

Морфологические особенности регенерации поврежденного нерва в условиях дозированного растяжения

Н.А. Щудло

The morphologic details of the regeneration of the nerve injured under graduated extension

N.A. Chtchoudlo

Федеральное государственное учреждение науки

«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росздрава», г. Курган (генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

С целью исследования особенностей регенерации поврежденного нерва в условиях дозированного растяжения проведены опыты на 80 собаках. В группе "опыт 1" (n=22) выполнена резекция седалищного нерва, сближение его концов за счет сгибания коленного сустава и микрохирургический эпинеуральный или эпи-перинеуральный¹ шов; в послеоперационном периоде осуществляли компенсацию дефекта удлинением сшитого нерва путем постепенного изменения положения в суставе, фиксированном аппаратом Илизарова. В группе "опыт 2" (n=27) после остеотомии или резекции участка диафиза бедренной кости осуществлен остеосинтез спице-стержневым аппаратом, после чего выполнено пересечение или резекция участка седалищного нерва и микрохирургический шов; в послеоперационном периоде проводили distraction. Контрольные эксперименты включали замещение резекционного дефекта нерва аутологичным трансплантатом (n=8) и шов "конец в конец" после нейротомии без резекции (n=23). Морфологические исследования, выполненные в сроки от 2 недель до 2 лет после операции, показали, что эффективность разработанных на основе метода Илизарова способов возмещения дефектов нервов у собак сопоставима с результатами нейрорафии² "конец в конец" в опытах без дефекта, а в отдельных случаях превышает их, что следует интерпретировать как проявление морфогенетического эффекта дозированного растяжения. Distractionный минифасцикулярный регенерат, формирующийся при осложнениях данного метода, обеспечивает частичное морфо-функциональное³ восстановление, сравнимое с результатами аутопластики.

Ключевые слова: нерв, регенерация, аутонейропластика, дозированное растяжение.

Experiments were made using 80 dogs to study the details of the regeneration of the nerve injured under graduated extension. In group "experiment 1" (n=22) resection of the sciatic nerve was made as well as its ends were brought closer at the expense of the knee flexion, and microsurgical epineural or epiperineural suture was made; the defect was compensated postoperatively using lengthening of the nerve sutured by gradual changing position in the joint, fixed with the Ilizarov fixator. In group "experiment 2" (n=27) after osteotomy or resection of the femoral shaft part osteosynthesis was performed using a wire-and-half-pin device, and after that intersection or resection of the sciatic nerve part was performed and also microsurgical suturing was made; distraction was performed postoperatively. Control experiments consisted in filling the resection defect of the nerve with an autologous graft (n=8) and in suturing by "end-to-end" way after neurotomy without resection (n=23). The morphologic studies made within the periods from 2 weeks to 2 years after surgery have demonstrated that the effectiveness of the techniques for canine nervous defect filling based on the Ilizarov method is comparable with the results of neurorrhaphy "end-to-end" in defect-free experiments, and in some cases it exceeds them, that should be interpreted as manifestation of the morphogenetic effect of graduated extension. The distraction minifascicular regenerate, formed in case of the technique complications, ensures partial morphofunctional recovery comparable with autoplasty results.

Keywords: nerve, regeneration, autoneuroplasty, graduated extension.

ВВЕДЕНИЕ

Повреждения нервов вызывают серьезные и нередко стойкие функциональные расстройства. Несмотря на высокие регенераторные потенциалы аксонов периферической нервной системы, при полных анатомических перерывах нервов возникают показания для оперативного вмешательства, направленного на точное сопоставление рассеченных пучков нервных волокон. Это важнейшее условие для оптимальной регенерации, но нередко и оно оказывается недостаточным для полноценного восстановления утраченных функций.

Пересечение нерва включает повреждение

множества нервных клеток с ампутацией и необратимой утратой значительной части аксоплазмы, а также разрушение микроокружения нервных волокон, обеспечиваемого эндо-, пери- и эпинеуральными оболочками. Чтобы восстановить исходный объем аксоплазмы, нейроны затрачивают колоссальные усилия на вторичную экстензию поврежденных периферических отростков и восстановление функциональных связей с органами-мишенями. Регуляция этого процесса заключается в сложнейших взаимодействиях между рекапитуляциями генетических программ

^{1, 2, 3} Авторский вариант написания.

развития, заложенных в телах нейронов, локальными клеточными реакциями и молекулярно-биологическими событиями, ориентирующими и поддерживающими аксональные выросты на протяжении всего регенерационного пути от зоны повреждения до органов-мишеней.

Одна из концепций теории морфогенеза постулирует, что направленность роста нервных волокон определяется также и механическими

факторами [1]. Эта концепция подтверждена *in vitro*: если среду культуры нейробластов ориентировать путём растяжения, нервные волокна растут упорядоченно. Мы предположили, что применение аппарата и метода Илизарова позволяет воспроизвести указанный эффект в зрелом живом организме и оптимизировать регенерацию нерва после травматического дефекта, что определило цель исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 80 собаках, которые были распределены на две опытные группы и две контрольные. Методика эксперимента в группе "опыт 1" (n=22) включала резекцию седалищного нерва, сближение его концов за счет сгибания коленного сустава и микрохирургический эпинеуральный или эпиперинеуральный шов; в послеоперационном периоде осуществляли компенсацию дефекта удлинением сшитого нерва путем постепенного изменения положения в суставе, фиксированном аппаратом Илизарова – его специально разработанной экспериментальной модификацией. Объём резекции седалищного нерва в этой группе опытов от 10 до 15 мм, что составляло 15 % длины бедра собак.

В группе "опыт 2" (n=27) оперативное вмешательство включало остеотомию или резекцию участка диафиза бедренной кости (от 1 до 4 см, что составляло от 10 до 25 % длины бедра), остеосинтез спице-стержневым аппаратом (костные фрагменты в аппарате сближали до контакта костных раневых поверхностей, что в опытах с резекцией приводило к укорочению бедра), после чего выполняли пересечение или резекцию участка седалищного нерва и микрохирургический шов. В опытах с остеотомией через 7-9, а в опытах с резекцией через 9-11 дней после операции начинали distraction фрагментов бедренной кости с суточным темпом 0,5 и 0,75 мм и шагом 0,25 мм, которую продолжали до удлинения бедра на 10, 12, 15, 18 и 25 %.

Контрольные эксперименты включали замещение резекционного дефекта нерва аутологичным трансплантатом (n=8) – "контроль 1" и шов конец в конец после нейротомии без резекции (n=23) – "контроль 2".

Все операции выполняли под внутривенным комбинированным наркозом в асептических условиях. В сроки от 2 недель до 2 лет после операции животные выведены из опыта передозировкой барбитуратов.

Для гистологического исследования участок седалищного нерва, включающий зону швов, перед иссечением фиксировали к деревянной основе так, чтобы уровень швов оказался на её

середине. Большеберцовый и поверхностный малоберцовый нервы иссекали на уровне средней трети голени.

Иссеченные кусочки помещали в охлажденную смесь 2 % растворов глутарового и параформальдегидов на фосфатном буфере (pH 7,4) с добавлением 0,1 % пикриновой кислоты. На следующие сутки материал измельчали по специальной схеме. Материал, предназначенный для обзорного гистологического исследования, дофиксировали не менее месяца в 10 % нейтральном формалине или сиропе "суза" по Гейденгайну, после чего заливали в парафин и целлоидин. Для выявления реакций соединительной ткани поперечные и продольные срезы нервов окрашивали гематоксилин-эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, трехцветным методом по Массону. Кусочки, предназначенные для импрегнации серебром, фиксировали не менее 8 месяцев в 10 % нейтральном формалине. Для приготовления поперечных полутонких срезов измельченный материал вновь погружали в альдегидный фиксатор на 24 часа, постфиксировали четырехокисью осмия и по стандартной методике заливали в эпоксидные смолы. Срезы толщиной 0,5, 1 и 2 мкм выполняли с помощью стеклянных и алмазных ножей на ультратомах фирмы LKB (Швеция). Для дифференцированного выявления мягкотных и безмякотных нервных волокон срезы окрашивали метиленовым синим и основным фуксином. Гистологические препараты и полутонкие срезы изучали и фотографировали, используя большие исследовательские микроскопы фирмы «Opton» (ФРГ).

В части экспериментов качественные характеристики регенераторного процесса дополнили морфометрическими исследованиями полутонких срезов. Используя исследовательские микроскопы фирмы "Opton" и аппаратно-программный комплекс "ДиаМорф" (Москва), с каждого уровня оцифровывали от 30 до 80 полей зрения с изображениями не менее 500 мягкотных нервных волокон (инструментальное увеличение 1250×) для определения их численно-размерных характеристик.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В опытных группах у 4 животных из 49 получено осложнение – расхождение швов. Однако концевую невротому и глиому соединял фиброзный тяж, в который врастали регенерировавшие нервные волокна. В отдалённые сроки наблюдения (2 года) этот регенерат внешне напоминал трансплантат. В его продольных гистологических срезах обнаружены минифасцикулы – микроскопически малые пучки нервных волокон. Каждый из них заключён в собственное периневральное влагалище, сформированное одним слоем периневральных клеток. В некоторых минифасцикулах внеклеточный матрикс практически не окрашивается (рис. 1, А). Такие минифасцикулы, как правило, содержат небольшое количество мягкотных волокон, среди которых нет представителей крупного калибра. В более крупных минифасцикулах тинкториальные свойства внеклеточного матрикса сопоставимы с эндоневрием интактного нерва (рис. 1, Б и Г). Нередки картины слияния минифасцикул друг с другом (рис. 1, А). Значительная разница в степени дифференцировки мягкотных волокон в разных минифасцикулах в отдалённые сроки после операции (рис. 1, Б, сравнить 1 и 2) убеждает в том, что в течение длительного времени в регенерате могут появляться всё новые и новые минифасцикулы. Кроме того, в составе одной минифасцикулы могут встречаться волокна, которые тоже резко отличаются по степени дифференцировки (рис. 1, В) – следовательно, минифасцикулы могут увеличиваться в размерах за счёт появления в их составе новых волокон. Кроме того, двигательные и проприоцептивные мягкотные волокна весьма значительно увеличивают свою толщину после реиннервации органов-мишеней. Все эти процессы приводят к постепенному замещению рубца тканями периферического нерва, однако органотипической перестройки не наступает вплоть до 2 лет после операции. Самые крупные пучки могут содержать сотни и тысячи мягкотных волокон, но не десятки тысяч, как в интактном седалищном нерве.

Численная плотность мягкотных волокон в регенерате выше, чем в проксимальном отрезке нерва в 1,7-2,5 раза за счёт хорошо известного эффекта арборизации осевых цилиндров. Однако в пучках дистального отрезка этот параметр резко снижен: он составляет от 50 до 80 % от значений проксимального отрезка (индекс невротизации 0,5-0,8).

Аналогичная закономерность отмечается в опытах с аутопластикой, что совпадает с данными других авторов, полученными на кроликах [14]. Основная причина этого заключается, по-видимому, в том, что значительная часть регенерирующих волокон врастает не в суженные в результате денервационной атрофии периневральные трубки, а в эпиневрив. В препаратах берцовых нервов прослеживается их регенерация на периферию по рыхлой соединитель-

ной ткани эпиневрив. Но даже те волокна, которые невротизировали эндоневральные трубки, имеют сниженные показатели дифференцировки: через 2 года после операции доля мягкотных проводников толще 7 мкм не превышает 10 %.

В остальных 45 опытах мы не обнаруживали между концами нерва макроскопического диастаза, заполненного фиброзным рубцом. По-видимому, регенерирующие осевые цилиндры прорастали линию швов в течение первых двух недель после операции – во всяком случае через 14 дней их филаментозные тяжи отчётливо выявлялись в дистальном отрезке нерва.

Для всех экспериментов с соединением концов нерва "конец в конец" (обеих опытных и контрольной группы с нейроррафией без дефекта) характерно образование скоплений периневральных клеток (рис. 2) в субпериневральной зоне и в области эндоневральных септ на протяжении 0,5-1 см от уровня пересечения как в проксимальном, так и в дистальном отрезке нерва. Такие скопления можно обнаружить в сроки от 2 недель до полугода после операции. На светооптическом уровне периневральные клетки отличаются от фибробластов чёткими контурами, характерным угловатым ядром с тёмной кариоплазмой, в которой практически никогда не выявляются ядрышки. Целостность периневральных футляров крупных пучков, по-видимому, восстанавливается отчасти за счёт соединительнотканного эпи-периневрального⁴ рубчика протяжённостью не более 100 мкм, отчасти путём реституции за счёт миграции и пролиферации периневральных клеток.

В пучках с восстановленным периневрием даже в условиях distraction на уровне швов формируется типичный для эндоневрия фибриллярный коллагеновый каркас, в котором располагаются продольно ориентированные тяжи шванновских клеток, невротизированные регенерирующими аксонами. В течение первого месяца после операции аксоглиальные комплексы содержат буквально единичные миелинизирующиеся осевые цилиндры. Однако уже через 3-4 месяца отношение численной плотности регенерирующих мягкотных волокон в пучках дистального отрезка к соответствующему параметру проксимального (индекс невротизации) у разных животных варьирует от 1,0 до 2,5. Равенство численной плотности мягкотных волокон в пучках дистального и проксимального отрезков либо более высокое значение этого параметра в дистальном отрезке прослеживается также в отдалённые сроки наблюдения. Некоторое количество регенерирующих волокон прорастает на периферию по эпиневриву дистального отрезка так же, как при регенерации через диастаз или трансплантат. Среди них практически не встречаются хорошо миелинизированные крупные мягкотные проводники даже через год после операции (рис. 3).

⁴ Авторский вариант написания.

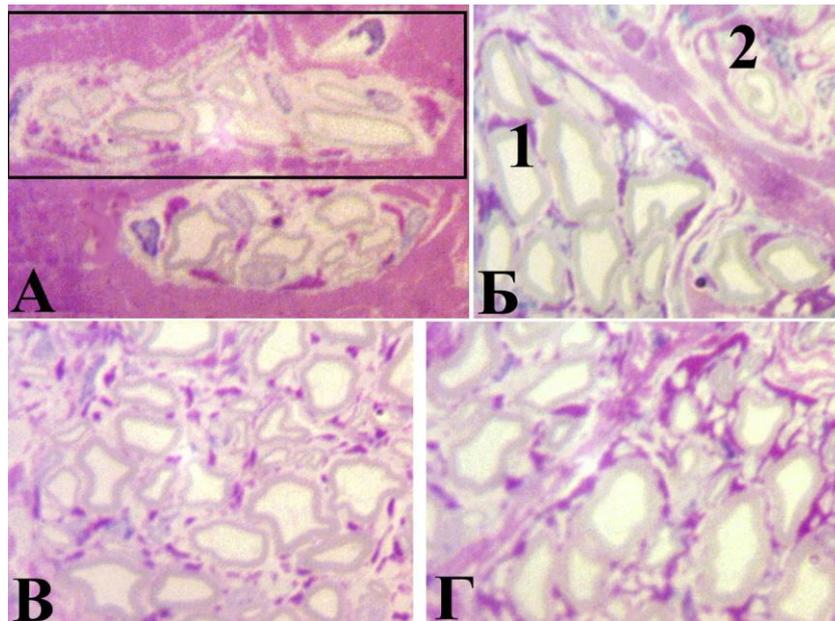


Рис. 1. Фрагменты поперечного полутонкого среза дистракционного минифасцикулярного регенерата через 2 года после операции. Окраска по Уикли. Увеличение 1250×. А – в рамке – слияние минифасцикул; Б: 1 – зрелая минифасцикула с типичным для эндоневрия внеклеточным матриксом; 2 – вновь формирующаяся минифасцикула

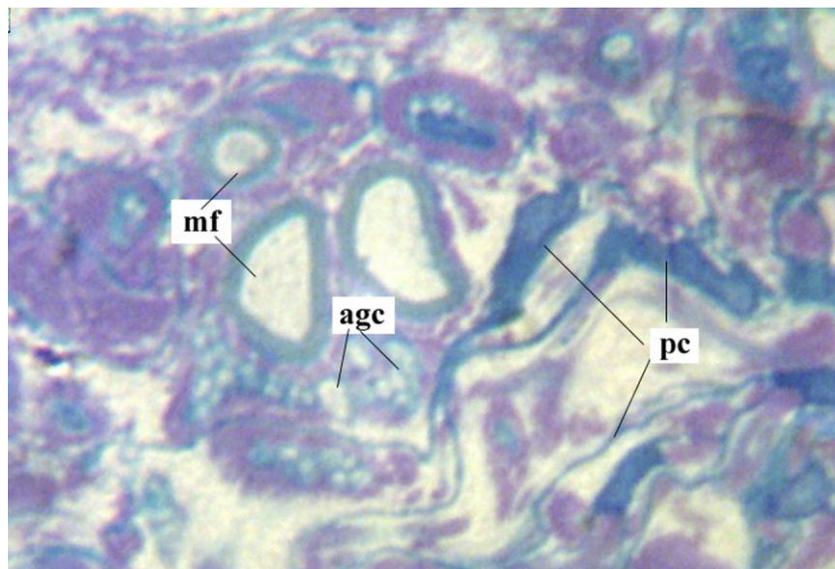


Рис. 2. Скопление периневральных клеток (pc) в субпериневральной зоне дистального отрезка нерва через 3 месяца после шва "конец в конец". mf – регенерировавшие мягкотные волокна, agc – незрелый аксо-глиальный комплекс. Окраска по Уикли. Увеличение 1250×

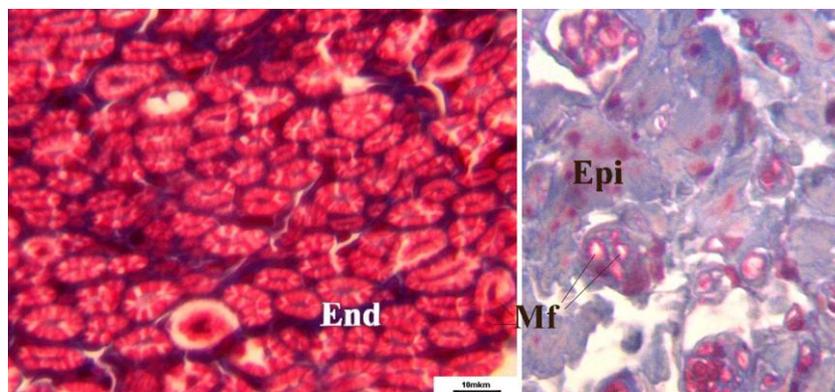


Рис. 3. Регенерировавшие в условиях дозированного растяжения мягкотные волокна дистального отрезка седалищного нерва. 12 месяцев после операции. Окраска Массон-трихром. Увеличение 500×. MF – крупные мягкотные волокна, регенерировавшие интрафасцикулярно (слева) и экстрафасцикулярно (справа). End – эндоневрий. Epi – эпиневрй

целостности периневрия основных пучков нерва при нейроррафии⁷, а также оптимальный режим distraction в послеоперационном периоде), позволяет профилакировать расхождение даже ультратонких швов нерва.

В этих условиях проявляется тенденция к лучшему, по сравнению с контрольными опытами без distraction, восстановлению миеоархитектоники регенерирующего нерва за счёт увели-

чения доли мягкотных волокон крупного калибра. При оценке значения этого параметра следует учитывать, что рост аксонов в толщину и, соответственно, появление в составе регенерирующего нерва крупных проводников, имеющих, как известно, высокую скорость проведения, становится возможным только после восстановления функциональных связей аксотомированных нейронов с органами-мишенями [10].

ВЫВОДЫ

1. Эффективность разработанных на основе метода Илизарова способов возмещения дефектов нервов у собак сопоставима с результатами нейроррафии⁸ "конец в конец" в опытах без дефекта, а в отдельных случаях превышает их, что следует интерпретировать как проявление морфогенетического эффекта дозированного растяжения.

2. Дистракционный минифасцикулярный регенерат, формирующийся при осложнениях данного метода, обеспечивает частичное морфофункциональное восстановление, сравнимое с результатами аутопластики.

3. При регенерации нервных волокон через трансплантат или диастаз, замещённый фиброз-

ным рубцом, численная плотность и степень дифференцировки мягкотных проводников в дистальном отрезке нерва остаются низкими даже в отдалённые сроки эксперимента. С высокой долей вероятности эти показатели можно рассматривать в качестве структурных коррелят стойкого функционального дефицита, наблюдающегося у многих пациентов при лечении травм нервов в клинике.

4. Восстановление нервов швом "конец в конец" в сравнении с аутонейропластикой обеспечивает более эффективную в количественном и качественном отношении невротизацию дистального отрезка повреждённого нерва.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бодермер, Ч. Современная эмбриология / Ч. Бодермер. - М.: Мир, 1971. - С. 192.
2. Реактивные свойства эпи- и периневрия и экспериментально-морфологическое обоснование техники шва нервов / В. Л. Коваленко, В. И. Шевцов, М. М. Щудло, Н. А. Щудло // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2000. - Т. 130, № 8. - С. 211-215.
3. Смирнов, А. В. Злокачественные опухоли оболочек периферических нервов с клеточным иммунофенотипом периневральных клеток (периневральная саркома?) / А. В. Смирнов, И. Н. Соколова // Архив патологии. - 1995. - Т. 5. - С. 14-20.
4. Фукс, Б. Б. Наблюдение над дегенерацией и регенерацией нервных волокон в экспериментальных невромах. / Б. Б. Фукс // Вопросы травматологии и ортопедии. - Новосибирск, 1959. - С. 221-229.
5. Щудло, М. М. (Chitoudlo M.) El epitelio perineural, su característica y posición en el sistema de los tejidos. / М. М. Щудло // II seminario científico. Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Universidad de la Habana, 9-12 Diciembre 1969. Extractos de Comunicaciones, p.107.
6. Щудло, М. М. Дифференцировка клеток периневрального эпителия в процессе развития периферических нервов / М. М. Щудло, Н. Д. Зайцев, В. В. Злотникова // Дифференцировка клеток в гисто- и органогенезах: материалы III Всесоюз. симпозиум. - Киев: Наукова думка, 1975. - С. 186-190.
7. Щудло, М. М. Электронная микроскопия нейрогематического барьера периферического нерва крыс / М. М. Щудло, Н. И. Лысенко // Применение электронной микроскопии в материаловедении, биологии и медицине. Секция 2. - Киев, 1979. - С. 49-50.
8. Щудло, Н. А. Применение метода дозированного растяжения тканей и микрохирургической техники для возмещения травматических дефектов нервов и артерий конечностей без трансплантации: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Н. А. Щудло. - Курган, 2004. - 48 с.
9. Functional recovery in a tendon autograft used to bridge a peripheral nerve defect / J. Brandt [et al.] // Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. - 2002. - Vol. 36, No 1. - P. 2-8.
10. Burnett, M. G. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review / M. G. Burnett, E. L. Zager // Neurosurg. Focus. - 2004. - Vol. 16, No 5. - P. E1.
11. Regeneracion del tronco nervioso periferico. Estudio experimental / E. L. Diaz [et al.] // Rev. Esp. Cir. Osteoartic. - 1990. - Vol. 25, No 146. - P. 79-88.
12. Resistance of the blood-nerve barrier in peripheral nerve to mechanical compression; changes in the vascular permeability of the peripheral nerve trunk, dorsal root ganglia and nerve root / S. Kobayashi [et al.] // 46th annual meeting, Orthopaedic research society. - Orlando, 2000. - Poster 0839.
13. Malignant peripheral nerve sheath tumor with perineurial differentiation: "malignant perineurioma" / A. S. Rosenberg // J. Cutan. Pathol. - 2002. - Vol. 29, No 6. - P. 362-367.
14. Yamano, Y. Experimental study of interfascicular grafts in the peroneal nerve of the rabbit / Y. Yamano // Arch. Orthop. Traumat. Surg. - 1981. - Vol. 99, No 3. - P. 97-103.
15. Bridging a peripheral nerve defect using collagen filaments / S. Yoshii [et al.] // J. Hand Surg. - 2001. - Vol. 26, No 1. - P. 52-59.

Рукопись поступила 21.01.05.

^{7,8} Авторский вариант написания.