



**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АКСОНАЛЬНЫХ ВОЛОКОН
ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ: ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ,
ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ
ПОДХОДЫ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
НЕЙРОПАТИИ**

Жураев Мухаммадназар Баходирович

*Ташкентский государственный медицинский университет, кафедра
медицинской и биологической химии №1*

Email: mukhammadnazard@gmail.com

Аннотация: Диабетическая периферическая нейропатия носит характер дистальной симметричной аксонопатии, и её количественная оценка основана на измерении структурных и молекулярных показателей аксональных волокон. В данном тезисе систематизируются методы оценки аксональных волокон периферических нервов на трёх уровнях: (i) гистоморфометрический — плотность миелинизированных волокон, диаметр аксонов, толщина миелина и g-ratio на полутонких срезах; (ii) электронно-микроскопический — немиелинизированные аксоны, соотношение аксон–миелин и стереологический подсчёт; (iii) биохимический — маркёры окислительного стресса, гликации и апоптоза клеток Шванна. Обсуждаются роль и ограничения каждого метода в оценке диабетической нейропатии. Результаты составляют методическую основу панели оценки аксонального повреждения в планируемом докторском исследовании.

Ключевые слова: аксональные волокна; гистоморфометрия; g-ratio; плотность миелинизированных волокон; электронная микроскопия; диабетическая периферическая нейропатия; биохимические маркёры; регенерация невритов.



Введение:

Диабетическая периферическая нейропатия — наиболее распространённое осложнение сахарного диабета, характеризующееся прогрессирующей дегенерацией дистальных аксонов [2]. «Золотым стандартом» выявления аксонального повреждения остаётся количественный морфометрический анализ биопсии нерва; вместе с тем, в соответствии с направлением кафедры биохимии, структурные измерения должны дополняться биохимическими маркёрами, отражающими молекулярные механизмы аксональной дистрофии. Цель настоящего тезиса — систематизировать методы, применяемые для оценки аксональных волокон при ДПН, и обосновать их как панель конечных точек докторского исследования.

Основная часть:

Гистоморфометрические методы. Для оценки миелинизированных аксонов полутонкие срезы толщиной 0,5–1 мкм окрашивают 1% толуидиновым синим и анализируют в световом микроскопе [12]. В каждом образце периметр не менее 200 миелинизированных волокон обводится вручную с помощью дигитайзера, по площадям волокна и аксона строятся распределения «размер–частота»; вычисляются плотность волокон (число волокон на единицу площади) и доля фасцикулярной площади, занятая миелинизированными волокнами (%) [13]. Из площади волокна диаметр выводится в предположении окружности; g-ratio определяется в двух вариантах: как квадратный корень из отношения площади аксона к площади волокна или как отношение диаметра аксона к диаметру вместе с миелином, где диаметр равен измеренному периметру, делённому на π . Стереологическим методом точечного подсчёта фасцикулярная площадь оценивается при увеличении $158\times$ с сеткой плотностью 100 точек/ $2,5\text{ мм}^2$ трижды; доля миелинизированных волокон определяется при $1720\times$

путём подсчёта в общей сложности 576 точек [5]. В планируемом протоколе нашего систематического обзора именно эти переменные исхода — число и плотность нервных волокон, диаметр аксона (мкм), толщина миелина (мкм) и g-ratio — определены как основные морфометрические показатели [6]. *Электронно-микроскопические методы.* Для оценки немиелинизированных аксонов и соотношений аксон–миелин ультратонкие срезы (70 нм) контрастируют уранилацетатом и цитратом свинца и исследуют в электронном микроскопе. Из каждой биопсии не менее 25 электронных микрофотографий печатаются при конечном увеличении 10 000×, и подсчитываются несвязанные и связанные профили клеток Шванна; немиелинизированные аксоны идентифицируются по критериям нейротубул и нейрофиламентов в составе аксонов, округлости аксонов и распределения внутри клетки Шванна, плотность рассчитывается относительно общей эндоневральной площади. Соотношение аксон–миелин определяется на основе электронных микрофотографий при увеличении 27 420× как зависимость между натуральным логарифмом площади поперечного сечения аксона и толщиной миелиновой оболочки (в числе миелиновых пластинок); в среднем исследуется $47,2 \pm 3,7$ волокна от каждого нерва. *Функционально-аналитические (in vitro) методы.* Способность аксонов к росту измеряется анализом роста невритов (neurite outgrowth): подсчитываются точки пересечения на расстоянии 100 мкм от тела клетки. При STZ-диабете гликация белков эндоневрального матрикса значительно снижает этот показатель — 160 ± 28 точек пересечения на ламинине против 90 ± 18 на метилглиоксаль-гликированном ламинине ($P \leq 0,05$), а на расстоянии 100 мкм от тела клетки — 32 ± 3 против $17,4 \pm 3$; аминогуанидин предотвращает это снижение [4]. *Биохимические методы (направление кафедры).* Молекулярные маркёры аксональной дегенерации делятся на четыре

группы: (1) окислительный стресс — MDA+4-гидроксиалкенали, GSH, SOD и каталаза в гомогенате нерва (0,1 моль/л натрий-фосфатный буфер, pH 6,5; для SOD/каталазы центрифугирование при 20 000 g в течение 20 минут) [8]; (2) гликация — MG-H1 в эндоневральных белках (~5-кратное увеличение за 6 недель) и фруктозиллизин (от 6-кратного за 3 недели до 13-кратного за 12 недель) , а у пациентов — пентозидин в суральном нерве [1]; (3) нейровоспаление и апоптоз клеток Шванна — NF-κB, TNF-α, IL-1β, IL-6, а также CHOP, каспаза-12, TUNEL и проточная цитометрия Annexin V/PI (Chong et al., 2024; Li et al., 2017); (4) сывороточные биомаркёры — снижение SOD и GSH-Px и повышение MDA ($p < 0,01$) [15], снижение GPX и NO ($P < 0,05$) [7]. При вмешательствах на основе хитозана наряду с нормализацией этих показателей наблюдалось обратное развитие миелиновой дегенерации и аксонального отёка [11].

Критерий выбора метода. Структурный «золотой стандарт» (морфометрия + электронная микроскопия) даёт конечную степень потери аксонов; биохимические маркёры фиксируют количественное смещение на ранних стадиях повреждения . Поэтому в докторском исследовании морфометрическая панель (не менее 200 волокон, g-ratio, диаметр аксона, толщина миелина) интегрируется с биохимической панелью (маркёры окислительного стресса, гликации, апоптоза) и коррелируется с электрофизиологическим показателем [10].

Заключение:

Наиболее надёжным структурным стандартом оценки аксональных волокон периферических нервов является комплекс морфометрии полутонких срезов (плотность волокон, диаметр аксона, g-ratio, не менее 200 волокон) и электронно-микроскопического анализа (немиелинизированные аксоны, соотношение аксон–миелин) . С точки зрения кафедры биохимии эти структурные измерения необходимо дополнять маркёрами окислительного стресса, гликации и апоптоза

клеток Шванна, поскольку они отражают молекулярные механизмы аксональной дистрофии и позволяют выявлять повреждение на ранней стадии. Рекомендуемая интегративная панель составляет методическую основу оценки аксонального повреждения в планируемом сравнительном исследовании.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Boulton, A. J. M., Malik, R. A., Arezzo, J. C., & Sosenko, J. M. (2004). Diabetic Somatic Neuropathies. *Diabetes Care*, 27(6), 1458–1486. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.6.1458>
2. Callaghan, B. C., Cheng, H. T., Stables, C. L., Smith, A. L., & Feldman, E. L. (2012). Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *The Lancet Neurology*, 11(6), 521–534. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(12\)70065-0](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(12)70065-0)
3. Chong, Z. Z., Menkes, D. L., & Souayah, N. (2024). Targeting neuroinflammation in distal symmetrical polyneuropathy in diabetes. *Drug Discovery Today*, 29(8), 104087. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.104087>
4. Duran-Jimenez, B., Dobler, D., Moffatt, S., Rabbani, N., Streuli, C., Thornalley, P. J., Tomlinson, D. R., & Gardiner, N. J. (2009). Advanced Glycation End Products in Extracellular Matrix Proteins Contribute to the Failure of Sensory Nerve Regeneration in Diabetes. *Diabetes*, 58(12), 2893–2903. <https://doi.org/10.2337/db09-0320>
5. Jakobsen, J. (1978). Peripheral nerves in early experimental diabetes. *Diabetologia*, 14(2), 113–119. <https://doi.org/10.1007/bf01263449>
6. Juraev, M., Inoyatova, F., Galieva, Z., & Milusheva, R. (n.d.). Effectiveness of chitosan-based nerve guidance conduits in bridging peripheral nerve defects in animal models: a systematic review of preclinical evidence.

7. Kasznicki, J., Kosmowski, M., Śliwińska, A., Mrowicka, M., Stańczyk, M., Majsterek, I., & Drzewoski, J. (2012). Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Molecular Biology Reports*, 39(9), 8669–8678. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1722-9>
8. Kellogg, A. P., & Pop-Busui, R. (2005). Peripheral Nerve Dysfunction in Experimental Diabetes Is Mediated by Cyclooxygenase-2 and Oxidative Stress. *Deep Blue (University of Michigan)*, 7, 1521–1529. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1521>
9. Li, R., Ma, J., Wu, Y., Nangle, M. R., Zou, S., Li, Y., Yin, J., Zhao, Y., Xu, H., Zhang, H., Li, X., Ye, Q., Wang, J., & Xiao, J. (2017). Dual Delivery of NGF and bFGF Coacervate Ameliorates Diabetic Peripheral Neuropathy via Inhibiting Schwann Cells Apoptosis. *International Journal of Biological Sciences*, 13(5), 640–651. <https://doi.org/10.7150/ijbs.18636>
10. Redhwan, M. A. M., M.G, H., Samaddar, S., Bafail, D., Hard, S. A. A. A., Guha, S., & Dhavale, A. (2024). siRNA targeting PARP-1 alleviates diabetic peripheral neuropathy in a streptozotocin-induced rat model. *Journal of Drug Targeting*, 33(3), 424–435. <https://doi.org/10.1080/1061186x.2024.2431316>
11. Safari, M., Fakhri, S., Maleki, H., & Farzaei, M. H. (2024). Evaluating the anti-neuropathic effects of naringin-loaded chitosan nanocarriers in a murine model of constriction injury. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 39(1), 29–45. <https://doi.org/10.1177/08839115231223963>
12. Sasajima, S., Kondo, M., Ohno, N., Ujisawa, T., Motegi, M., Hayami, T., Asano, S., Asano-Hayami, E., Nakai-Shimoda, H., Inoue, R., Yamada, Y., Miura-Yura, E., Morishita, Y., Himeno, T., Tsunekawa, S., Kato, Y., Nakamura, J., Kamiya, H., & Tominaga, M. (2022). Thermal gradient ring reveals thermosensory changes in diabetic peripheral neuropathy in mice. *Scientific Reports*, 12(1), 9724. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14186-x>

13. Sima, A. A. F., Lattimer, S. A., Yagihashi, S., & Greene, D. A. (1986). Axo-glial dysjunction. A novel structural lesion that accounts for poorly reversible slowing of nerve conduction in the spontaneously diabetic bio-breeding rat. *Journal of Clinical Investigation*, 77(2), 474–484. <https://doi.org/10.1172/jci112326>
14. Won, J. C., & Park, T. S. (2016). Recent Advances in Diagnostic Strategies for Diabetic Peripheral Neuropathy. *Endocrinology and Metabolism*, 31(2), 230. <https://doi.org/10.3803/enm.2016.31.2.230>
15. Zhang, Y., Zhongcheng, Z., Song, C., & Chen, X. (2020). The Protective Effect and Mechanism of Dexmedetomidine on Diabetic Peripheral Neuropathy in Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1139. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01139>