© И.В. Борисова, 2006

Альтерационные, компенсаторно-приспособительные и адаптационно-пластические структурные изменения нервов конечности при дистракционном остеосинтезе и нейротензии

И.В. Борисова

The alterative, compensatory-and-adaptive, adaptative-and-plastic structural changes of limb nerves for distraction osteosynthesis and neurotension

I.V. Borisova

Курганский филиал Южно-Уральского научного центра РАМН;
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)

ВВЕДЕНИЕ

Анализ литературы свидетельствует, что в последние десятилетия проводятся интенсивные исследования структурных изменений нервов конечностей при скелетном вытяжении, дистракционном остеосинтезе, нейротензии экспандером Радована [1-4, 10-14, 16]. Однако комплексные морфологические исследования, включающие применение световой и электронной микроскопии, а также сочетание феноменологических описаний с применением популяционно-статистического подхода для оценки изменений нервных волокон, в доступной литературе отсутствуют. Цель исследования - комплексная оценка структурных изменений проводниковой части нервов конечностей при дистракционном остеосинтезе и нейротензии по методу Илизарова.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 17 взрослых беспородных собаках. В первой серии опытов (n=14) изучали структурную реорганизацию седалищного нерва при дистракционном остеосинтезе бедренного сегмента тазовой конечности (рис. 1-1) модифицированным аппаратом Илизарова, защищённым свидетельством на полезную модель [8]. Во второй серии (n=3) исследовали изменения нервов при тракции мягких тканей в поперечном направлении – нейротензии по методу Илизарова (рис. 1-2): операции включали имплантацию опорного элемента тракционного устройства (по а.с. № 1693744) в ложе седалищного нерва. В первой серии животных выводили из опыта в конце дистракции (удлинение бедра на 14-17,5 %), в различные сроки фиксации и после снятия аппарата, во второй серии - после удлинения седалищного нерва на 25-30 % и окончания периода фиксации. Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли согласно приказу МЗ СССР № 755 1977 г.

Для исследования брали участки седалищного нерва оперированной и контралатеральной конечностей. Часть материала погружали в жидкий азот и в криостате разлагали на поперечные срезы, в которых кальций-кобальтовым методом выявляли активность АТФ-азы по Padycula-Herman [6], продольные криостатные срезы импрегнировали серебром по методике А.К. Коломийцева с соавт. (1981) [5] и по Рассказовой. Основную часть материала помещали в глутаральдегидную смесь, постфиксировали в тетраоксиде осмия и заливали в эпоксидные блоки. Полутонкие (толщиной 0,5-1,0 мкм) срезы большой площади [7] окрашивали толуидиновым синим или метиленовым синим-основным фуксином по Уикли. Ультратонкие поперечные срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца, изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100B («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 40 kV. Изображения для последующего анализа фотографировали на пластинки. Ультраструктурное исследование проведено совместно с д.м.н. М.М. Щудло.

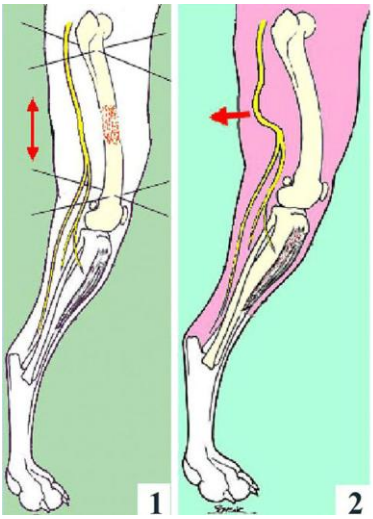

Рис. 1. Схема экспериментов: **1** – удлинение седалищного нерва собаки при дистракционном остеосинтезе. **2** – удлинение нерва при тракции мягких тканей в поперечном направлении

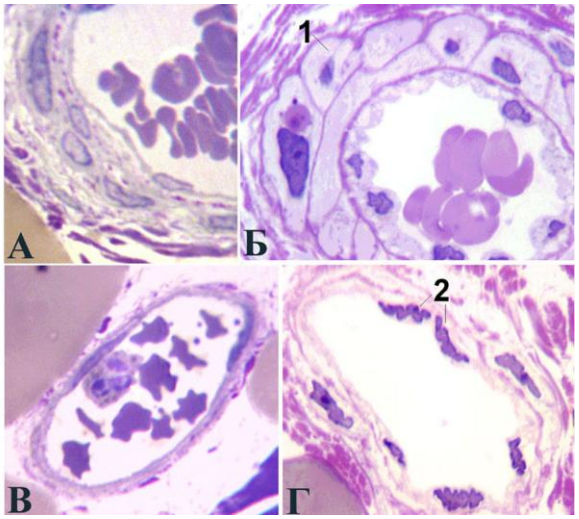

Рис. 2. Эпиневральные сосуды удлинённого седалищного нерва собаки при дистракционном остеосинтезе (**А, В**) и тракции в поперечном направлении (**Б, Г**). **А, Б** – артерии, **В, Г** – вены. Поперечные полутонкие срезы, окраска по Уикли, увеличение (УВ) 1250×. **1** – продольно-ориентированная ГМК, **2** – клетки с гофрированными ядрами

Микроскопические исследования полутонких срезов дополняли компьютерной морфометрией. Для оцифровки изображений использовали лупу и большой исследовательский микроскоп фирмы “Opton” (Германия), совмещённый с аппаратно-программным комплексом “ДиаМорф” (Москва). Формировали выборку из 30-46 полей зрения при инструментальном увеличении 1250х. Подсчитывали численную плотность мякотных волокон, оценивали их распределение по диаметру. Для каждого волокна рассчитывали число G как отношение диаметра осевого цилиндра к диаметру волокна [15]. Используя аппроксимационные средства Microsoft Excel-97, строили диаграммы зависимости числа G от диаметра мякотных волокон.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии опытов при исследовании криостатных срезов визуально определяется увеличение количества функционирующих микрососудов в эпиневрии и эндоневрии по сравнению с контралатеральным и интактным нервом. Петли эпиневрального сосудистого русла удлинённого нерва в отличие от интактного и контралатерального приобретают вытянутую форму. Сосуды артериального и артериолярного типа имеют широко раскрытые просветы. При микроскопии полутонких срезов в них определяется сохранность внутренней эластической мембраны, гипертрофия мышечной оболочки с преимущественно косоциркулярной ориентацией гладкомышечных клеток (ГМК) (рис. 2, А). Количество волокнистых и клеточных элементов в адвентиции увеличено.

В опытах с нейротензией наряду с продольной переориентацией петель эпиневрального сосудистого русла отмечается ещё более выраженное, чем в первой серии, экспансивное ремоделирование. Эпиневральные артерии имеют типичное для растущих и функционирующих в условиях гипердинамического кровотока сосудов строение: в медии увеличиваются размеры и количество ГМК, нередки миоциты, ориентированные продольно (рис. 2, Б). В стенках вен обнаруживаются гофрированные клеточные ядра, что свидетельствует о повышении тонуса (рис. 2, Г в сравнении с 2, В).

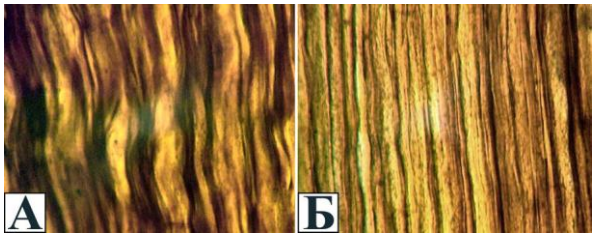

Рис. 3. Спрямление и истончение филаментозно-тубулярных тяжей при дистракционном остеосинтезе: **А** – контралатеральный нерв; **Б** – удлинённый нерв. Продольные криостатные срезы. Импрегнация серебром. УВ 500×

Изменения нервных волокон при дистракционном остеосинтезе и поперечной тракции во многом сходны. В процессе дозированного растяжения сохраняется непрерывность их осевых цилиндров и шванновских оболочек (рис. 3 и 4) при некотором спрямлении и истончении филаментозно-тубулярных тяжей. В отдельных мякотных волокнах можно отметить признаки деформационного и гипоксического стресса: удлинение узлов Ранвье в результате паранодальной демиелинизации и расширение насечек Шмидта-Лантермана (рис. 5).

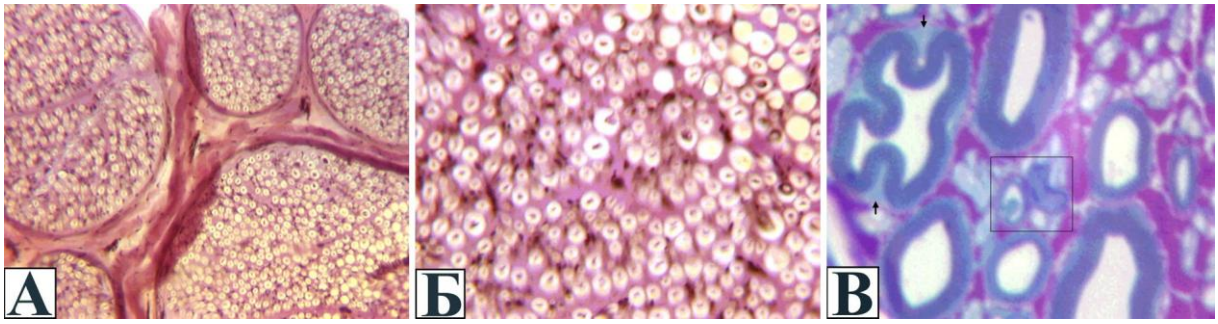

Рис. 4. Нервные волокна в конце периода дистракции, серия 1: **А** и **Б** - поперечный криостатный срез, окраска по Ван Гизону; **А** – УВ 200х; **Б** – УВ 500×; **В** - поперечный полутонкий срез (окраска по Уикли, УВ 1250×). В рамке – новообразующееся мякотное нервное волокно в ассоциации с незрелым аксо-глиальным комплексом

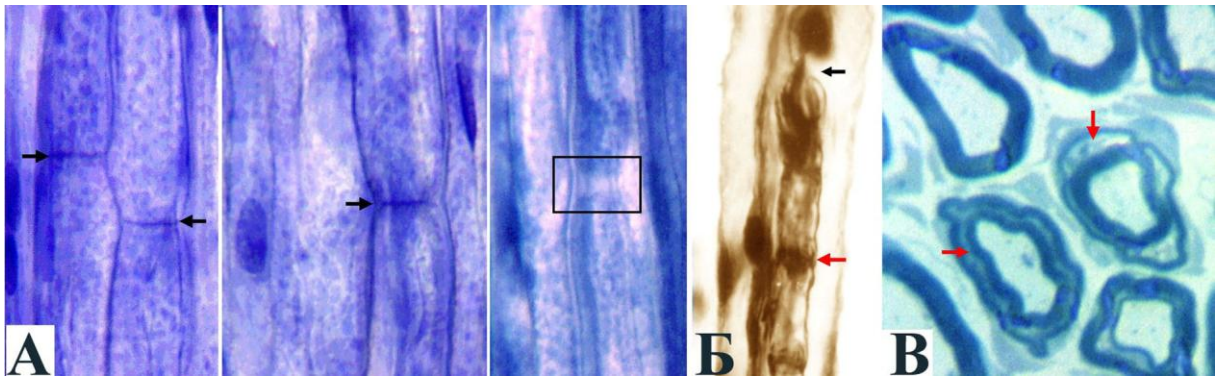

Рис. 5. Признаки деформационного стресса нервных волокон в конце дистракции: **А** – продольный криостатный срез, окраска гематоксилином Вейгерта, УВ 200×; **Б** – импрегнация по Рассказовой, УВ 200×; **В** – полутонкий срез, окраска толуидиновым синим, УВ 1250×. Чёрные стрелки – нормальные перехваты Ранвье, в рамке – "удлинённый" перехват Ранвье. Красные стрелки – расширенные насечки Шмидта Лантермана

Фигуры аксональной дегенерации и демиелинизации единичны. Наряду с этим регулярно встречаются незрелые аксо-глиальные комплексы и новообразованные мякотные волокна малого диаметра с тонкой миелиновой оболочкой в ассоциации со зрелыми безмякотными волокнами. В некоторых пучках они рассеяны по эндоневрию хаотично, в других – образуют скопления в субпериневральной зоне и вблизи эндоневральных септ. Состояние аксоскелета – разрежение или конденсация нейрофиламентов и микротрубочек в зрелых волокнах, их аккордное расположение в новообразующихся аксо-глиальных комплексах – отражает разнообразные изменения скорости аксонного транспорта.

При нейротензии спектр деструктивных изменений более широк, чем при дистракционном остеосинтезе: встречались картины валлеровской, аксональной дегенерации, демиелинизации и томакулярные изменения, хотя частота фигур деструкции от 3 до 5 %. Регенерационные кластеры, признаки арборизации мякотных волокон, новообразованные миелинизирующиеся волокна в составе незрелых униаксональных и полиаксональных аксо-глиальных комплексов обнаруживались нечасто.

По данным морфометрического анализа, численная плотность мякотных волокон в первой серии опытов к концу дистракции и особенно в ранний период фиксации увеличивается по сравнению с контралатеральным и особенно интактным нервом. Распределение мякотных волокон по диаметру остаётся бимодальным (рис. 6). Зависимость аксо-миелинового отношения от диаметра нервных волокон (рис. 7) выявляет две основные тенденции перестройки мякотных проводников. Повышение этого параметра во фракциях малого калибра доказывает присутствие новообразованных волокон с тонкой миелиновой оболочкой. Снижение его во фракциях крупного калибра отражает уменьшение диаметра и площади аксонов, связанное с нарушениями аксоплазматического тока.

В опытах с нейротензией изменения морфометрических параметров нервных волокон имеют такую же направленность, но в количественном отношении они менее выражены.

Совокупность изменений количественных параметров в сочетании с феноменологическими находками свидетельствует о том, что в удлиняемом нерве появляется большое количество новообразованных волокон и происходит перераспределение аксоплазматического тока между зрелыми и новообразующимися волокнами. По-видимому, новообразованные волокна являются отростками тех же нейронов или их дополнительными ветвлениями.

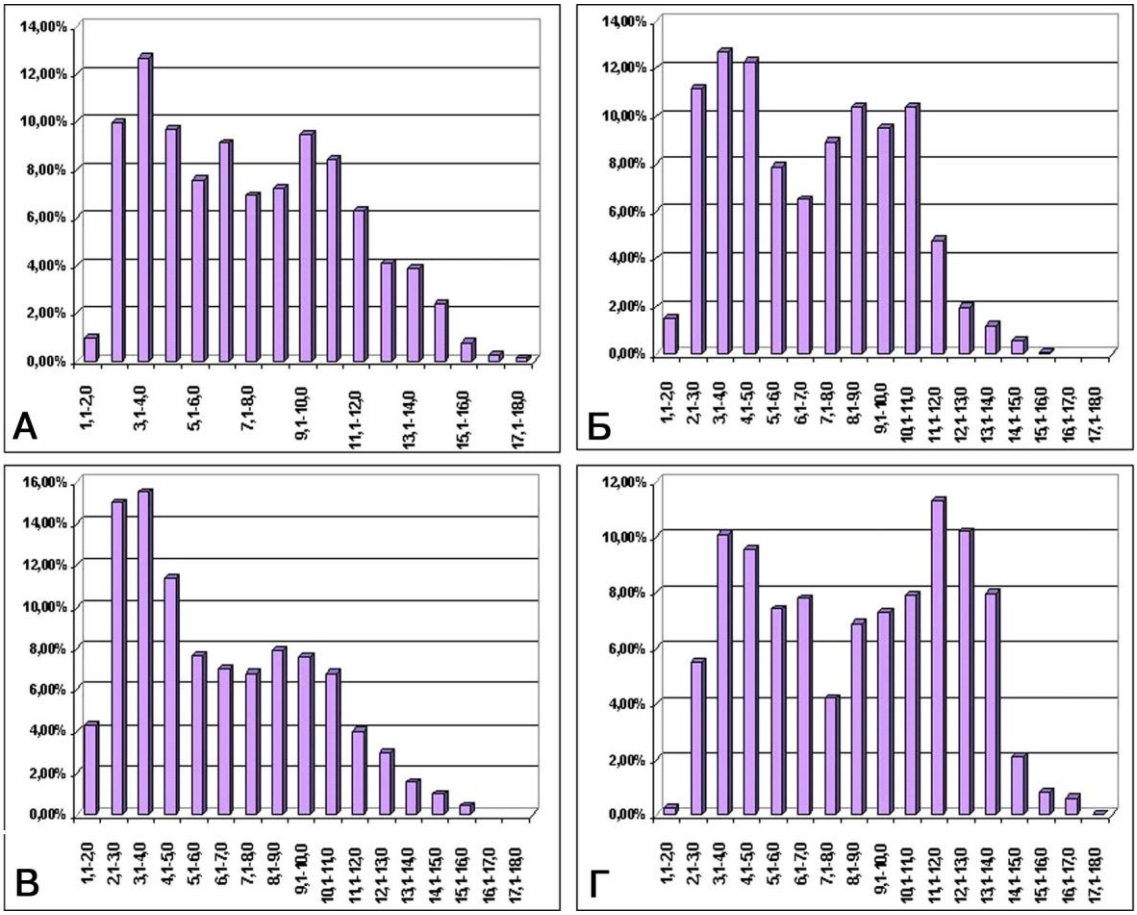

Рис. 6. Усреднённые гистограммы распределения мякотных волокон по спектру калибров в интактном нерве и опытах с дистракцией: **А** – по данным от интактных собак; **Б** – в конце дистракции; **В** – через 30 дней фиксации; **Г** – после снятия аппарата

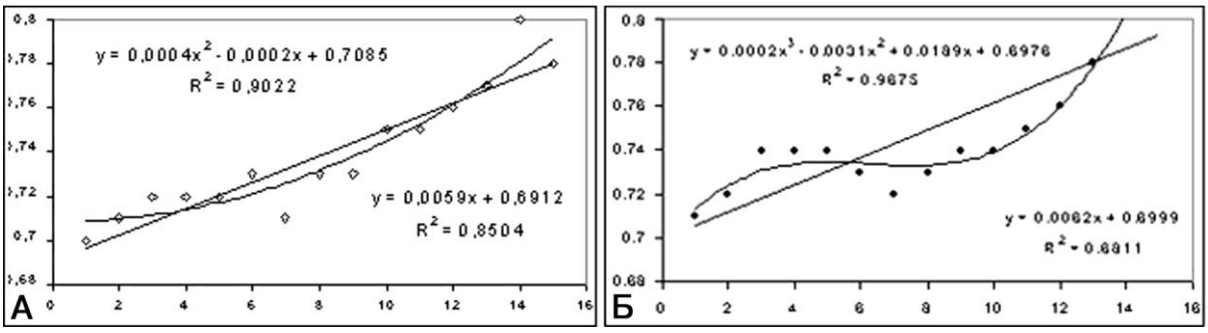

Рис. 7. графики зависимости числа G от диаметра мякотных нервных волокон: **А** – интактный нерв; **Б** – удлинённый нерв в конце периода дистракции. Ось абсцисс - диаметр мякотных волокон в микрометрах, ось ординат – значение числа G

В зрелых волокнах выражена базофилия и гипертрофия цитоплазмы шванновских клеток, ультраструктурно в ней определяется повышение содержания свободных рибосом, что свидетельствуют об усилении пластического метаболизма. Внутриклеточная гипертрофия шванновских клеток обеспечивает удлинение сегментов миелина мякотных волокон, о чём свидетельствует снижение доли ядросодержащих профилей мякотных волокон в поперечных срезах и снижение численности перехватов Ранвье в продольных срезах удлинённых нервов. В эндоневрии удлиняемого нерва можно встретить свободные (не связанные с аксонами) шванновские клетки с признаками подвижности цитолеммы, что малохарактерно для интактного нерва. По-видимому, они участвуют в формировании и элиминации вставочных сегментов миелина, репарирующих участки паранодальной демиелинизации, которые обнаруживаются в удлинённом нерве на этапе дистракции и в ранние сроки фиксации.

Признаки адаптационного роста зрелых волокон во второй серии опытов выражены ещё сильнее, чем в первой. Усиление базофилии цитоплазмы миелинобразующих шванновских клеток и их гипертрофия обнаруживалась в паранодальных и интернодальных срезах мякотных нервных волокон и особенно на уровне перикарионов (рис. 8). Даже на свето-оптическом уровне отчётливо выявлялись осевые цилиндры безмякотных волокон на фоне резко базофильной цитоплазмы шванновских клеток.

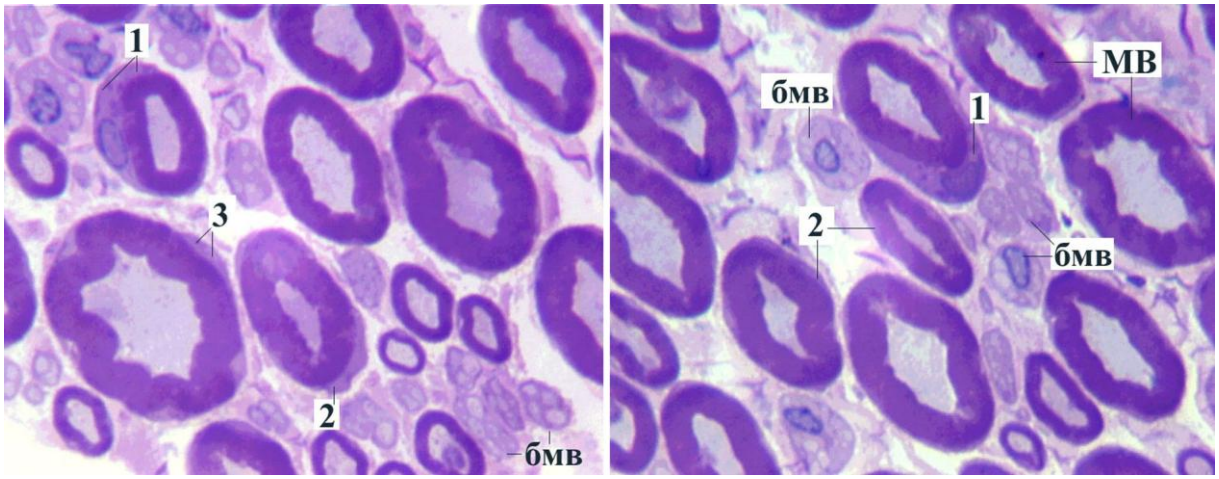

Рис. 8. Нервные волокна удлинённого седалищного нерва при тракции в поперечном направлении. Поперечный полутонкий срез, окраска по Уикли. УВ 1250×. **МВ** – мякотные волокна, **бмв** – безмякотные волокна, **1** – гипертрофия цитоплазмы миелинобразующих шванновских клеток в области перикариона, **2** – на уровне интернода, **3** – на уровне паранода

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным Г.А. Илизарова с соавт. (1982), "в оболочках нервов удлиняемой конечности взрослых животных происходит рекапитуляция целого ряда морфологических признаков, характерных для тканей, развивающихся в пре- и постнатальном периодах онтогенеза", в том числе свойственное растущим органам интенсивное и массовое новообразование собственных нервных элементов эпипериневрия. Результаты нашего исследования расширяют представления о морфогенетических процессах проводниковой части удлиняемого нерва – в частности позволяют уточнить качественные и количественные критерии сходства структуры удлиняемого нерва с нервами растущих особей:

1. Повышенное отношение численности безмякотных волокон к численности мякотных и общее повышение численности проводников по сравнению со среднестатистическими показателями нервов зрелых интактных особей.

2. Наличие большого количества недифференцированных аксо-глиальных комплексов и новообразованных волокон с тонкой миелиновой оболочкой.

3. Признаки повышенной биосинтетической и энергетической активности в цитоплазме шванновских клеток, образующих неврилемму зрелых нервных волокон.

4. Разнообразие изменений расположения элементов аксоскелета и органелл, указывающих на замедление и интенсификацию аксонального транспорта.

5. Признаки миграции шванновских клеток и ремоделирования сегментов миелина.

Кроме того, полученные результаты раскрывают морфологические эквиваленты обратимых нарушений функции удлиняемого нерва и обосновывают использование эффекта Илизарова для возмещения травматических дефектов нервных стволов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рекапитуляция признаков онтогенетического роста в оболочках нервных стволов при экспериментальном удлинении конечности у взрослых собак / Г. А. Илизаров, М. М. Щудло, А. Б. Кузнецова, А. А. Шрейнер // Закономерности регенерации и роста тканей под влиянием напряжения растяжения : сб. науч. тр. – Курган, 1982. - Вып. 8. - С. 72-79.
2. Новообразование, регенерация и рост кровеносных сосудов под влиянием напряжения растяжения / Г. А. Илизаров, М. М. Щудло, Ю. М. Ирьянов, Ф. Н. Зусманович // Структура и биомеханика скелетно-мышечной и сердечно-сосудистой систем позвоночных : сб. науч.-практ. конф. - Киев, 1984. - С. 40-41.
3. Значение ритма дистракции для реализации «эффекта Илизарова» в нервах удлиняемого сегмента конечности / Г. А. Илизаров, М. М. Щудло, Н. Р. Карымов, М. С. Сайфутдинов // Гений ортопедии. - 1995. - № 1. - С. 12-18.
4. Кузнецова, А. Б. Реакция нервного аппарата оболочек седалищных нервов при удлинении бедра по Илизарову в эксперименте / А. Б. Кузнецова // Закономерности регенерации и роста тканей под влиянием напряжения растяжения : сб. науч. тр. - Курган, 1982. - С. 195-197.
5. Коломийцев, А. К. Быстрый метод импрегнации азотнокислым серебром элементов периферической нервной системы, пригодный для целлоидиновых и парафиновых срезов / А. К. Коломийцев, Ю. Б. Чайковский, Т. Л. Терещенко // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1981. – Т.81, № 8. – С. 93-96.
6. Лойда, З. Гистохимия ферментов / З. Лойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер. - М. : Мир, 1982. - С. 87-88.
7. Щудло М. М. Целлоидинирование полутонких срезов большой площади для предупреждения образования складок при окраске / М. М. Щудло // Архив патологии. - 1982. - Т. XLIV, № 11. - С. 66-67.
8. Щудло Н.А. Аппарат для лечения повреждений и заболеваний бедренной кости животных, свидетельство №14122; Заявл. 31.12.99; Опубл. 10.07.2000. Бюл. №19.
9. Chtchoudlo, N. A. Elongation of nerve trunks using graduated traction in transversal direction / N. A. Chtchoudlo, M. M. Chtchoudlo // The Second Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology : Abstracts. – Munich, 1995. - P. 108.
10. Paranodal demyelination by gradual nerve stretch can be repaired by elongation of internodes / I. Abe [et al.] // Acta Neuropathol. (Berl). - 2002.

- Vol. 104, No 5. - P. 505-512.
11. Comportamento dei nervi sottoposti ad alluungamento / B. Battiston [et al.] // Giorn. Ital. Ortoped. Traumatol. – 1992. – Vol. XVIII, Fascicolo 1. - P. 81-88.
12. Ikeda, K. Experimental study of peripheral nerve injury during gradual limb elongation / K. Ikeda, K. Tomita, S. Tanaka // Hand Surgery. - 2000. - Vol. 5, No 1. - P. 41-47.
13. Kurokawa, T. Limb lengthening and deformity correction by Ilizarov's distraction histogenesis / T. Kurokawa // Asian Med. J. - 1999. – Vol. 42. - P. 47-50.
14. Effects of external fixation and limb lengthening on peripheral nerve function / M. R. Makarov [et al.] // Clin. Orthop. - 1996. – No 329. - P. 310-316.
15. Schmitt, F. O. The optical properties of vertebrate nerve axons related to fiber size / F. O. Schmitt, R. S. Bear // J. Cell Comp. Physiol. - 1937. - Vol. 9. - P. 261-273.
16. Stoll, G. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights / G. Stoll // Brain Pathology. - 1999. - Vol. 9. - P. 313-325.

Рукопись поступила 15.02.06.

Новости из Интернета

БИОМЕХАНИКА АППАРАТА ИЛИЗАРОВА

1: Osei NA, Bradley BM, Culpan P, Mitchell JB, Barry M, Tanner KE. Relationship between locking-bolt torque and load pre-tension in the Ilizarov frame. Injury. 2006 Jun 10; [Epub ahead of print] PMID: 16769071 [PubMed - as supplied by publisher].

Взаимосвязь между затягиванием стопорного болта и предварительным натяжением спиц в аппарате Илизарова

2: Renard AJ, Schutte BG, Verdonschot N, van Kampen A. The Ilizarov external fixator: what remains of the wire pretension after dynamic loading? Clin Biomech (Bristol, Avon). 2005 Dec;20(10):1126-30. Epub 2005 Oct 6. PMID: 16213636 [PubMed - in process].

Аппарат Илизарова: что остается от предварительного натяжения спиц после динамической нагрузки.

3: Nielsen JK, Saltzman CL, Brown TD. Determination of ankle external fixation stiffness by expedited interactive finite element analysis. J Orthop Res. 2005 Nov;23(6):1321-8. Epub 2005 Jul 19. PMID: 16046096 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Определение жесткости внешней фиксации в области голеностопного сустава путем интерактивного анализа методом конечных элементов (на примере дистракции по методу Илизарова).

4: Filipiak J, Morasiewicz L. [Biomechanical properties of external Ilizarov fixator with hybrid implants system]. Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol. 2005;70(1):49-56. Polish. PMID: 16021824 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Биомеханические характеристики аппарата Илизарова с комбинированной системой имплантатов.

5: Inan M, Mizrak B, Ertem K, Harma A, Elmali N, Ayan I. The factors affecting thermal necrosis secondary to the application of the Ilizarov transosseous wire. Acta Orthop Traumatol Turc. 2005;39(1):70-5. Turkish. PMID: 15805758 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Факторы, вызывающие термальный некроз после проведения чрескостных спиц аппарата Илизарова.

6: Nikonovas A, Harrison AJ. A simple way to model wires used in ring fixators: analysis of the wire stiffness effect on overall fixator stiffness. Proc Inst Mech Eng [H]. 2005;219(1):31-42. PMID: 15777055 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Простой способ моделирования спиц, используемых в кольцевом аппарате: анализ жесткости спиц определяет жесткость всего аппарата (аппарат Илизарова).

7: Sarpel Y, Gulsen M, Togrul E, Capa M, Herdem M. Comparison of mechanical performance among different frame configurations of the Ilizarov external fixator: experimental study. J Trauma. 2005 Mar;58(3):546-52. PMID: 15761350 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Сравнение механических характеристик различных конфигураций аппарата Илизарова: экспериментальное изучение.

8: Watson MA, Mathias KJ, Ashcroft GP, Maffulli N, Hukins DW, Shepherd DE. Wire tension in the Ilizarov system: accuracy of the wire-tensioning device. Proc Inst Mech Eng [H]. 2005 Sep;219(5):355-9. PMID: 16225152 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Натяжение спиц в системе Илизарова: точность устройства для натяжения спиц.