

Методические особенности гистоморфометрии и стереологического анализа периферических нервов в экспериментальных исследованиях¹

Т.Н. Варсегова

The technique-related peculiarities of histomorphometry and stereologic analysis of peripheral nerves in experimental studies

T.N. Varsegova

Федеральное государственное учреждение науки

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

Морфологическое описание берцовых нервов в условиях дистракционного остеосинтеза являлось предметом специальных исследований [1-4]. По мере разработки новых методик остеосинтеза возрастает интерес к изучению количественных характеристик периферических нервов, объективно отражающих полноту их мор-

фологического восстановления после повреждений [9, 14, 16], а также направленность и временные параметры изменений их морфофункционального состояния в различных условиях эксперимента. Соответственно целесообразна и разработка адекватной технологии количественного исследования периферических нервов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 23 взрослых беспородных собаках, которым после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей удлинняли голени аппаратом Илизарова с автоматическим приводом в течение 28 дней с суточным темпом 1 мм за 60 приемов (I серия) и в течение 10 дней с суточным темпом 3 мм за 180 приемов (II серия). Все эксперименты (содержание собак, хирургические вмешательства, эвтаназия) проведены в соответствии с нормативными документами (Приказ МЗ СССР № 755, 1977 г.). Животных выводили из опыта в конце дистракции (I серия n=7, II серия n=3), через 30 дней фиксации (I серия n=3, II серия n=3) и через месяц после снятия аппарата (I серия n=4, II серия n=3). Учитывая различную скорость деструкции тканей, забор и фиксацию большеберцовых нервов (ББН) осуществляли в первую очередь, так как аутолитические изменения в них наступают сразу после гибели животного. После эвтаназии ББН оперированных и контралатеральных конечностей на уровне средней трети голени закрепляли на твердой основе с целью избежания деформации и резецировали для морфологического исследования, отступая на 2 см дистальнее и проксимальнее от основы.

Нервные стволы обладают ярко выраженной анизоморфностью, так как нервные пучки и волокна в них располагаются вдоль длинной оси. Таким образом, для получения репрезентативных выборок изображений с максимально возможным количеством анализируемых структур для

морфометрического исследования использовали продольные либо поперечные патогистологические препараты (срезы). С целью визуализации интересующих структур и химических веществ в изучаемых объектах подобраны адекватные гистологические и гистохимические методики.

Для комплексного исследования периферических нервов на разных морфологических уровнях (органном, тканевом и клеточном) использовали срезы, толщина которых составляет примерно 1/20 диаметра изучаемых структур. При этом возникающий в результате затенения светлоокрашенных структур темноокрашенными эффект Холмса, вносящий систематическую ошибку при морфометрии, сводится к минимуму [11].

Проксимальные и дистальные фрагменты ББН отсекали, делили на столбики, размещали вертикально на заранее промаркированных фильтровальных бумажках и помещали в жидкий азот. На микротоме-криостате МК-25 ТУ 64-1-856-78 при t = -18 °С готовили тотальные поперечные срезы толщиной 7-10 мкм, монтировали на предметные стекла. С целью визуализации периневрия, кальций-кобальтовым методом [7] выявляли активность миозиновой АТФ-азы (рис. 1), являющейся маркером клеток с подвижной цитолеммой (в данном случае периневральных). Такие патогистологические препараты использовали для количественной оценки реакции нервных стволов на дозированное растяжение. С этой целью, используя большой исследовательский фотомикроскоп "Opton" (Германия) с аппаратно-программным комплексом "Di-aMorph" (Москва), оцифровывали изображения

¹ Научный руководитель работы д.м.н. М.М. Щудло.

тотальных срезов, в них, используя программу "MEDIAS" ("DiaMorph", Россия), измеряли общую площадь поперечного сечения нерва (A_n), суммарную площадь пучков нервных волокон вместе с окружающим их периневрием (A_{f-pn}).

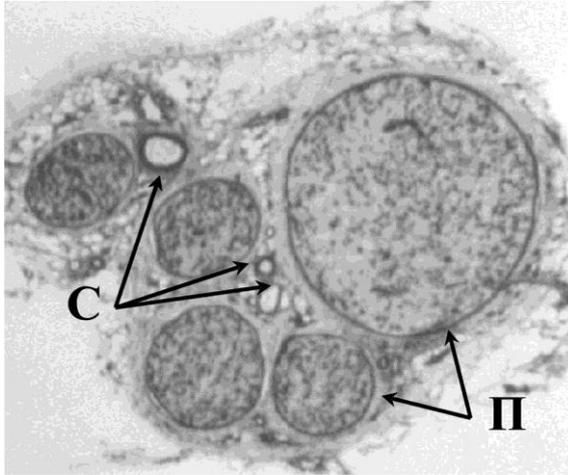


Рис. 1. Большеберцовый нерв собаки. Поперечный тотальный криостатный срез. Реакция на миозиновою АТФ-азу. Лупа 10 \times . П – периневрий; С – сосуды эпинеурия

Материал, закрепленный на твердой основе фиксировали в смеси 2 % растворов глутарового и параформальдегидов на фосфатном буфере (рН 7,4) и делили на столбики. Часть из них отмывали в проточной воде, на микротоме-криостате готовили продольные и поперечные срезы толщиной 25 мкм, монтировали на предметные стекла и импрегнировали азотнокислым серебром по пунктам 6-10 методики А.К. Коломийцева с соавт [5]. Продольные срезы использовали для оценки изменения извитости нервных волокон, длин интернодальных сегментов, состояния насечек Шмидта-Лантермана и перехватов Ранвье.

Часть столбиков по специально разработанной автором методике заливали в аралдит. Возможности использования полутонких эпоксидных срезов (ПТС) ограничивала их малая стандартная площадь – до 1 мм², затруднявшая получение репрезентативных выборок изображений для стереологических исследований. Чтобы преодолеть указанное противоречие, был разработан, апробирован и внедрен в повседневную практику ряд технических приемов, позволяющих увеличить площадь одномикронных полутонких срезов до 4-8 мм²: 1) применение специального режима проводки материала (увеличение сроков экспозиции и дополнительная пропитка в смоле с катализатором при комнатной температуре); 2) площадь основания пирамидки при ее высоте до 1,0 мм должна быть как минимум в 4 раза больше площади среза, что позволяет избежать вибрации блока и образования механических дефектов на срезах при ультратомировании; 3) тщательный контроль качества и отбор стеклянных ножей, либо использование

алмазного ножа с достаточной длиной режущей кромки; 4) фиксация срезов к предметному стеклу, предварительно покрытому тонкой целлюлозной пленкой, для предотвращения появления при окраске неровностей и складок из-за различных биомеханических свойств тканевых составляющих исследуемых объектов [12].

Для количественного исследования внутриствольных составляющих использовали ПТС, окрашенные метиленовым синим и основным фуксином по Уикли [8], позволяющие работать на больших увеличениях (объективы 40, 100 \times). Оцифрованные изображения полутонких срезов (б) и электронограмм (а) периферических нервов сопоставимы (рис. 2), что дало возможность идентифицировать и исследовать на светооптическом уровне эндоневрий, безмиелиновые и миелиновые нервные волокна (МНВ) – диаметры 1-20 мкм.

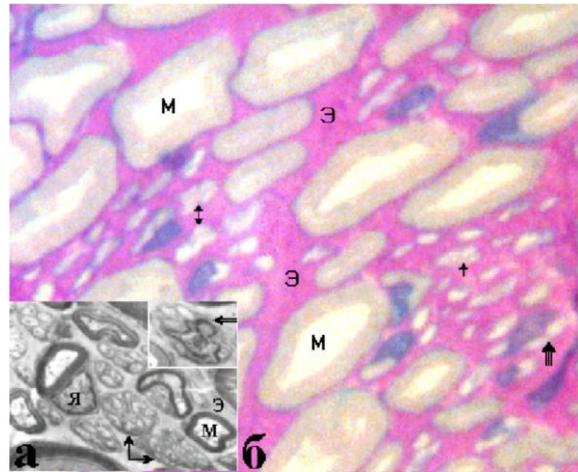


Рис. 2. Большеберцовый нерв собаки. Аралдит, поперечный ультратонкий (а, электронограмма, 1000 \times) и полутонкий (б, окраска по Уикли, об. – 100; ок. – 12,5 \times) срезы. Э – эндоневрий, М – мякотные, стрелки – безмякотные нервные волокна, Я – ядро шванновской клетки в составе мякотного нервного волокна; двойная и тройная стрелки – безмякотные нервные волокна, срезанные на уровне ядра нейролеммоцита

С помощью тестовой решетки равноудаленных точек [13] в программе Adobe Photoshop 3,0 рассчитывали стереологические параметры: относительный объем нервных волокон и эндоневрия, численные плотности МНВ (NA_{mnf}), их реактивно-деструктивно измененных форм и долю (%) последних в общем объеме выборки. В программе PhotoFinish измеряли средние диаметры МНВ (D_{mnf}), строили прецизионные гистограммы их распределения с шагом 1 мкм. С целью исследования ББН как канала передачи информации определяли энтропию по Шеннону, относительную энтропию, избыточность и организацию [6].

Контролем послужили ББН 3 интактных беспородных собак. Достоверность различий определяли в программе «AtteStat» (версия 1,0; И.П. Гайдышев, 2003) по критериям рандомизации и Вилкоксона для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что в обеих сериях БН на стороне удлинения макроскопически не обнаруживали признаков травматизации. Ни на одном из сроков эксперимента общие площади поперечных сечений БН на стороне удлинения на уровне дистракционного регенерата достоверно не увеличивались относительно аналогичных контралатеральных нервов, а суммарная площадь пучков волокон, включая периневрий, достоверно повышалась только во II серии (табл. 1) через 10 дней дистракции в ускоренном тепе (3 мм в сутки).

По окончании дистракции в проводниковой части нервов удлиненных конечностей обнаружили единичные, преимущественно крупные проводники с признаками реактивно-деструктивных

изменений, составившие в среднем 2,4 % в I и 2,6 % во II сериях (табл. 2).

Такие волокна встречаются и в интактных нервах, а незначительное повышение их количества, по мнению авторов, может быть связано с элиминацией нефункциональных в новых морфофизиологических условиях удлиненной конечности, преимущественно наиболее чувствительных миелиновых нервных волокон большого калибра, что согласуется с литературными данными [15].

Большинство же мягкотных волокон (рис. 3, А) имело нормальную структуру. На последующих этапах эксперимента измененные волокна также единичны (рис. 3, Б) в обеих сериях, и доля их сопоставима с контрольными значениями.

Таблица 1

Общая площадь поперечного среза нервного ствола (A_n) и суммарная площадь пучков нервных волокон с периневрием (A_{f-pn}) на этапах эксперимента ($M \pm m$)

Сроки (серия) эксперимента	A_n (103мкм ²)		A_{f-pn} (103мкм ²)	
	Опытная	Контралатер.	Опытная	Контралатер.
Д28(I)	2311,6±279,5	1958,0±288,4	705,5±46,3	784,8±26,6
Ф30(I)	3563,7±766,4	2650,3±344,8	868,2±135,7	903,3±90,3
БА30(I)	2248,1±311,6	2029,1±221,0	820,8±64,9	778,7±58,2
Д10(II)	2322,2±203,1	2234,7±385,1	917,0±64,7*	718,5±23,9
Ф30(II)	2194,4±396,6	2348,1±193,4	654,1±35,5	665,1±33,0
БА30(II)	1765,3±588,7	1738,0±530,9	698,8±1,23	665,9±4,1

* - различия между опытной и контралатеральной конечностями достоверны по критерию рандомизации при $p < 0,05$.

Таблица 2

Доли измененных мягкотных нервных волокон в контроле и на этапах экспериментов

Сроки эксперимента	Конец дистракции	Фиксация 30 дней (Ф-30)	Без аппарата 30 дней (БА-30)
I серия	(Д28) 2,37±0,74 %	0,54±0,18 %	0,85±0,13 %
II серия	(Д-10) 2,61±0,11 %	1,43±0,12 %	1,61±0,12 %
Контроль		до 1,52 %	

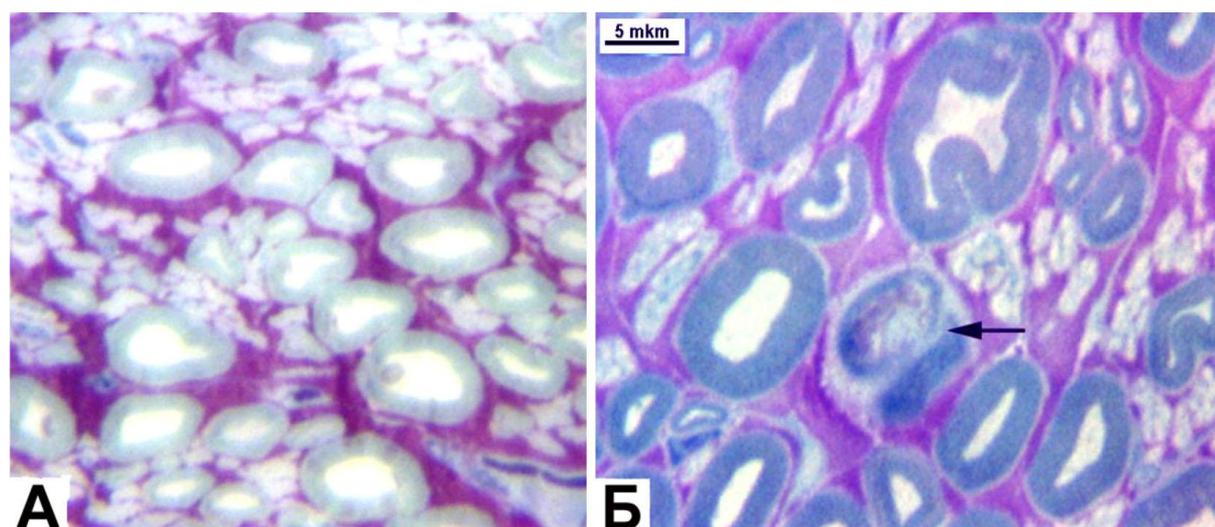


Рис. 3. Поперечные полутонкие срезы большеберцовых нервов, II серия, окраска по Уикли. А — дистракция 10 дней. Об.- 40, ок.- 12,5х; Б — фиксация 30 дней. Об.- 100 МИ; ок.- 12,5х; на стрелке — деструктивно измененное миелиновое волокно

Относительный объем волокон в I серии через 28 дней distraction понижается в 1,4 раза по сравнению с контрольными значениями (рис. 4). Через 30 дней фиксации конечности в аппарате доля нервных волокон возрастает на 25,5 % по сравнению с предыдущим сроком, но остается достоверно пониженной (в 1,1 раза) относительно нормы. В конце эксперимента достоверные различия по этому параметру отсутствуют.

Во II серии в конце distraction относительный объем эндоневрия оперированных конечностей повышается в 1,1 раза по сравнению с интактными значениями (рис. 4). Через 30 дней фиксации в аппарате этот параметр продолжает увеличиваться – соответственно объемная плотность нейральных элементов понижается в среднем на 10,1 % по сравнению с контролем. В конце эксперимента относительный объем нервных волокон повышается на 5,7 % относительно предыдущего срока – наблюдается тенденция восстановления объемных отношений внутривушковых элементов большеберцового нерва.

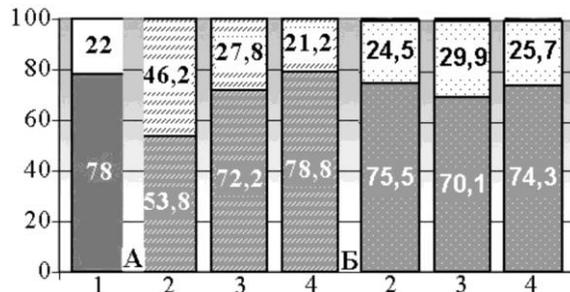


Рис. 4. Объемные плотности нервных волокон и эндоневрия БН в контроле (I) и на этапах удлинения в сериях I (A) и II (B): 2 – конец distraction, 3 – конец фиксации, 4 – без аппарата 30 дней

В I серии по окончании distraction наряду с сохранившимися нервными проводниками в большеберцовом нерве удлиненной конечности обнаруживаются миелинизирующиеся аксоны с очень тонкой, четко окрашенной миелиновой оболочкой. При этом численная плотность мягкотных нервных волокон на 12 % превышает контрольные значения (рис. 5). На этапе фиксации NA_{mnf} остается повышенной, но через 30 дней после снятия аппарата достоверные различия по этому параметру отсутствуют.

Во II серии к концу distraction численная плотность миелиновых нервных волокон большеберцового нерва удлиненной конечности достоверно снижена на 20 % относительно контроля (рис. 5). Однако это нельзя рассматривать как свидетельство потери численности нервных проводников, поскольку в это время возрастают суммарная площадь пучков нервных волокон и объемная доля эндоневрия в результате нарушения циркуляции эндоневральной жидкости. На этапе фиксации этот параметр достоверно

превышает интактные значения в 1,1 раза, что, по мнению автора, связано с процессами регенерации и спраунтинга: именно в это время в полутонких срезах обнаруживаются миелинизирующиеся аксоны малого диаметра. После снятия аппарата NA_{mnf} нормализуется.



Рис. 5. Изменение численной плотности миелиновых нервных волокон БН в контроле и на этапах удлинения голени собак автодистракторами в различных режимах: *** – различия между опытом и контролем достоверны по критерию Вилкоксона при $p < 0,001$

Такие колебания численной плотности МНВ отражают процессы новообразования волокон (в I серии преимущественно на этапе distraction, во II серии – фиксации) и элиминации избыточных [10] и функционально «изношенных» нервных проводников на последующих этапах эксперимента.

Рассмотрим, как меняется распределение мягкотных волокон по диаметру. В интактном большеберцовом нерве взрослых беспородных собак мягкотные волокна имели диаметры от 2 до 17 мкм с бимодальным характером гистограммы распределения.

В конце distraction в обоих экспериментах бимодальность сохранялась, моды находились в тех же диапазонах, что и в интактном материале (рис. 6). Однако в I серии, по сравнению с контролем, гистограмма смещена влево на 1 разряд: исчезли волокна с $D > 16,0$ мкм и появилась фракция волокон диаметром менее 2,0 мкм. Средний диаметр волокон уменьшился и варьировал от 6,13 до 6,40 мкм (контроль 6,47-7,10). Во II серии в конце distraction (рис. 6) гистограмма была укорочена справа на 3 разряда (волокна диаметром более 14,1 мкм отсутствовали), однако D_{mnf} варьировал от 7,07 до 8,39 мкм.

Через 30 дней фиксации в аппарате в I серии левая граница гистограммы восстанавливалась, D_{mnf} возрастал до 6,95 мкм, но отсутствовали волокна диаметром более 15,1-17,0 мкм (рис. 6). Через 30 дней после снятия аппарата популяция МНВ проявляет тенденцию к восстановлению: появляется фракция волокон диаметром 15,1-16,0 мкм. D_{mnf} превышал контрольные значения и варьировал от 7,21 до 7,30 мкм.

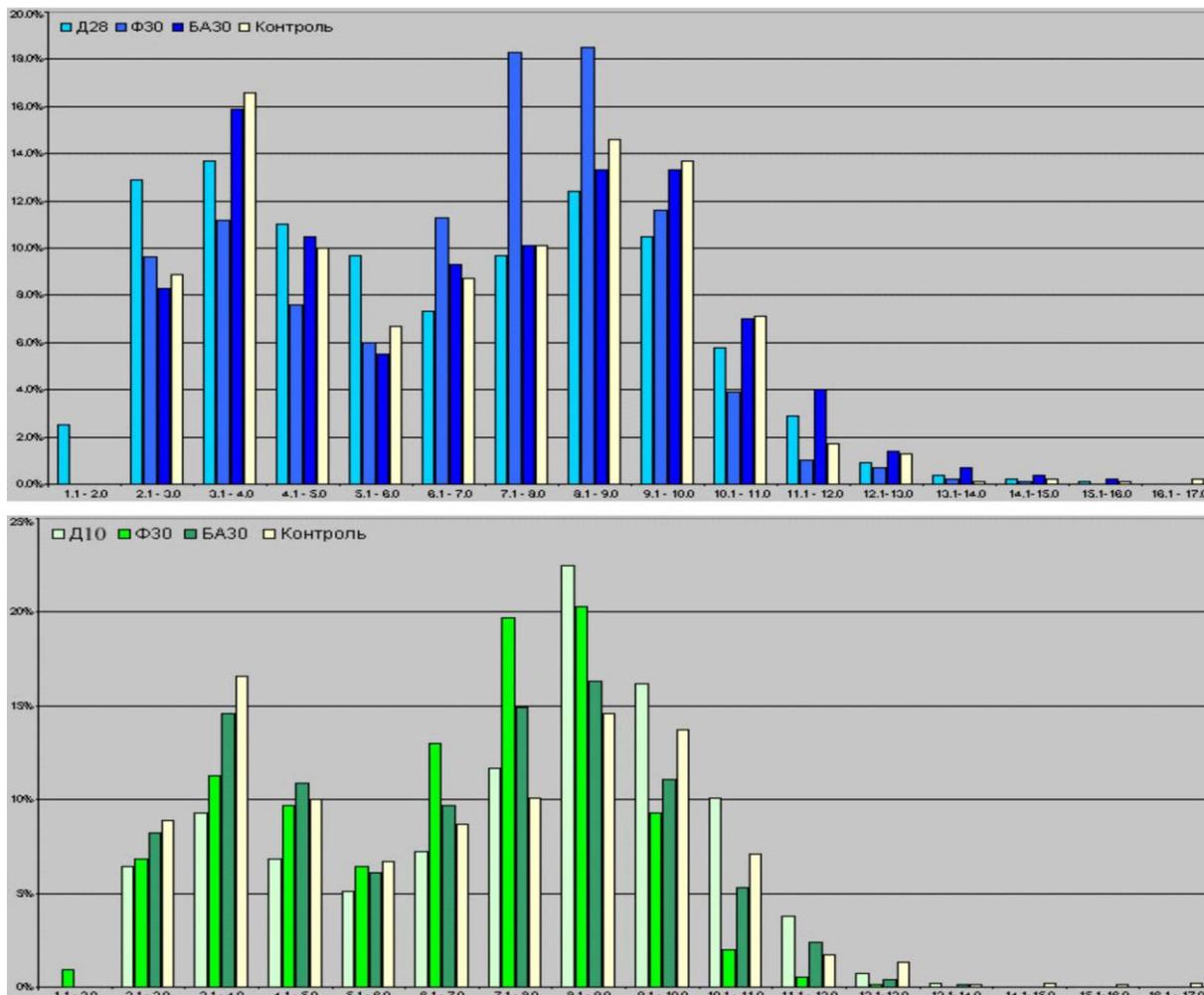


Рис. 6. Распределение по диаметрам миелиновых нервных волокон БН интактных и опытных животных на этапах эксперимента: I серия (вверху) Д-28, Ф-30 и БА-30; II серия (внизу) Д-10, Ф-30 и БА-30

Во II серии через 30 дней фиксации гистограмма была укорочена справа уже на 4 разряда относительно контроля (рис. 6), так как отсутствовали волокна диаметром более 13,1 мкм. В то же время гистограмма смещалась влево: появлялась фракция волокон диаметром менее 2,0 мкм. При этом D_{mnf} уменьшался и варьировал от 6,23 до 6,91 мкм. Через 30 дней после снятия аппарата левая граница гистограммы восстанавливалась, правая проявляла тенденцию к восстановлению: вновь появлялась отсутствовавшая на предыдущем сроке фракция волокон диаметром 13,1-14,0 мкм. D_{mnf} варьировал от 5,91 до 7,26 мкм.

Уменьшение D_{mnf} было явлением временным: на этапах фиксации и после снятия аппарата происходила их структурная адаптация. Такое временное истончение нервных волокон, по мнению автора, связано с их упругой деформацией растяжения при удлинении голени. Последующее восстановление размерных параметров укладывается в известную [2, 4] концепцию об интеркалярном росте упруго напряженных тканевых структур за счет активизации биосинтетических процессов в клетках.

По данным информационного анализа, на

всех сроках эксперимента в обеих сериях энтропия по Шеннону и относительная энтропия не отличались от контрольных значений, что свидетельствовало о сохранении упорядоченности большеберцового нерва как органа в условиях данных экспериментов. При этом в I серии в конце distraction возрастали по сравнению с контролем избыточность и организация, снижаясь на этапе фиксации и возвращаясь к норме после снятия аппарата. Во II серии значения избыточности и организации были понижены на всех сроках эксперимента. Уменьшение избыточности свидетельствует о появлении помех и снижении надежности передачи информации по нерву, а ее возрастание – о том, что нерв как система становится более лабильным и менее экономичным [6].

Таким образом, результаты исследования большеберцовых нервов на разных этапах эксперимента показали, что при разных режимах удлинения реакция нервов на растяжение была однотипна. В I первой серии отклонение морфометрических и стереологических параметров от интактных значений наиболее выражено по окончании distraction и к концу эксперимента

достоверные различия отсутствуют: происходит структурно-функциональная адаптация нейронов к увеличению длины конечности. Во II серии удлинение производилось в течение короткого промежутка времени (10 дней), поэтому пластические перестройки большеберцового нерва наиболее выражены на этапе фиксации и

не завершаются к концу эксперимента. Существенно то, что при разных режимах удлинения голени доля миелиновых нервных волокон с признаками реактивно-деструктивных изменений превышала интактные значения только в конце дистракции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная технология количественного исследования объективно отражает полноту восстановления периферических нервов, от ко-

торой зависит и морфофункциональное состояние удлиняемой конечности в различных условиях дистракционного остеосинтеза.

ЛИТЕРАТУРА

- Илизаров, Г. А. Изменения нервных стволов голени при удлинении у собак / Г. А. Илизаров, А. А. Шрейнер, А. Б. Кузнецова // Фрагмент итогового отчета по теме 061 основного плана НИР : Влияние темпа и ритма дистракции на остеогенез у собак. – Курган, 1982. № гос. рег. 7803753. Инв. № ВНТИ Центра 0283.0080251.
- 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 // Проблемы чрескостного остеосинтеза в ортопедии и травматологии. Закономерности регенерации и роста тканей под влиянием напряжения растяжения : сб. науч. тр. КНИИЭКОТ. - Курган, 1982. - Вып. 8. - С. 72-79.
- Илизаров, Г. А. Изменения нервов голени при её удлинении в эксперименте / Г. А. Илизаров, М. М. Щудло // Лечение ортопедо-травматологических больных в стационаре и поликлинике методом чрескостного остеосинтеза, разработанным в КНИИЭКОТ : Тез. докл. Всесоюз. науч.-практ. конф. - Курган, 1982. - Ч.2. - С. 198 - 201.
- Карымов, Н. Р. Изменения нервов удлиняемого сегмента конечности при разной дробности дистракции (морфофункциональное исследование) : автореф. дис... канд. мед. наук. / Н. Р. Карымов. - Пермь, 1995. – 24 с.
- 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. LXXXI, № 8. – С. 93-96.
- Леонтьюк, А. С. И. Информационный анализ в морфологических исследованиях / А. С. Леонтьюк, Л. А. Леонтьюк, А. И. Сыкало. – Минск : Наука и техника, 1981. - 159 с.
- Лойда, З. Гистохимия ферментов: лабораторные методы / З. Лойда, Р. Госсрау, Е. Шиблер. - М. : Мир, 1982. – 230 с.
- Уикли, Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. - М. : Мир. – 1975. – 325 с.
- Уткин, В. А. Оценка разных способов восстановления поврежденного нерва по проявлениям денервационного синдрома / В. А. Уткин, Н. А. Щудло, М. М. Щудло // Гений ортопедии. - 1996. - № 4. - С. 20-24.
- Чайковский, Ю. Б. Регенерационная неврома / Ю. Б. Чайковский // Морфология. - 1999. - Т. 15, №1. - С. 55-67.
- Проблема эффекта Холмса в количественной телепатологии (метод. аспекты) / М. М. Щудло и др. - Известия Челябинского научного центра. – 2003. - Вып. 1, № 18. - С. 1-5. <http://www.sci.urfu.ac.ru/news/2003>
- Щудло, М. М. Целлоидинирование полутонких срезов большой площади для предупреждения образования складок при окраске / М. М. Щудло // Архив патологии. - М. : Медицина. - 1982. - № 11. - С. 66-67.
- Щудло, М. М. Количественный анализ метахромазии суставного хряща в телепатологии / М. М. Щудло, Т. А. Ступина, Н. А. Щудло // Известия Челябинского научного центра. - 2004. - Спец. вып. к 60-летию РАМН. - С. 17-22. http://csc.ac.ru/news/2004_special/04.zip
- Индекс невротизации и параметры мягкотных волокон в пересеченном и регенерирующем нерве после плазматического склеивания торцов его отрезков и микрохирургического анастомозирования / Н. А. Щудло, М. М. Щудло, И. В. Борисова, И. А. Мещерягина // Известия Челябинского научного центра – 2001. - Вып. 13, № 4. - С. 82-87.
- Asbury, A. K. Peripheral nerve disorders: a practical approach / A. K. Asbury, R. W. Gilliat. - London ; Boston : Butterworths, 1984. - 339 p.
- Stoll, G. Symposium: peripheral neuropathies nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights / G. Stoll, H. W. Muller // Brain Pathology. - 1999. – Vol. 9. - P. 313-325. Рукопись поступила 15.02.06.