получения модели острой спинномозговой травмы наблюдалась грубая задняя параплегия и тотальная гипо- и анестезия ниже уровня травмы. Сухожильные и периостальные рефлексы с тазовых конечностей отсутствовали, имелись нарушения функции тазовых органов по центральному типу.

На макропрепаратах спинного мозга через два часа после получения травмы отмечали полнокровие сосудов и ярко выраженный отёк, большей частью распространявшийся каудальнее места травмы. Также наблюдали очаг интрамедуллярного кровоизлияния, ограниченный зоной действия травмирующего фактора (рис. 1 б).

Микроскопически к этому сроку при исследовании поперечных срезов у одного из животных между задними канатиками и задней серой спайкой располагался очаг размягчения вещества мозга, в центре которого имелась гематома – большей частью на уровне LIV. На уровне LVII были выявлены наибольшие изменения центрального канала – его просвет был заполнен плазмой и форменными элементами крови (рис. 2 а). У другой собаки зона повреждения спинного мозга имела более протяжённый характер. На уровне LV были некротизированы нежный и клиновидный пучки и промежуточная зона серого вещества – так, что ни эти структуры, ни даже центральный канал в срезах не определялся. На уровне LVI задние канатики и структуры серого вещества

а б в

Рисунок 2. 2 часа после открытой спинно-мозговой травмы: а – фрагмент поперечного среза спинного мозга на уровне LVII, центральный канал, окраска Массон-трихром. Увеличение 80х; б, в – Реактивно-деструктивные изменения нейронов, окраска по Массону, увеличение 500х (б); и тионином, увеличение 1250х (в).

Figure 2. 2 hours after open spinal cord injury: а – fragment of transverse section cut of spinal cord at LVII level, central channel, Masson trichrome stain. 80x magnification; б, в – reactive and destructive changes in neurons, Masson staining, 500x magnification (b); and thionine, 1250x magnification (c).

а б в

Рисунок 3. Через 4 часа после открытой спинно-мозговой травмы: а – фрагмент поперечного среза передней мозговой артерии, окраска гематоксилином и эозином, увеличение 500х; б, в – реактивные изменения нейронов спинного мозга, окраска Массон-трихром, увеличение 200х (б); окраска гематоксилином и эозином, увеличение 500х.

Figure 3. 4 hours after open spinal cord injury: а – fragment of transverse section cut of anterior cerebral artery, stained with hematoxylin and eosin, 500x magnification; б, в – reactive changes in neurons of spinal cord, Mason-trichrome staining, 200x magnification (b); stained with hematoxylin and eosin, 500x magnification.

также были неразличимы, поскольку в соответствующих им участках располагался тканевой детрит и массы изменённых эритроцитов. На уровне LVII в вентральной части одного из клиновидных пучков вблизи задней серой спайки определяли гематому. Центральный канал содержал форменные элементы крови, непрерывность его стенки была нарушена, промежуточная зона серого вещества пропитана ликвором. Реактивные изменения нейронов у этих животных имели однотипный характер. Среди крупных и мелких нейронов выявляли клетки с фуксинофильными ядрышками, вакуолизацией цитоплазмы и «водянистыми» ядрами (рис 2 б). Многие мелкие нейроны, подвергались активной нейронофагии, осуществляемой амёбоидными глиоцитами (рис. 2 в).

Через 4 часа после травмы на макропрепаратах спинного мозга отёк был более выражен и захватывал гораздо большую часть спинного мозга по сравнению с предыдущим сроком, также отмечали очаг интрамедуллярного кровоизлияния в месте травмы (рис. 1 в).

К этому сроку на микропрепаратах зону повреждения выявляли в основном на уровне сегмента LVI по имбибции форменными элементами крови большей части серого вещества спинного мозга. В передней мозговой артерии была выражена вакуолизация и набухание эндотелиоцитов и гладких миоцитов меди (рис. 3 а). В веществе мозга отмечали периваскулярные отёки, явления капиллярного стаза и диапедеза эритроцитов. Во многих нейронах происходила дезинтеграция базофильного вещества, вакуолизация цитоплазмы, ядра и ядрышка, отмечена ацидофилия ядрышек или общая тинкториальная ацидофилия (рис. 3 б, в).

Через 24 часа после травмы внешние признаки отёка практически отсутствовали, у одного из животных наблюдали вдавленность тканей спинного мозга на уровне травмы (рис. 1 г), у другого – частичный разрыв с имбибцией тканей мозга кровью. Гистологически к этому сроку массивных размягчений и кровоизлияний в веществе мозга не обнаружено. На уровне сегментов LV и LVI центральный канал был дилатирован, отмечали резко выраженный периваскулярный отёк. На уровне LVII центральный канал был заполнен сгустком, отёка вокруг сосудов не наблюдали, но было выражено плазматическое пропитывание сосудистых стенок. По сравнению с предыдущими сроками картины гибели нейронов встречались гораздо чаще (рис. 4).

Известно, что биологический ответ на травму спинного мозга делится на три фазы: острая (от нескольких секунд до нескольких минут), подострая (от нескольких минут до нескольких недель) и хроническая (длится до нескольких месяцев или лет). В острой фазе возникает первичное повреждение структур, как прямой результат травмирования, что приводит к немедленным физическим и биохимическим клеточным изменениям [5, 6].

Прежде всего физическое повреждение спинного мозга вызывает разрыв сосудов, вследствие чего через несколько минут после травмы появляются первичные петехиальные кровоизлияния в богатом капиллярами сером веществе спинного мозга. При этом крупные артерии спинного мозга остаются проходимыми, нарушается только микроциркуляция в области травмы [7].

Вторичный механизм запускается через несколько минут после травмирования [4, 8]. На данном этапе область повреждений отчётливо расширяется. В этот

а б в

Рисунок 4. Через 24 часа после открытой спинно-мозговой травмы, погибающие нейроны спинного мозга: а – выраженная тинкториальная ацидофилия (окраска Мэсон-трихром); б, в – активная нейронофагия (окраска гематоксилином и эозином). Увеличение 500х.

Figure 4. 24 hours after open spinal cord injury, dying neurons of spinal cord: a – pronounced tinctorial acidophilia (Mason trichrome staining); b, c – active neuronophagy (hematoxylin and eosin staining). 500x magnification.

период также имеют место продолжение некоторых событий из острой фазы, такие как нарушение электролитного баланса, отёк и некротическая гибель клеток, а также запускаются новые механизмы: образование свободных радикалов, воспаление, клеточный апоптоз. В течение 24 часов развивается и распространяется на соседние сегменты вторичное кровоизлияние в результате экстравазирования крови из-за повреждения эндотелия микрососудов [7, 9]. Непременным компонентом травматического повреждения спинного мозга является развитие ишемии, которая быстро прогрессирует в течение нескольких часов. Точные механизмы этой ишемии не ясны. Одной из возможных причин может быть вазоспазм, а также тромбоз при агрегации тромбоцитов [3, 10, 11].

Результаты, полученные в данном эксперименте, в целом, согласовывались с литературными данными: сперва отмечали развитие нарушений гемоциркуляторного русла. В ранние сроки (2 часа) наиболее выраженными были локальные изменения: наблюдали образование чётко отграниченных гематом непосредственно в месте нанесения травмы, что говорит о физическом повреждении сосудов. Отёчность, обусловленная имбибцией серого вещества форменными элементами крови, развивалась преимущественно в каудальных отделах спинного мозга.

Через 4 часа после травмы наибольшего проявления достигали изменения в сосудистом эндотелии, в результате чего отмечали резкое усиление периваскулярных отёков, вызванное выходом эритроцитов в окружающие ткани и капиллярным стазом. Макроскопически распространение отёка происходило не только в каудальном направлении, но и захватывало участки, находящиеся краниальнее места травмирования. Также отмечено значительное увеличение количества нейронов с дегенеративными изменениями, усиление процессов нейронофагии. Это может быть связано с включением в процесс воспалительной реакции. Известно, что воспаление является одной из наиболее ранних ответных реакций организма на травму. При этом избыточный воспалительный ответ может привести к развитию вторичных повреждений за счёт чрезмерного выделения воспалительных медиаторов, что, в свою очередь, вызывает и усиливает клеточный апоптоз [3, 12]. Одновременно с воспалительной реакцией формируется глиальный ответ, в результате которого микроглиоциты также преобразуются в макрофаги, активно поглощающие детрит [3]. Неожиданным результатом проведённого исследования стало исчезновение признаков сосудистых нарушений к концу первых суток после травмы, при этом наблюдали резкий рост деструктивных процессов, массовой гибели нейронов и некротизации в промежуточной зоне серого вещества.

Заключение

Данное исследование показало, что при осложнённых переломах позвоночника нарушения микроциркуляции в спинном мозге наиболее выражены через 4 часа после травмы. Механизм вторичной гибели нейронов запускается уже через 2 часа после повреждения, прогрессирует с течением времени и ухудшает функциональный прогноз.

Литература/ References

1. Морозов ИН, Млявых СГ. Эпидемиология позвоночно-спинномозговой травмы (обзор). *Медицинский альманах*. 2011;(4):157-159. [Morozov IN, Mljavyh SG. The epidemiology of vertebral-cerebrospinal trauma (Review). *Medical Almanac*. 2011;(4): 157-159. (In Russian)]
2. Полищук НЕ, Данчин АА, Гончарук ОН. Стратегия лечения пострадавших при боевой черепно-мозговой травме. *Український нейрохірургічний журнал*. 2016;(1):31-39. [Polishchuk MYe, Danchin AO, Goncharuk OM. Treatment strategy at combat traumatic brain injury. *Ukrainian Neurosurgical Journal*. 2016;(1):31-39. (In Russian)]
3. Волков СГ, Верещагин ЕИ. Представления о патогенезе травматического повреждения спинного мозга и возможных путях терапевтического воздействия: обзор литературы. *Хирургия позвоночника*. 2015;12(2):8-15. [Volkov SG, Vereshhagin EI. Understanding of the pathogenesis of traumatic spinal cord injury and possible ways of therapeutic intervention: literature review. *Spine Surgery*. 2015;12(2):8-15. (In Russian)] DOI: 1
4. Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiologiae Experimentals (Wars)*. 2011;71(2):281-299.
5. Gwak YS, Hulsebosch CE, Leem JW. Neuronal-Glial Interactions Maintain Chronic Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *Neural plasticity*. 2017;(2017):2480689. DOI: 10.1155/2017/2480689
6. Caprelli MT, Mothe AJ, Tator CH. Hyperphosphorylated Tau as a Novel Biomarker for Traumatic Axonal Injury in the Spinal Cord. *Journal of Neurotrauma*. 2018;35(16):1929-1941. DOI: 10.1089/neu.2017.5495
7. Benton RL, Maddie MA, Minnillo DR, Hagg T, Whittemore SR. Griffonia simplicifolia isolectin B4 identifies a specific subpopulation of angiogenic blood vessels following contusive spinal cord injury in the adult mouse. *Journal of Comparative Neurology*. 2008;507(1):1031-1052. DOI: 10.1002/cne.21570
8. Tanhoffer AR, Yamazaki KR, Nunes AE, Pchevozniki IA, Pchevozniki MA, Nogata C, Aikawa J, Bonatto JS, Brito G, Lissa DM, Fernandes CL. Glutamine concentration and immune response of spinal cord-injured rats.

The Journal of Spinal Cord Medicine. 2007;30(2):140-146. DOI: 10.1080/10790268.2007.11753925

9. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. Laboratory Investigation; *A Journal Of Technical Methods And Pathology*. 1978;39(3):236-253.

10. Климов ВС, Шулев ЮА, Винокуров ВУ. Патоморфологические характеристики спинного мозга у лиц, погибших в результате механической травмы шейного отдела позвоночника, в зависимости от способа лечения. *Вестник новых медицинских технологий*. 2007;14(3):209-212. [Klimov VS, Shulev JuA, Vinokurov VU. The Pathomorphologic Descriptions of Spinal Cord in Persons Killed as a Result of Mechanical Trauma of Cervical Section Vertebral Column Depending on Treatment Method. *Journal of New Medical Technologies*. 2007;14(3):209-212. (In Russian)]

11. Цымбалюк ВИ, Неводник ВИ, Сальков НН. Вторичные изменения спинного мозга под влиянием

длительной компрессии при травме позвоночника и спинного мозга в шейном отделе. *Український нейрохірургічний журнал*. 2013;(4):544-59. [Cymbaljuk VI, Nevodnik VI, Sal'kov NN. Secondary changes in the spinal cord under the influence of prolonged compression in spinal cord and spinal cord injuries in the cervical region. *Ukrainian Neurosurgery Journal*. 2013;(4):544-59. (In Russian)]

12. Борщенко ИА, Басков АВ, Коршунов АГ, Сатанова ФС. Некоторые аспекты патофизиологии травматического повреждения и регенерации спинного мозга. *Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко*. 2000;(2):28. [Borshhenko IA, Baskov AV, Korshunov AG, Satanova FS. Some aspects of the pathophysiology of traumatic injury and regeneration of the spinal cord. *Burdenko's Journal of Neurosurgery*. 2000;(2):28. (In Russian)]

Поступила 16.05.2019 г.
Принята к печати 04.09.2019 г.
Received 16 May 2019
Accepted for publication 04 September 2019

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.