

Экспериментальное обоснование применения адьювантной терапии церебролизином для оптимизации посттравматической регенерации периферического нерва

Н.А. Щудло, Т.В. Сизова, И.В. Борисова, М.М. Щудло, А.В. Шамара

The experimental substantiation of Cerebrolysinum adjuvant therapy use to optimize peripheral nerve posttraumatic regeneration

N.A. Chtchoudlo, T.V. Sizova, I.V. Borisova, M.M. Chtchoudlo, A.V. Shamara

Федеральное государственное учреждение

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

С целью выявления эффектов церебролизина на регенерацию периферического нерва у 36 взрослых беспородных собак пересекали седалищный нерв и сшивали с применением микрохирургической техники. У 13 собак с 3-го дня после операции провели курс параневральных инъекций церебролизина, остальные составили группу сравнения. Тяжесть и длительность неврологических расстройств в опытной группе уменьшены. По данным ЭМГ, отмечается тенденция более интенсивного прироста амплитуды М-ответа икроножной мышцы и более раннего появления М-ответов в передней большеберцовой мышце, меньшая их вариабельность в ходе восстановления. Установлено положительное влияние церебролизина на восстановление и поддержание структурных параметров регенерирующих нервных волокон, врастающих в дистальный отрезок нерва.

Ключевые слова: регенерация нерва, фармакологическая стимуляция.

Sciatic nerves of 36 adult mongrel dogs were transected and sutured by microsurgical technique for the purpose of revealing the effects of Cerebrolysinum on peripheral nerve regeneration in them. In 13 dogs a course of Cerebrolysinum paraneural injections was made beginning from the 3-rd day after surgery, the remaining ones served for comparison. In the experimental group the severity and duration of neurological deficits decreased. According to EMG data, there was a tendency towards more intensive increment of the amplitude of gastrocnemius muscle M-response and towards earlier emergence of M-responses in the anterior tibial muscle, as well as their less variability in the process of recovery. Cerebrolysinum positive effect has been established on the recovery and maintenance of the structural parameters of regenerating nerve fibers, growing into a distal nerve part.

Keywords: nerve regeneration, pharmacological stimulation.

ВВЕДЕНИЕ

Волокна периферической нервной системы высших млекопитающих и человека обладают высокими потенциями к регенерации. Объясняется это чаще всего тем, что в отличие от глии центральной нервной системы, шванновские клетки не ингибируют, а стимулируют и ориентируют аксональный спраутинг.

Однако в клинике функциональные результаты лечения анатомических перерывов нервов признаются хорошими не более чем у половины пациентов даже при оптимальном варианте восстановительной операции – первичном микрохирургическом шве [3, 9, 11]. Известно, что кроме своевременности и качества операции на нерве её результат определяется множеством биологических факторов. К ним относятся выраженность посттравматического и отсроченного апоптоза нейронов и дезориентации их регенерирующих аксонов, низкая скорость аксонно-

го транспорта, проблемы восстановления кровоснабжения нерва и ремиелинизации регенерирующих мягкотных волокон, снижающиеся с возрастом регенераторные потенции и сопутствующие заболевания пациента.

В течение нескольких десятилетий в опытах на животных проверялось предположение о целесообразности применения для оптимизации регенерации нервов экзогенных пептидов – факторов роста и нейротрофинов [10], однако клиническое внедрение данной терапевтической стратегии затруднено по ряду причин. Отсутствуют соответствующие официальные препараты. Факторы роста нервов и нейротрофины не проникают через гемато-энцефалический и гемато-нейральный барьеры и потому невозможно их длительное систематическое применение. Кроме того, они обладают побочными эффектами (например, вызывают гипералгезию).

В фармакопее известен пептидергический препарат церебролизин, который проникает через барьерные структуры и по действию аналогичен естественным факторам нейронального роста. Он более 40 лет используется в лечении цереброва-

скулярной патологии и травматических повреждений головного мозга, однако данных о его влиянии на ПНС в доступной литературе нет.

Цель – выявление эффектов церебролизина на регенерацию периферического нерва.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты выполнены на 36 взрослых беспородных собаках, которым на уровне середины бедра ножницами Milesi пересекали седалищный нерв и сшивали с применением оптического увеличения операционного микроскопа Opton 6-12x, инстументария фирмы Aescular, шовного материала Ethicon калибра 8/0. У 13 собак начиная с 3-го дня после операции провели курс из 20 инъекций церебролизина (по 0,5 мл 3-5 раз в неделю), который вводили параневрально в область седалищной вырезки. Остальные 23 собаки составили контрольную группу.

В ходе эксперимента регистрировали клинические проявления выпадения опорно-двигательной и трофической функций седалищного нерва в индивидуальных семиотических картах животных.

Через 1, 2, 4, 6, 9 и 12 месяцев после операции проводили электрофизиологические исследования. Оценивали качественный состав интенсивность и динамику во времени спонтанной биоэлектрической активности икроножной и передней большеберцовой мышц в покое при биполярном отведении. Методом стимуляционной электромиографии (ЭМГ) по общепринятой методике [1] в модификации, предложенной д.б.н. А.П. Шейным (Удлинение нервного ствола после образования его дефекта в эксперименте: Отчет о НИР (заключит.) / МЗ РСФСР. КНИИЭКОТ; Науч. рук. Г.А. Илизаров. – № ГР. 01830066812 инв. № 02870018716. - Курган, 1986.–74 с.), под внутривенным барбитуровым наркозом получали вызванную биоэлектрическую активность (М-ответы) икроножной и передней большеберцовой мышц в результате раздражения седалищного нерва через игольчатый электрод прямоугольными импульсами длительностью 1 мс с заведомо супрамаксимальной амплитудой и регистрировали с помощью ЭМГ-системы “DISA-1500” фир-

мы DANTEC (Дания) монополярно. Активный электрод вводили в брюшко тестируемой мышцы, а индифферентный – под кожу в области сухожилия.

Содержание, кормление животных, операции и сеансы ЭМГ, а также выведение из опыта осуществляли согласно приказу МЗ СССР № 775, 1977 г. (Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник и вивариев. Утверждено приказом № 1045-73 главным санитарным врачом СССР от 06.04.73).

Седалищные нервы иссекали, подвергали альдегидно-осмиевой фиксации, заливали в эпоксидные смолы. Поперечные полутонкие (толщиной 1 мкм) срезы оперированных нервов дистальнее уровня швов и соответствующих участков интактных нервов получали на ультратомах фирмы LKB (Швеция) и окрашивали по Уикли.

Используя большие исследовательские микроскопы фирмы “Opton” (Германия) и аппаратно-программный комплекс “ДиаМорф” (Москва), оцифровывали от 30 до 80 полей зрения (увеличение 1250) и таким образом от каждой собаки получали изображения от 300 до 500 мягкотных нервных волокон. Методом точечного счёта в изображениях определяли объёмную плотность нейральных элементов. Рассчитывали численную плотность мягкотных волокон. Измеряли их диаметры, толщину аксонов и миелиновой оболочки, определяли соответствующие средние показатели. Для двойного контроля результатов опыта морфометрировали нервы 3 интактных собак. Строили гистограммы распределения мягкотных волокон по диаметру (шаг 1 мкм) по данным от каждого животного и усреднённые гистограммы по каждой группе. Для статистической обработки данных использовали средства Microsoft Excel-2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как в опыте, так и контроле в послеоперационном периоде отмечалось отсутствие либо ослабление опорной функции денервированной конечности, её волочение, опора на тыльную поверхность стопы, находящейся в состоянии подошвенной гиперфлексии. Средний срок восстановления нормального позиционирования стопы в стойке, при ходьбе и беге в контрольной группе составил $4,9 \pm 0,7$ месяца после операции, а в опыте – $3,2 \pm 0,4$ ($p < 0,05$).

В контрольной группе среди нейротрофических расстройств наряду с поверхностными эрозиями кожи в пяточной области, на тыле стопы и пальцах развивались длительно заживающие (до 3,5 месяцев после операции) трофические язвы площадью от 1 до 5 см², которые наблюдались у 10 собак из 23 (43,5 %). В опыте преобладали поверхностные кожные эрозии площадью до 0,5 см², язвы – только у 3 собак из 13 (23,1 %), их площадь ни в одном опыте не пре-

высила 1 см², срок заживления 24-35 дней. На фоне лечения церебролизином ни у одного из 13 животных не наблюдалось аутомутилиционного поведения, а в контроле аутомутилиция отмечена у 2 собак из 23 (8,7 %).

Описание динамики фоновой биоэлектрической активности мышц в покое контрольных животных подробно описаны в ранее опубликованных работах [6; 7]. В основной группе она укладывалась в значительно меньший временной интервал, чем в контроле.

По данным электромиографии в первый месяц после операции у всех животных в обеих мышцах голени регистрировался повышенный уровень ЭМГ покоя. В икроножной мышце животных основной группы в трети (33 %) всех наблюдений он состоял из множественных потенциалов фибрилляции (ПФ), чуть больше половины (56 %) анализируемых случаев были представлены их комбинацией с потенциалами фасцикуляции (ПФК) и только в одном наблюдении (11 %) были только ПФК без ПФ. Для передней большеберцовой мышцы фон, состоящий из ПФ, имеет место в 20 % наблюдений, комбинация ПФ и ПФК отмечена в 60 % случаев и в 20 % наблюдений зарегистрированы только ПФК. По сравнению с контролем в основной группе ПФ встречаются реже в обеих мышцах, а ПФК чаще в передней большеберцовой. Степень интенсивности и насыщенности ЭМГ-покоя в основной группе была меньше, чем в контрольной. ПФ быстрее затухают. Для икроножной мышцы интерференционная активность встречается в единичных случаях, а для передней большеберцовой несколько больше.

Ко второму месяцу после операции у животных основной группы в икроножной мышце в большинстве наблюдений (55 %) фоновая биоэлектрическая активность отсутствовала, ПФ наблюдались только в комбинации с ПФК (18 % – в икроножной, 58 % – в передней большеберцовой мышцах). ПФК без фибрилляторной активности отмечались в 27 % и 25 % случаев, соответственно. случаев полного отсутствия повышенной ЭМГ покоя в передней большеберцовой было значительно меньше (17 %), чем в икроножной. У контрольных животных во всех отведениях имела место выраженная спонтанная активность покоя, состоящая из ПФ, ПФК и их разнообразного сочетания.

К четвёртому месяцу наблюдений в основной группе животных в икроножной мышце имеется только один случай возникновения быстро затухающих ПФ, возникающих в ответ на введение игольчатого электрода. У остальных животных биоэлектрический фон в норме. В передней большеберцовой мышце имеется по одному случаю наблюдения ПФ и ПФК.

В дальнейшем, практически у всех животных основной группы ЭМГ покоя обеих тести-

рованных мышц остаётся в норме, за исключением двух наблюдений единичных ПФК на 6 и 12 месяцев эксперимента, что может быть связано с эффектами наркоза [2] или другими причинами, не имеющими прямого отношения к реиннервации (см. ниже).

Если сравнивать фоновую активность тестируемых мышц, то следует отметить, что в ранние сроки эксперимента у животных основной группы и в контроле ПФ (самостоятельно или в комбинации) встречаются чаще и проявляются интенсивнее в передней большеберцовой мышце, чем в икроножной, что соответствует ранее полученным данным [6; 7]. ПФК у животных основной группы в обеих мышцах выражены одинаково, в то время как в контрольной группе они преобладают в икроножной.

В основной группе животных при биполярном отведении в первый месяц после операции из-за высокого уровня биоэлектрического фона и выраженного артефакта раздражения нельзя было с полной уверенностью констатировать отсутствие или наличие М-ответа икроножной и передней большеберцовой мышц в 66 % и 93 % наблюдений, соответственно. Причём в первой мышце М-ответ скорее отсутствовал в 33 % наблюдений, а во второй – в 62 % случаев. Для обеих мышц голени около трети наблюдений неоднозначной идентификации М-ответа соответствовали ситуации, когда он скорее присутствовал. Наличие хорошо выраженных М-ответов с амплитудой до нескольких сот микровольт наблюдалось, соответственно, в 33 % и 8 % (1 наблюдение) случаев для тестируемых мышц голени на данный срок эксперимента.

Через два месяца после операции в икроножной мышце оставалось только одно наблюдение, в котором М-ответ был под вопросом, причём скорее «да», чем «нет». Для передней большеберцовой мышцы наблюдений с неопределённостью наличия М-ответа 4, в двух из них его «скорее нет» и только в одном, он «скорее есть». В большинстве же случаев в обеих мышцах регистрируются хорошо выраженные М-ответы с амплитудой несколько сот микровольт и выше.

Часто в период 1-2 месяца после операции М-ответ обеих тестируемых мышц при биполярном отведении в основной и контрольной группах животных приобретал характерный полифазный или даже мультифазный вид, при этом его форма, амплитуда и длительность постоянно флуктуировали.

Если сравнивать М-ответы тестируемых мышц при локальном отведении в ранние сроки эксперимента, то следует отметить, что случаи полного отсутствия вызванной активности или затруднений при её идентификации встречаются чаще в передней большеберцовой мышце, чем в икроножной мышце, что соответствует ранее полученным данным [6, 7].

В дальнейшем при биполярном отведении амплитуда М-ответа быстро увеличивается, достигая нескольких тысяч мкВ и более. Высокая её вариативность не позволяет в дальнейшем (на поздних сроках эксперимента) использовать данный параметр в качестве критерия сравнения результатов основной и контрольной групп.

При монополярном отведении М-ответы появляются через месяц после операции во всех мышцах и у всех животных. Их амплитуда колеблется от 200-300 мкВ до 1-3 мВ. В икроножной мышце этот параметр, как правило, выше, чем в передней большеберцовой, а в основной группе ниже, чем в контрольной (рис. 1). Таким образом, мы наблюдаем ЭМГ-признаки более интенсивного начала процесса восстановления функции двигательных единиц икроножной мышцы, по сравнению с передней большеберцовой мышцей в обеих группах животных.

Относительно сравнения интенсивности реиннервационных процессов в основной и контрольной группах животных на ранних сроках после шва нерва по имеющимся данным сделать нельзя. С одной стороны, наблюдается более быстрая нормализация ЭМГ покоя у животных, получавших церебролизин. С другой стороны, М-ответы при би- и монополярном отведении у них несколько меньше, чем в контроле. Компромиссное объяснение этого феномена может быть связано с тем, что амплитуда М-ответа определяется не только количеством синхронно активированных ДЕ, но и характером суммации их ПД [1]. Это обстоятельство в сочетании с фактом более быстрой нормализации ЭМГ покоя в мышцах животных основной группы позволяет предположить, что более низкая амплитуда ранних М-ответов связана не с отставанием реиннервации от контроля, а с особенностями её характера.

Для сравнения динамики дальнейшего восстановления активационной способности мышц голени животных основной и контрольной групп использовали метод аппроксимации соответствующих рядов значений амплитуд М-ответов, ранжированных по увеличению времени эксперимента, поскольку в ранее проведённых нами исследованиях [5] было показано, что эффективная реиннервация сопровождается увеличением амплитуды М-ответа хорошо описываемым уравнением степенной функции $A = at^b$; где A – амплитуда М-ответа, t – срок эксперимента, a и b – параметрические коэффициенты.

Аппроксимация показывает (рис. 1), что для М-ответов икроножной мышцы (рис. 1, а) основной группы отмечается тенденция более интенсивного прироста амплитуды по сравнению с контролем. Для передней большеберцовой мышцы (рис. 1, б) тренды восстановления М-ответов в основной и контрольной группах практически совпадают, однако при этом в основной группе можно отметить повышение вероятности более

раннего появления М-ответов и меньшую их вариативность в ходе восстановления.

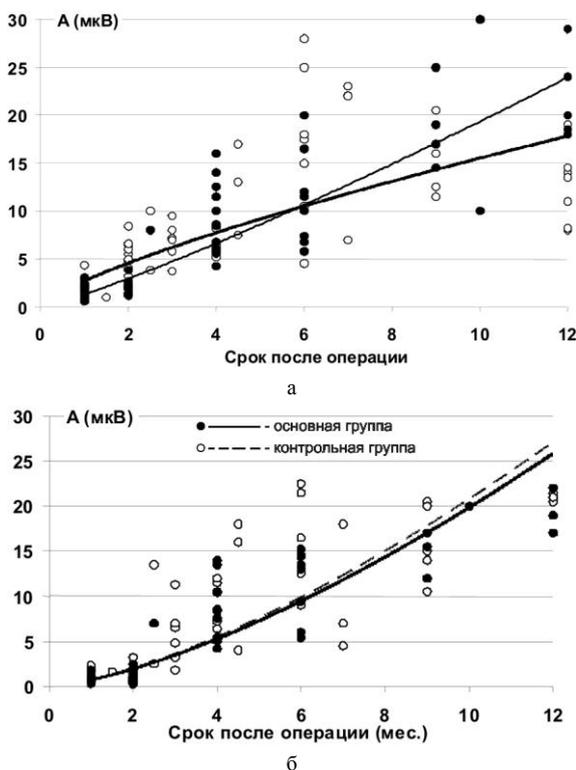


Рис. 1. Динамика амплитуды М-ответа икроножной (а) и передней большеберцовой (б) мышц у животных основной и контрольной групп. Аппроксимация функцией $A_t = at^b$; (где A – амплитуда М-ответа, t – срок эксперимента, a и b – параметрические коэффициенты)

По данным гистоморфометрического исследования дистального отрезка регенерирующего нерва, через 4 месяца после операции объёмная плотность нейральных элементов в опыте на 13 % выше, чем контроле ($p < 0,05$), различия численной плотности миелинизирующихся и безмиелиновых волокон не достоверны.

При имеющемся количестве наблюдений статистически незначима тенденция к уменьшению частоты фигур вторичной дегенерации крупных миелинизирующихся волокон на фоне терапии церебролизином: в контроле – от 1 до 5,4 %, в опыте – от 0 до 2,3 % от общей численности выборки. Ширина гистограммы распределения миелинизированных волокон по диаметру в опыте на 4 класса больше, чем в контроле.

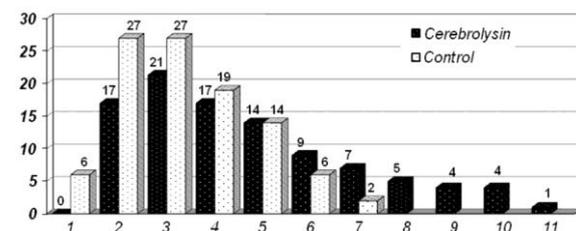


Рис. 2. Частотные гистограммы распределения по диаметру регенерирующих миелинизированных нервных волокон в опыте и контроле. Абсциссы – размерный класс, ординаты – процентная доля

Средний диаметр регенерирующих миелинизирующихся волокон в опыте на 33 % превышает показатель контроля, средний диаметр их аксонов - на 45 %, толщина мягкой оболочки - на 20 % ($p < 0,001$).

Через 12 месяцев после операции гистограммы распределения миелинизированных регенерирующих волокон по диаметру, а также их средние численные и размерные параметры в опыте и контроле не различаются.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённые исследования показали, что официальный препарат церебролизин при его параневральном введении на проксимальном по отношению к зоне повреждения нерва уровне позволяет уменьшить тяжесть и длительность неврологической симптоматики при травматических повреждениях периферических нервов, в том числе профилактировать и превентивно лечить нейротрофические язвы. Электрофизиологическое исследование позволяет подтвердить предположение о повышении эффективности реиннервации в опытной группе: по данным

ЭМГ отмечается тенденция более интенсивного прироста амплитуды М-ответа икроножной мышцы и повышение вероятности более раннего появления М-ответов в передней большеберцовой мышце и меньшей их вариативность в ходе восстановления. Установлено положительное влияние церебролизина на восстановление и поддержание структурных параметров регенерирующих нервных волокон, растущих в дистальный отрезок нерва. Это влияние продолжается по крайней мере в течение 2,5 месяцев после отмены препарата.

ВЫВОД

При данном способе и режиме введения церебролизин является промотором регенерации

периферического нерва.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байкушев, С. И. Стимуляционная электромиография и электронейрография в клинике нервных болезней / С. И. Байкушев, Э. Х. Манович, В. П. Новикова. - М., 1974. - 143 с.
2. Белоярцев, Ф. Ф. Электромиография в анестезиологии / Ф. Ф. Белоярцев. - М. : Медицина, 1980. - 232 с.
3. Губочкин, Н. Г. Избранные вопросы хирургии кисти / Н. Г. Губочкин, В. М. Шаповалов. - СПб., 2000. - 107 с.
4. Персон, Р. С. Электромиография в исследованиях человека / Р. С. Персон. - М. : Наука, 1969. - 199 с.
5. Морфофункциональная характеристика мышц голени собак при регенерации пересечённого седалищного нерва в условиях distractionного остеосинтеза бедренной кости / М. С. Сайфутдинов [и др.] // Гений ортопедии. - 2001. - № 3. - С. 64-71.
6. Ультраструктурные и клинко-физиологические характеристики нервно-мышечного аппарата голени при дефектах седалищного нерва / М. М. Щудло [и др.] // Гений ортопедии. - 1995. - № 2. - С. 38-42.
7. Электрофизиологическая и нейрогистологическая характеристика реиннервации мышц при сшивании удлиненных отрезков поврежденного нерва и при имплантации удлиненной проксимальной культы нерва в мышцу / Н. А. Щудло [и др.] // Гений ортопедии. - 1995. - № 1. - С. 21-25.
8. Экспериментально-морфологическое обоснование возможности удлинения сшитого нервного ствола / М. М. Щудло [и др.] // Травматол. и ортопед. России. - 1995. - № 5. - С. 56-60.
9. Birch, R. Repair of ulnar and median nerves : primary suture is best / R. Birch, A. R. M. Raji // J. Bone Joint Surg. - 1991. - Vol. 73-B. - P. 154-157.
10. Frostick, S. P. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration / S. P. Frostick, Qi Yin, G. J. Kemp // Microsurgery. - 1998. - Vol. 18, No 7. - P. 397-405.
11. Moneim, M. S. Long term results following nerve repair and grafting / M. S. Moneim, G. E. J. R. Omer, G. Rayan // Acta Orthop. Traumatol. Hellenica. - 1999. - Vol. 50. - P. 94-103.

Рукопись поступила 10.01.2008.