

Научная статья

УДК 616.833.58-004.8-089.844-092.9:615.847

<https://doi.org/10.18019/1028-4427-2024-30-3-417-426>

Оценка отдаленных результатов однократной интраоперационной электронейростимуляции после аутологичной пластики резекционного дефекта большеберцовой порции седалищного нерва взрослых крыс

Н.А. Щудло, Т.Н. Варсегова[✉], Т.А. Ступина

Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова, Курган, Россия

Автор, ответственный за переписку: Татьяна Николаевна Варсегова, varstn@mail.ru

Аннотация

Введение. Данные мировой литературы свидетельствуют об эффективности однократной интраоперационной электростимуляции (ИЭС) проксимального отрезка повреждённого нерва для стимуляции его регенерации, но данные о её влиянии на отдалённые результаты аутопластики резекционных дефектов отсутствуют.

Цель работы — оценка отдалённых результатов однократной ИЭС после аутологичной пластики дефекта большеберцовой порции седалищного нерва крыс.

Материалы и методы. После аутологичной пластики резекционного дефекта большеберцовой порции седалищного нерва 30 крыс линии Wistar мужского пола распределены на серию 1 (нестимулированный контроль, $n = 16$) и серию 2 (однократная ИЭС в течение 40 мин., $n = 14$). Через 4 и 6 мес. после операции проведена оценка статического седалищного функционального индекса (СФИ) и морфометрия эпиксидных поперечных полутоновых срезов большеберцового нерва на уровне средней трети голени. Для сравнения с нормой использовали соответствующие данные от 7 интактных крыс.

Результаты. Количество животных с отличными результатами восстановления СФИ составило 12,5 % в серии 1 и 50 % в серии 2 ($p = 0,05$). Численная плотность регенерировавших миелинизированных волокон (МВ) превышала норму: в серии 1 — на 63 % ($p < 0,01$) и 34 % ($p < 0,01$), в серии 2 — на 58 % ($p < 0,01$) и 47 % ($p < 0,01$) соответственно. В серии 2 больше по сравнению с серией 1: медиана диаметров МВ — на 11,7 % и 15,7 %, медиана диаметров их аксонов — на 5,4 % и 11,9 %, медиана толщины миелиновой оболочки — на 17,0 % и 24,1 % соответственно ($p < 0,05$ через 4 мес. и $p < 0,01$ через 6 мес. после операции). Через 4 мес. после операции в сериях 1 и 2 численные плотности эндоневральных сосудов превышают интактный контроль на 134 % ($p < 0,05$) и 156 % ($p < 0,05$), их средние диаметры на 18 % и 16 % ($p < 0,01$) соответственно, а диаметры просветов возрастают только в серии 2 на 8 % ($p = 0,07$). Через 6 мес. опыта в сериях 1 и 2 численные плотности микрососудов снижаются, но достоверно превышают контроль на 66 % ($p < 0,05$) и 83 % ($p < 0,05$), средние диаметры — на 14 % и 36 % ($p < 0,05$), диаметры просветов — на 26 % ($p < 0,05$) и 50 % ($p < 0,01$) соответственно.

Обсуждение. Разница между стимулированными и нестимулированными животными по всем размерным параметрам МВ через 6 мес. после операции была больше, чем через 4 мес., что указывает на стойкий нейрорегенераторный эффект.

Заключение. Значимое увеличение диаметров регенерирующих нервных волокон в большеберцовом нерве, а также диаметров их аксонов и толщины миелинизированных оболочек через 4 и 6 мес. после аутопластики большеберцовой порции седалищного нерва в группе животных с однократной 40-минутной ИЭС проксимального участка седалищного нерва свидетельствует о промотирующем влиянии применённого аддитивного воздействия на регенераторный аксоно- и миелиногенез. Увеличение просветов и улучшение пропускной способности эндоневральных сосудов большеберцового нерва в серии с ИЭС обеспечило стойкость нейрорегенераторного эффекта. Функциональная значимость эффектов однократной ИЭС подтверждается достоверно более высоким процентом животных с отличными результатами восстановления статического функционального индекса.

Ключевые слова: крысы, седалищный нерв, аутопластика, интраоперационная электростимуляция (ИЭС), седалищный функциональный индекс, гистоморфометрия

Для цитирования: Щудло Н.А., Варсегова Т.Н., Ступина Т.А. Оценка отдаленных результатов однократной интраоперационной электронейростимуляции после аутологичной пластики резекционного дефекта большеберцовой порции седалищного нерва взрослых крыс. *Гений ортопедии*. 2024;30(3):417-426. doi: 10.18019/1028-4427-2024-30-3-417-426. EDN: MQFCCN.



Evaluation of long-term results of single intraoperative electrical neurostimulation after autologous plastic surgery of a resection defect of the tibial portion of the sciatic nerve in adult rats

N.A. Shchudlo, T.N. Varsegova✉, T.A. Stupina

Ilizarov National Medical Research Centre for Traumatology and Orthopedics, Kurgan, Russian Federation

Corresponding author: Tatyana N. Varsegova, varstn@mail.ru

Abstract

Introduction World literature data indicate the effectiveness of single intraoperative electrical stimulation (IES) of the proximal segment of the damaged nerve to stimulate its regeneration, but there is no data on its effect on the long-term results of autoplasty of resection defects.

The purpose of the work was to evaluate the long-term results of a single IES after autologous plastic surgery of the tibial portion of the sciatic nerve in rats.

Materials and methods Thirty rats after autologous repair of the resection defect of the tibial portion of the sciatic nerve were divided into series 1 (unstimulated control, $n = 16$) and series 2 (single IES for 40 minutes, $n = 14$). At 4 and 6 months after surgery, the static sciatic functional index (SFI) and morphometry of epoxy transverse semithin sections of the tibial nerve at the level of the middle third of the leg were assessed. For comparison with the normal values, the corresponding data from 7 intact rats were used.

Results The number of animals with excellent results of SFI restoration was 12.5 % in series 1 and 50 % in series 2 ($p = 0.05$). The numerical density of regenerated myelinated fibers (MF) exceeded the norm: in series 1 — by 63 % ($p < 0.01$) and 34 % ($p < 0.01$), in series 2 — by 58 % ($p < 0.01$) and 47 % ($p < 0.01$), respectively. In series 2, there were greater values in comparison with series 1: the median diameters of MFs were by 11.7 % and 15.7 %, the median diameters of their axons were by 5.4 % and 11.9 %, the median thickness of the myelin sheath was by 17.0 % and 24.1 %, respectively ($p < 0.05$ 4 months and $p < 0.01$ 6 months after surgery). Four months after surgery in series 1 and 2, the numerical densities of endoneurial vessels exceeded the intact control by 134 % ($p < 0.05$) and 156 % ($p < 0.05$), their average diameters by 18 % and 16 % ($p < 0.01$) respectively, and lumen diameters increased only in series 2 by 8 % ($p = 0.07$). After 6 months of the experiment in series 1 and 2, the numerical densities of microvessels decreased, but significantly exceeded the control by 66 % ($p < 0.05$) and 83 % ($p < 0.05$), the average diameters — by 14 % and 36 % ($p < 0.05$), lumen diameters — by 26 % ($p < 0.05$) and 50 % ($p < 0.01$), respectively.

Discussion The difference between stimulated and unstimulated animals in all MF size parameters 6 months after surgery was greater than after 4 months, indicating a persistent neuroregenerative effect.

Conclusions A significant increase in the diameters of regenerating nerve fibers in the tibial nerve, as well as the diameters of their axons and the thickness of the myelinated sheaths 4 and 6 months after autoplasty of the tibial portion of the sciatic nerve in the group of animals with a single 40-minute IES of the proximal portion of the sciatic nerve indicates the promoting effect of the applied additive effect on regenerative axono- and myelinogenesis. Increase in the lumens and improvement of blood flow of the endoneurial vessels of the tibial nerve in the series with IES ensured the stability of the neuroregenerative effect. The functional significance of the effects of a single IES is confirmed by a significantly higher percentage of animals with excellent results in restoring the static functional index.

Keywords: rats, sciatic nerve, autoplasmic, intraoperative electrical neurostimulation, sciatic functional index, hystomorphometry

For citation: Shchudlo N.A. Varsegova T.N. Stupina T.A. Evaluation of long-term results of single intraoperative electrical neurostimulation after autologous plastic surgery of a resection defect of the tibial portion of the sciatic nerve in adult rats. *Genij Ortopedii*. 2024;30(3):417-426. doi: 10.18019/1028-4427-2024-30-3-417-426

ВВЕДЕНИЕ

Повреждения периферических нервов встречаются в 3,3 % случаев травм верхних конечностей [1] и 1,8 % травм нижних конечностей [2]. Они существенно варьируют по механизмам травмы, степени повреждения и исходам лечения. При вооружённых конфликтах частота повреждения нервов конечностей существенно увеличивается, нередко они приводят к инвалидизации пациентов с тяжёлыми социальными и личностными последствиями [3].

Несмотря на потенциальную возможность восстановления функций повреждённых периферических нервов млекопитающих и человека [4], их регенерация после полных анатомических перерывов, требующих хирургического вмешательства, происходит медленно и обычно неполно: хороших и отличных результатов восстановления чувствительности и движений достигают не более половины пациентов [5]. Неудовлетворительные результаты лечения травм нервов в клинике имеют фундаментальные биологические основы. К ним относятся посттравматический апоптоз чувствительных нейронов [6], латентный период регенерации, в течение которого аксоны проксимального отрезка нерва не прорастают зону повреждения [7], низкая скорость регенераторного роста, особенно у взрослых особей [8], образование рубца [9, 10], деструкция денервированных органов-мишеней [11], в том числе их капилляров [12].

Разнообразные методики электростимуляции периферических нервов позволяют ускорить и улучшить восстановление двигательных и чувствительных функций [13, 14, 15]. Поскольку многие пациенты не имеют возможности получить курсовое реабилитационное лечение, интересы многих исследователей в последние годы сосредоточились на изучении эффектов однократной интраоперационной электростимуляции (ИЭС).

При рандомизированном обследовании 36 пациентов, которым выполнены восстановительные операции на пальцевых нервах, установлено, что один часовой сеанс низкочастотной ИЭС (20 Гц, 1 час) улучшил все виды чувствительности к 5–6 мес. после операции по сравнению с нестимулированной группой, однако разница не подтверждалась статистически [16].

В экспериментах на животных продемонстрированы положительные эффекты однократной ИЭС на разных моделях повреждений нервов бедра и голени. При фокальной демиелинизации большеберцового нерва крыс ИЭС ускоряла уборку продуктов демиелинизации и последующую ремиелинизацию [17]. При моделировании *neuroma in continuu* седалищного нерва крыс однократная ИЭС проксимального участка поврежденного нерва крыс улучшала восстановление функции конечности через 4–8 нед., однако через 3 мес. различия с нестимулированной группой нивелировались [18]. В опытах по перерезке и шва большеберцового нерва крыс установлено, что даже 10-минутная ИЭС ускоряет прорастание зоны швов регенерирующими аксонами [19]. Аналогичные результаты получены другими авторами при пересечении и шве седалищного нерва мышей [20], которые также доказали увеличение количества нейронов, вступающих в регенерацию, в сериях с электростимуляцией. При пересечении и микрохирургическом шве бедренного нерва 10-недельных крыс часовая ИЭС вызывала более быстрое восстановление функциональных параметров в сравнении с ложно-стимулированными животными, достигавшее дооперационного уровня через 5 мес. после травмы, что, по мнению авторов, связано с увеличением количества мотонейронов, корректно реиннервировавших органы-мишени [21].

После аутопластики общего малоберцового нерва молодых крыс однократная ИЭС проксимального отрезка нерва обеспечила увеличение количества чувствительных и двигательных нейронов, вступающих в регенерацию, а также увеличение количества миелинизированных нервных волокон, регенерировавших в дистальный отрезок повреждённого нерва через 6 нед. после операции [22].

После аутопластики седалищного нерва ИЭС улучшала моторную функцию оперированной конечности крыс в период от 2 до 12 нед. по сравнению с нестимулированными животными, однако сенсорное тестирование и гистоморфометрия дистального отрезка нерва и икроножных мышц преимуществ серии с ИЭС не выявили [23].

В доступной литературе мы не встретили данных о влиянии однократной интраоперационной электростимуляции на отдалённые результаты аутопластики смешанных нервов, что определило цель нашего исследования.

Цель работы — оценка отдалённых результатов однократной интраоперационной электронейростимуляции после аутологичной пластики резекционного дефекта большеберцовой порции седалищного нерва.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 30 лабораторных крысах линии Wistar мужского пола (возраст — 8–15 мес., вес — 360–460 г). Животных содержали в контролируемых гигиенических условиях, они имели доступ к воде и корму. Эксперимент выполнен согласно Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях и СП 2.2.1.3218-14; ГОСТу 33217-2014; ГОСТу 33215-2014. Дизайн исследо-

вания одобрен этическим комитетом учреждения (протокол № 2 (57) от 17.05.18). Для наркоза и обезболивания животным вводили внутримышечно 0,8 мг гидрохлорида ксилазина и 0,4 мг тилетамин/золазепам на 100 г массы тела, на правом бедре и голени выстригали шёрстный покров.

В условиях операционной после обработки кожи йодно-спиртовой настойкой и внепроекционного разреза кожи осуществляли доступ к правому седалищному нерву на уровне средней трети бедра остро-тупым способом через двуглавую мышцу. Используя 8-кратное увеличение операционного микроскопа (ОРМИ-6, Germany) острым сосудистым микрозондом и ножницами для иридэктомии выполняли эпифасцикулярные продольные эпиневротомические разрезы для выделения большеберцовой порции седалищного нерва. После резекции её участка протяжённостью 6 мм осуществляли интерфасцикулярную аутологичную пластику получившегося дефекта с использованием микрохирургического шовного материала калибра 9–0 и 10–0. В серии 1 — нестимулированный контроль ($n = 16$) — по окончании аутонейропластики рану послойно ушивали рассасывающимся шовным материалом калибра 3–0. В серии 2 — опыт ($n = 14$) — сразу после аутонейропластики на проксимальный участок нерва устанавливали электроды. Используя систему электростимуляции периферических нервов «ЭлСИ.08.исе» (рег. удостоверение № РЗН 2017/5382; ООО «Высокие медицинские технологии»), в течение 40 мин. интраоперационно проводили стимуляцию проксимального отрезка нерва монополярными электрическими импульсами прямоугольной формы с амплитудой 0,25 мА, частотой 20 Гц и длительностью 100 мкс. Рану ушивали по окончании сеанса электростимуляции.

Чтобы обеспечить сопоставимость опытных групп по возрасту, в каждый операционный день оперировали пару крыс: одну без стимуляции, другую со стимуляцией, в одной паре восьмимесячных крыс были обе без стимуляции.

В послеоперационном периоде проводили исследования статического седалищного функционального индекса (СФИ) по методике [24], модифицированной с учётом семиотики денервационно-реиннервационного синдрома (табл. 1). Для этого каждую крысу помещали в коробку из прозрачного пластика с отверстиями для доступа воздуха. Коробку закрепляли на штативе и располагали её над столом, на который укладывали зеркало. С помощью лампы дневного света коробку освещали и фотографировали отражение стоп крысы в зеркале — от 3 до 5 кадров от каждой крысы. Цифровые фото сохраняли в памяти компьютера, а затем в программе Photofiltre измеряли размахи пальцев стоп (рис. 1): тотальный (между I и V пальцами) и интермедиарный (между вторым и четвёртым пальцем). В качестве СФИ использовали отношение размаха пальцев оперированной стопы к соответствующему размаху контралатеральной стопы в долях единицы. Измерения размаха пальцев у животных не проводилось, если опора стопы оперированной конечности происходила не на подушечки лап, а на тыл и/или боковую поверхность стопы при развитии контрактур и деформаций. Оценочная шкала СФИ также представлена в таблице 1.

Таблица 1

Семиотика денервационно-реиннервационного синдрома и оценка статического седалищного функционального индекса в отдалённый период после аутопластики большеберцовой порции седалищного нерва

Симптомы	Оценка
Опора на тыл и/или боковую поверхность стопы с формированием контрактур и деформаций плюсны и пальцев. Опора на подушечки лап без размаха пальцев либо с частичным восстановлением размахов и переразгибанием в плюснефаланговых суставах и сгибании в межфаланговых	неудовлетворительно
Правильная установка стопы с наличием интермедиарного размаха и приведением либо I, либо V пальца	удовлетворительно
Пальцы разведены симметрично. Интермедиарный либо тотальный размах 0,8 и более либо в некоторых кадрах оба размаха 0,8 и более	хорошо
Индексы интермедиарного и тотального размахов 0,8 и более	отлично

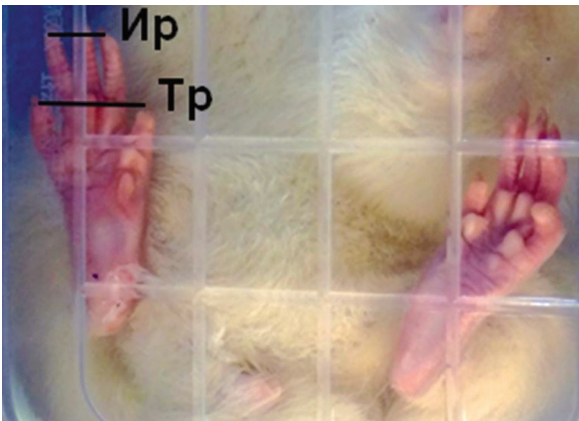


Рис. 1. Фото отражения стоп крысы при её посадке в пластиковую коробку. Нормальная установка стопы контралатеральной конечности с выраженным Ир — интермедиарным размахом пальцев и Тр — тотальным размахом пальцев; отсутствие размаха пальцев со сгибанием межфаланговых суставов стопы оперированной конечности и денервационной атрофией мелких мышц стопы

Животных выводили из эксперимента. Иссечённые образцы седалищных и большеберцовых нервов подвергали альдегидно-осмиевой фиксации и заключали в аралдит для получения полутонких срезов. Срезы изготавливали алмазными ножами на ультрамикротоме Nova LKB (Швеция), окрашивали толудиновым синим и полихромным методом — метиленовым синим, азуром II и основным фуксином. Микроскопию срезов и получение цифровых изображений осуществляли с помощью микроскопа AxioScore.A1 и цифровой камеры AxioCam (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Гистоморфометрировали 15–30 эндоневральных микрососудов и 400–500 миелинизированных нервных волокон у каждого животного при увеличении 1000×. Определяли их численные плотности в 1 мм² площади пучка, измеряли диаметры волокон, их аксонов и толщину миелинизированных оболочек, строили гистограммы распределения волокон по диаметрам с шагом 1 мкм. Рассчитывали долю (в %) деструктивно изменённых нервных проводников. Измеряли диаметры микрососудов, их просветов, определяли модифицированный индекс Керногана, как отношение диаметра просвета к диаметру сосуда. Для сравнения с нормой использовали гистоморфометрические данные от 7 взрослых интактных крыс, близких по возрасту к оперированным крысам на момент эвтаназии, — 16–19 мес. (в данной группе отсутствуют межиндивидуальные статистически значимые различия исследуемых количественных показателей).

Статистическую обработку данных выполняли в компьютерной программе Attestat, версия 9.3.1 (разработчик И.П. Гайдышев, сертификат о регистрации в Роспатенте № 2002611109). Проверку выборок на нормальность распределения значений осуществляли с помощью критериев Колмогорова и Шапиро – Уилка, попарное сравнение экспериментальных серий между собой и с интактным контролем — с помощью критериев Манна – Уитни, Хи-квадрат, точного критерия Фишера. Значения гистоморфометрических параметров представляли в виде медиан и квартилей — Me [Q1; Q3]. Уровень значимости отличий — 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке СФИ в отдалённые сроки после операции получена достоверная разница серий 1 и 2 по частоте отличных результатов (табл. 2).

Таблица 2

Распределение оценок статического седалищного функционального индекса в отдалённом периоде после аутопластики большеберцовой порции седалищного нерва

Результат	Серия 1 — аутопластика (n = 16)		Серия 2 — аутопластика + ИЭС (n = 14)		p ¹⁻²
	абс.	%	абс.	%	
Неудовлетворительный	9	56,25	4	28,57	0,16
Удовлетворительный	1	6,25	0	0	0,55
Хороший	4	25,00	3	21,43	1,00
Отличный	2	12,50	7	50,00	0,05

p¹⁻² — уровни значимости отличий при сравнении групп нестимулированных и стимулированных оперированных животных по точному критерию Фишера; * — различия достоверны при p ≤ 0,05.

Существенно то, что возраст 7 крыс, достигших в серии 2 отличных результатов, варьировал от 8 до 13 мес. на момент операции.

Микроскопическое исследование дистальной зоны швов показало, что в сериях 1 и 2 через 4 и 6 мес. после операции эндоневрий и эпиневррий трансплантата обильно невротизирован регенерирующими миелинизированными и безмиелиновыми волокнами. Некоторые из них располагались в составе минифасцикул или регенерационных кластеров (рис. 2).

В поперечных полутонких срезах большеберцового нерва на уровне средней трети голени (рис. 3) также выявлялась обширная популяция регенерировавших миелинизированных и безмиелинизированных волокон и немногочисленных регенерационных кластеров. В эндоневрии регенерирующих нервов чаще, чем в интактных нервах, встречались фибробласты, макрофаги, периневральные и тучные клетки, а также ядросодержащие профили миелинизированных и безмиелиновых волокон (рис. 3).

Через 6 мес. после операции по сравнению с предыдущим сроком увеличивалось представительство крупных миелинизированных волокон как на уровне трансплантата, так и в большеберцовых нервах на уровне средней трети голени (рис. 2, в, г; рис. 3, в, г), что визуально более заметно у стимулированных животных.

Гистоморфометрическое исследование большеберцового нерва показало, что численная плотность регенерировавших волокон через 4 и 6 мес. после операции достоверно превышает норму: в серии 1 на 63 % и 34 %, в серии 2 — на 58 % и 47 % соответственно (табл. 3). Доля деструктивно изменённых проводников через 4 и 6 мес. после операции у оперированных животных достоверно ниже значений интактных нервов (табл. 3).

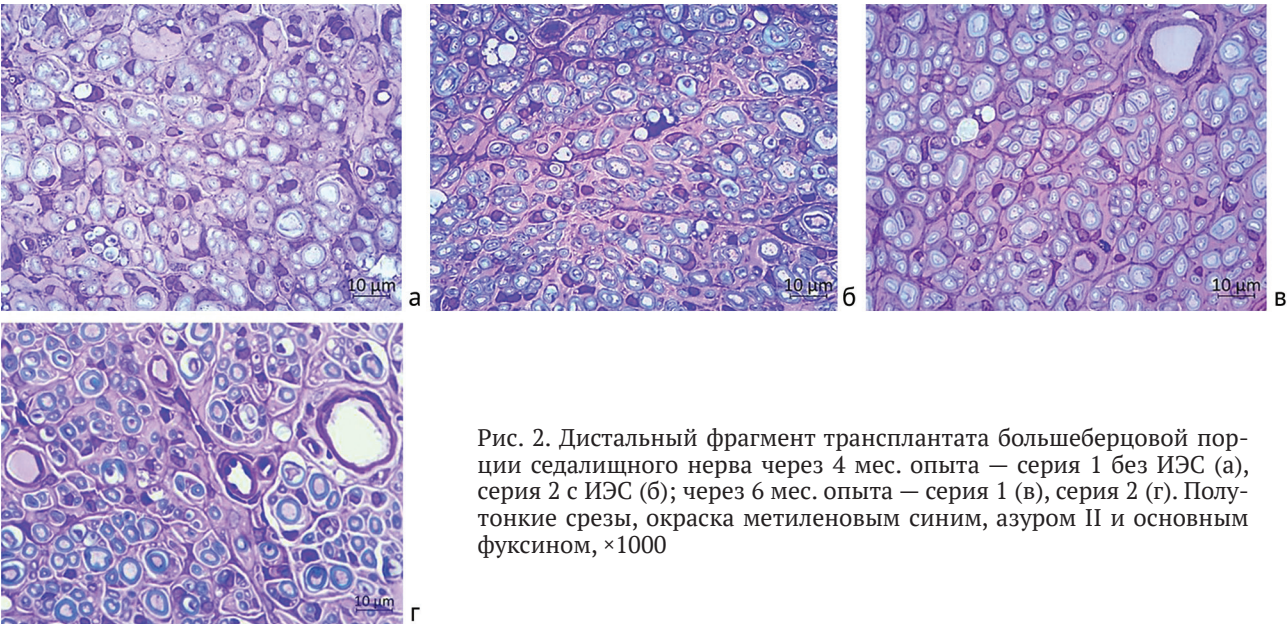


Рис. 2. Дистальный фрагмент трансплантата большеберцовой порции седалищного нерва через 4 мес. опыта — серия 1 без ИЭС (а), серия 2 с ИЭС (б); через 6 мес. опыта — серия 1 (в), серия 2 (г). Полутонкие срезы, окраска метиленовым синим, азуром II и основным фуксином, $\times 1000$

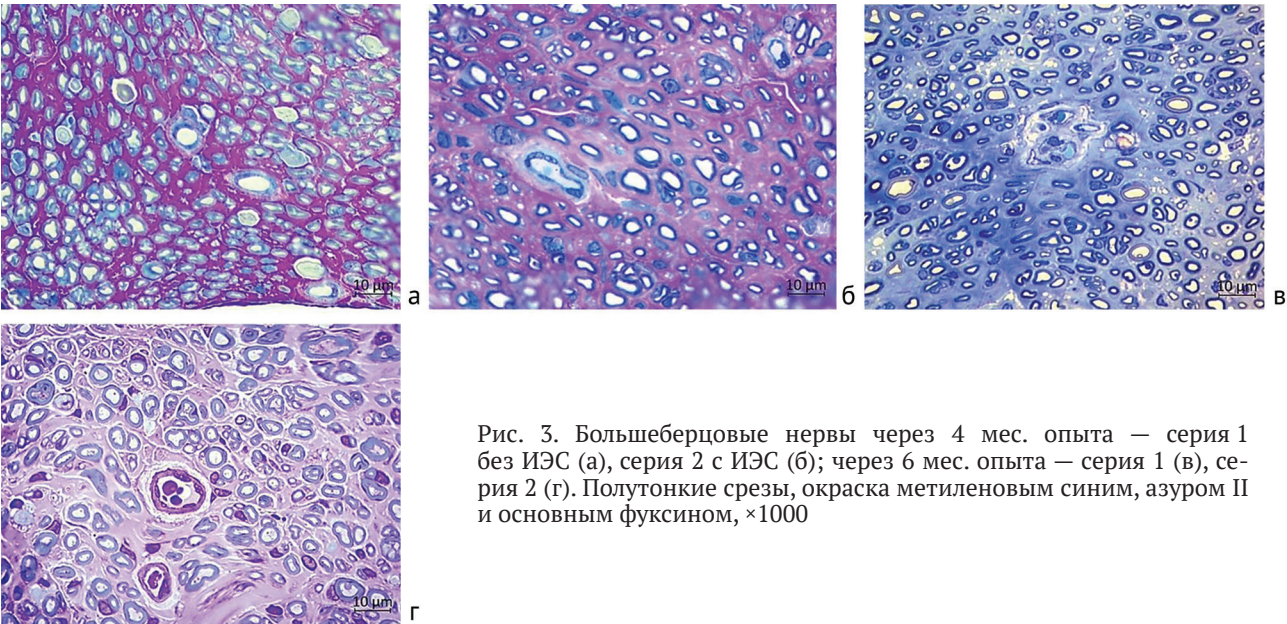


Рис. 3. Большеберцовые нервы через 4 мес. опыта — серия 1 без ИЭС (а), серия 2 с ИЭС (б); через 6 мес. опыта — серия 1 (в), серия 2 (г). Полутонкие срезы, окраска метиленовым синим, азуром II и основным фуксином, $\times 1000$

Таблица 3

Численные плотности и доли (%) деструктивно измененных миелинизированных нервных волокон большеберцового нерва в 1 мм² площади среза через 4 и 6 мес. после операции, Ме [Q1; Q3]

Серии/срок опыта	Численная плотность миелинизированных волокон		Доля деструктивно измененных миелинизированных волокон	
	4 мес.	6 мес.	4 мес.	6 мес.
Серия 1 — аутопластика (n = 16)	24444 [19182; 28280] $P^{1-2} = 0,319465$ $P^{1-K} = 0,0000002^*$	20207 [18140; 22618] $P^{1-2} = 0,187249$ $P^{1-K} = 0,000573^*$	4,46 % [2,79; 5,73] $P^{1-2} = 0,072117$ $P^{1-K} = 0,001244^*$	4,05 % [2,38; 5,06] $P^{1-2} = 0,99999$ $P^{1-K} = 0,00046^*$
Серия 2 — аутопластика + ИЭС (n = 14)	23786 [22142; 24882] $P^{2-K} = 0,0000001^*$	22142 [20498; 23411] $P^{2-K} = 0,000289^*$	5,58 % [3,85; 6,05] $P^{2-K} = 0,030766^*$	4,05 % [2,38; 5,06] $P^{2-K} = 0,00014^*$
Интактный контроль (n = 7)	15040 (12859; 15499)		6,75 % (5,70; 8,13)	

P^{1-2} — уровни значимости отличий при сравнении групп нестимулированных и стимулированных оперированных животных по критерию Манна – Уитни; P^{1-K} , P^{2-K} — уровни значимости отличий каждой из групп оперированных животных от интактного контроля по критерию Манна – Уитни; * — различия достоверны при $p < 0,05$

Размерные характеристики миелинизированных регенерирующих волокон были достоверно больше в серии 2 по сравнению с серией 1 (табл. 4) через 4 и 6 мес. после операции: медиана диаметров волокон — на 11,7 % и 15,7 %, медиана диаметров их аксонов — на 5,4 % и 11,9 %, медиана толщины миелино-

вой оболочки — на 17,0 % и 24,1 % соответственно. Однако даже в конце опыта все размерные характеристики волокон в обеих группах оперированных животных были существенно меньше интактного нерва.

Таблица 4

Размерные параметры миелинизированных волокон большеберцового нерва через 4 и 6 мес. после операции, Ме [Q1; Q3]

Параметры	Серия 1 — аутопластика (n = 16)		Серия 2 — аутопластика+ИЭС (n = 14)		Интактный контроль (n = 7)
	4 мес. (n = 7)	6 мес. (n = 7)	4 мес. (n = 8)	6 мес. (n = 8)	
Диаметр волокон (мкм)	3,24 [2,52; 4,03] $P^{1-K} = 0,00119^*$ $P^{1-2} = 0,00267^*$	3,50 [2,79; 4,04] $P^{1-K} = 0,00119^*$ $P^{1-2} = 0,00982^*$	3,62 [2,91; 4,37] $P^{2-K} = 0,00014^*$	4,05 [3,14; 5,12] $P^{2-K} = 0,00268^*$	6,73 [5,50; 8,75]
Диаметр аксонов (мкм)	2,23 [1,65; 2,87] $P^{1-K} = 0,00119^*$ $P^{1-2} = 0,02914^*$	2,42 [1,84; 2,84] $P^{1-K} = 0,00119^*$ $P^{1-2} = 0,00450^*$	2,35 [1,82; 2,94] $P^{2-K} = 0,00174^*$	2,71 [2,02; 3,53] $P^{2-K} = 0,0027^*$	4,34 [3,54; 5,18]
Толщина миелинизированных оболочек (мкм)	0,53 [0,40; 0,63] $P^{1-K} = 0,00119^*$ $P^{1-2} = 0,02831^*$	0,54 [0,44; 0,62] $P^{1-K} = 0,00119^*$ $P^{1-2} = 0,0027^*$	0,62 [0,50; 0,75] $P^{2-K} = 0,00038^*$	0,67 [0,53; 0,83] $P^{2-K} = 0,00255^*$	1,02 [0,72; 1,30]

P^{1-2} — уровни значимости отличий при сравнении групп нестимулированных и стимулированных оперированных животных по критерию Манна – Уитни; P^{1-K} , P^{2-K} — уровни значимости отличий каждой из групп оперированных животных от интактного контроля по критерию Манна – Уитни; * — различия достоверны при $p < 0,05$

Распределение миелинизированных волокон по диаметру серии 1 и серии 2 достоверно отличалось от распределения в интактном нерве (рис. 4). Даже через 6 мес. после операции оно оставалось унимодальным, количество классов гистограммы уменьшено. Однако и в 4, и в 6 мес. после операции в серии 2 главный пик гистограммы смещен вправо по сравнению с серией 1, а количество классов гистограммы на один больше, и эта разница между сериями через 6 мес. подтверждается статистически (рис. 4).

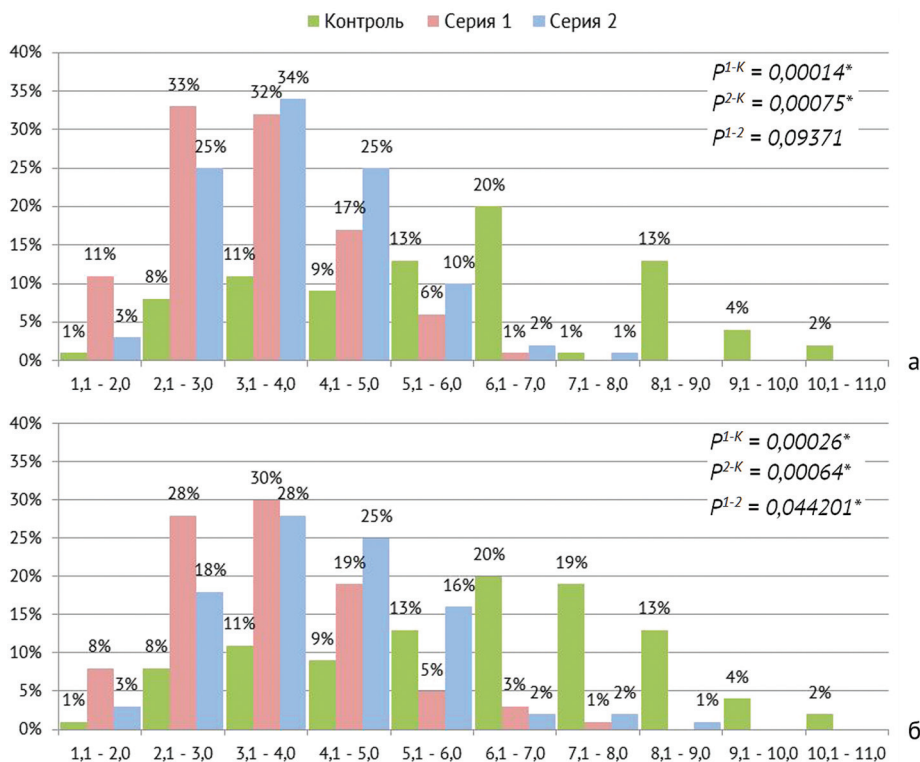


Рис. 4. Гистограммы распределения миелинизированных волокон по диаметрам: а — 4 мес. после операции; б — 6 мес. после операции. Ось абсцисс — диаметры волокон в мкм, ось ординат — их процентные доли в выборке; P^{1-2} — уровни значимости различий между нестимулированными и стимулированными животными серий 1 и 2; P^{1-K} , P^{2-K} — уровни значимости отличий каждой из серий с интактным контролем по критерию Хи-квадрат

Исследование эндоневральной васкуляризации показало, что через 4 мес. после операции в сериях 1 и 2 численные плотности эндоневральных сосудов достоверно превышают интактный контроль на 134 % и 156 %, их средние диаметры — на 18 % и 16 % соответственно, а диаметр просвета возрастает только в серии 2 на 8 % (табл. 5). Снижение параметра «индекс Керногана» в серии 1 на этом сроке относительно контроля свидетельствует об ухудшении пропускной способности кровеносных сосудов. Через 6 мес. в сериях 1 и 2 численные плотности микрососудов снижаются, но достоверно превышают контроль на 66 % и 83 %, средние диаметры — на 14 % и 36 %, диаметры просветов — на 26 % и 50 % соответственно (табл. 5). При этом достоверные различия по параметру «индекс Керногана» между сериями на этом сроке опыта отсутствуют (табл. 5).

Таблица 5

Размерные параметры эндоневральных сосудов большеберцового нерва через 4 и 6 мес. опыта, Ме [Q1; Q3]

Параметры	Серия 1 — аутопластика (n = 16)		Серия 2 — аутопластика+ИЭС (n = 14)		Интактный контроль (n = 7)
	4 мес. (n = 7)	6 мес. (n = 7)	4 мес. (n = 8)	6 мес. (n = 8)	
Численная плотность сосудов	200 [109; 219] $P^{1-K} = 0,01935^*$ $P^{1-2} = 0,25751$	142,13 [130,69; 168,27] $P^{1-K} = 0,00618^*$ $P^{1-2} = 0,715001$	219 [109; 274] $P^{2-K} = 0,00695^*$	156,31 [132; 183] $P^{2-K} = 0,03213^*$	85,64 [82,21; 127,88]
Диаметр сосудов (мкм)	14,49 [12,56; 16,88] $P^{1-K} = 0,00206^*$ $P^{1-2} = 0,854221$	14,08 [11,91; 17,82] $P^{1-K} = 0,00138^*$ $P^{1-2} = 0,01454^*$	14,29 [11,86; 17,53] $P^{2-K} = 0,00743^*$	16,76 [13,45; 19,14] $P^{2-K} = 0,00007^*$	12,32 [9,31; 15,30]
Диаметр просвета (мкм)	4,81 [1,75; 6,72] $P^{1-K} = 0,355172$ $P^{1-2} = 0,126962$	5,97 [3,64; 7,77] $P^{1-K} = 0,06917$ $P^{1-2} = 0,00692^*$	5,10 [3,62; 7,29] $P^{2-K} = 0,49948$	7,09 [5,30; 10,01] $P^{2-K} = 0,00001^*$	4,72 [3,28; 5,92]
Индекс Керногана	0,30 [0,15; 0,43] $P^{1-K} = 0,00075^*$ $P^{1-2} = 0,002664^*$	0,42 [0,30; 0,44] $P^{1-K} = 0,14051$ $P^{1-2} = 0,05255^*$	0,39 [0,28; 0,46] $P^{2-K} = 0,29573$	0,42 [0,39; 0,52] $P^{2-K} = 0,31603$	0,41 [0,32; 0,48]

P^{1-2} — уровни значимости отличий при сравнении групп нестимулированных и стимулированных оперированных животных по критерию Манна – Уитни; P^{1-K} , P^{2-K} — уровни значимости отличий каждой из групп оперированных животных от интактного контроля по критерию Манна – Уитни; * — различия достоверны при $p < 0,05$

ОБСУЖДЕНИЕ

Компенсация функционального дефицита, вызванного повреждением нерва, происходит за счёт трёх механизмов: реиннервации денервированных органов-мишеней путём регенерации повреждённых аксонов, реиннервации за счёт коллатерального спраутинга неповреждённых аксонов, ремоделирования схем центральной нервной системы, относящихся к утраченным функциям [25].

Для оценки выраженности регенерационного компонента морфофункционального восстановления в животных моделях повреждений нервов наиболее информативен метод гистоморфометрии поперечных полутонких срезов дистальнее зоны повреждения, который нашёл широкое применение в доклинических исследованиях нейрорегенерации.

Так, по данным E.F. Oliveira et al., при повреждении седалищного нерва крыс в ранние сроки регенерации (до 2 мес. после операции) отмечена корреляция седалищного функционального индекса с численной плотностью регенерирующих волокон, которая оценена авторами как адекватный инструмент оценки функционального дефицита [26]. По данным R.S. Martins et al., через 6 мес. после операции из 17 исследованных гистоморфометрических и электрофизиологических параметров только средний диаметр миелинизированных волокон проксимальнее и дистальнее зоны повреждения коррелировал с седалищным функциональным индексом [27].

Отмеченная закономерность, по-видимому, не случайна. Радиальный рост аксонов, увеличивающий диаметр регенерировавших волокон, начинается только после контакта конусов роста с органами-мишенями [28]. Однако восстановление нормальных размеров регенерирующих волокон не происходит вплоть до 6 мес. после травмы даже в модели передавливания нерва крыс, когда регенерация аксонов происходит внутри сохранивших целостность эндоневральных трубок [29]. По данным M. Ikeda et al., через 7 мес. после перерезки и шва седалищного нерва крыс средний диаметр регенерировавших нервных волокон не превышал 50 % значения интактного нерва [30].

В нашем исследовании медиана диаметров регенерировавших миелинизированных волокон на уровне средней трети голени составила 52 % от значения интактной группы у нестимулированных крыс и превысила 60 % у стимулированных. Это даёт основание считать, что реиннервация органов-мишеней в наших экспериментах осуществляется активно как у стимулированных, так и нестимулированных животных, но к 6 мес. после аутонейропластики не завершена. Наиболее существенный результат нашего исследования — статистически значимая разница всех размерных параметров регенерирующих нервных волокон в группах нестимулированных и стимулированных животных, доказывающая эффективность однократного 40-минутного сеанса ИЭС проксимального отрезка нерва. Следует также отметить, что разница между стимулированными и нестимулированными животными по всем размерным параметрам миелинизированных волокон через 6 мес. после операции была больше, чем через 4 мес., что указывает на стойкий нейрорегенераторный эффект.

Выполненная в нашем исследовании оценка эндоневральной васкуляризации большеберцового нерва через 4 и 6 мес. после аутонейропластики большеберцовой порции седалищного нерва также свидетельствует о реваскуляризирующем эффекте ИЭС.

Исследования васкуляризации регенерирующих нервов немногочисленны, однако они свидетельствуют об увеличении размеров интраневральных сосудов под действием нейропептидов, а также о ва-

зодилатации и неоангиогенезе, связанных с усилением секреции вазогенных факторов резидентными и рекрутированными макрофагами [31]. В нашем исследовании численная плотность эндоневральных сосудов и их диаметры значительно превышали соответствующие параметры интактных нервов в обеих группах оперированных животных. Однако через 4 мес. после операции диаметр просвета возрастал только у стимулированных крыс на 8 %, что наряду с изменениями индекса Керногана указывает на лучшую пропускную способность эндоневральных сосудов в данной серии по сравнению с нестимулированным контролем. Через 6 мес. после операции гиперваскуляризация эндоневрия сохраняется в обеих сериях, но у стимулированных крыс диаметры эндоневральных сосудов и их просветов достоверно превышают значения нестимулированных на 19 %.

Полученные гистоморфометрические данные согласуются с результатами функциональной оценки.

По данным клинических исследований, хорошее восстановление функции нервов после аутонейропластики могут быть получены только у пациентов моложе 25 лет [32]. В наших экспериментах использованы крысы таких возрастных групп, которые, по данным других авторов, характеризуются снижением уровня антиоксидантов и развитием метаболического синдрома [33]. То есть, результаты нашего исследования могут быть транслированы в клиническую практику для пациентов не только молодого, но и среднего возраста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значимое увеличение диаметров регенерирующих нервных волокон в большеберцовом нерве, а также диаметров их аксонов и толщины миелинизированных оболочек через 4 и 6 мес. после аутопластики большеберцовой порции седалищного нерва в группе животных с однократной 40-минутной ИЭС проксимального участка седалищного нерва свидетельствует о промотирующем влиянии применённого аддитивного воздействия на регенераторный аксоно- и миелиногенез.

Увеличение просветов и улучшение пропускной способности эндоневральных сосудов большеберцового нерва в серии с ИЭС обеспечило стойкость нейрорегенераторного эффекта.

Функциональная значимость эффектов однократной интраоперационной стимуляции подтверждается достоверно более высоким процентом животных с отличными результатами восстановления статического функционального индекса (50 % против 12,15 % в нестимулированном контроле).

Финансирование. Научная работа финансирована в рамках государственного задания.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Huckhagel T, Nüchtern J, Regelsberger J, et al. Nerve injury in severe trauma with upper extremity involvement: evaluation of 49,382 patients from the TraumaRegister DGU® between 2002 and 2015. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2018;26(1):76. doi: 10.1186/s13049-018-0546-6
2. Huckhagel T, Nüchtern J, Regelsberger J, et al. Nerve trauma of the lower extremity: evaluation of 60,422 leg injured patients from the TraumaRegister DGU® between 2002 and 2015. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2018;26(1):40. doi: 10.1186/s13049-018-0502-5
3. Литвиненко И.В., Одинак М.М., Живолупов С.А. и др. Клинико-инструментальные характеристики травматических поражений периферических нервов конечностей. *Вестник Российской Военно-медицинской академии.* 2018;20(3):50-56. doi: 10.17816/brmma12231
4. Ferguson TA, Son YJ. Extrinsic and intrinsic determinants of nerve regeneration. *J Tissue Eng.* 2011;2(1):2041731411418392. doi: 10.1177/2041731411418392
5. Grinsell D, Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:698256. doi: 10.1155/2014/698256
6. Raginov IS, Chelyshev YA. Post-traumatic survival of sensory neurons of different subpopulations. *Neurosci Behav Physiol.* 2005;35(1):17-20. doi: 10.1023/b:neab.0000049647.19397.30
7. Gordon T. Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8652. doi: 10.3390/ijms21228652
8. Lamoureux PL, O'Toole MR, Heidemann SR, Miller KE. Slowing of axonal regeneration is correlated with increased axonal viscosity during aging. *BMC Neurosci.* 2010;11:140. doi: 10.1186/1471-2202-11-140
9. Lemke A, Penzenstadler C, Ferguson J, et al. A novel experimental rat model of peripheral nerve scarring that reliably mimics post-surgical complications and recurring adhesions. *Dis Model Mech.* 2017;10(8):1015-1025. doi: 10.1242/dmm.028852
10. Wang ML, Rivlin M, Graham JG, Beredjiklian PK. Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. *Connect Tissue Res.* 2019;60(1):3-9. doi: 10.1080/03008207.2018.1489381
11. Mu L, Chen J, Li J, et al. Immunohistochemical Detection of Motor Endplates in the Long-Term Denervated Muscle. *J Reconstr Microsurg.* 2018;34(5):348-358. doi: 10.1055/s-0038-1627463
12. Borisov AB, Huang SK, Carlson BM. Remodeling of the vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. *Anat Rec.* 2000;258(3):292-304. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(20000301)258:3<292::AID-AR9>3.0.CO;2-N
13. ElAbd R, Alabdulkarim A, AlSabah S, et al. Role of Electrical Stimulation in Peripheral Nerve Regeneration: A Systematic Review. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2022;10(3):e4115. doi: 10.1097/GOX.0000000000004115

14. Худяев А.Т., Мартель И.И., Самылов В.В. и др. Малоинвазивные методы лечения повреждений периферических нервов. *Гений ортопедии*. 2012;(1):85-88.
15. Бажанов С.П., Шувалов С.Д., Бахарев Р.М. и др. Сравнительный анализ ближайших результатов хирургического лечения пациентов с закрытыми тракционными повреждениями плечевого сплетения. *Гений ортопедии*. 2022;28(5):631-635. doi: 10.18019/1028-4427-2022-28-5-631-635. EDN: RIGWJV.
16. Wong JN, Olson JL, Morhart MJ, Chan KM. Electrical stimulation enhances sensory recovery: a randomized controlled trial. *Ann Neurol*. 2015;77(6):996-1006. doi: 10.1002/ana.24397
17. McLean NA, Verge VM. Dynamic impact of brief electrical nerve stimulation on the neural immune axis-polarization of macrophages toward a pro-repair phenotype in demyelinated peripheral nerve. *Glia*. 2016;64(9):1546-1561. doi: 10.1002/glia.23021
18. Shapira Y, Sammons V, Forden J, et al. Brief Electrical Stimulation Promotes Nerve Regeneration Following Experimental In-Continuity Nerve Injury. *Neurosurgery*. 2019;85(1):156-163. doi: 10.1093/neuros/nyy221
19. Roh J, Schellhardt L, Keane GC, et al. Short-Duration, Pulsatile, Electrical Stimulation Therapy Accelerates Axon Regeneration and Recovery following Tibial Nerve Injury and Repair in Rats. *Plast Reconstr Surg*. 2022;149(4):681e-690e. doi: 10.1097/PRS.00000000000008924
20. Sayanagi J, Acevedo-Cintrón JA, Pan D, et al. Brief Electrical Stimulation Accelerates Axon Regeneration and Promotes Recovery Following Nerve Transection and Repair in Mice. *J Bone Joint Surg Am*. 2021;103(20):e80. doi: 10.2106/JBJS.20.01965
21. Raslan A, Salem MAM, Al-Hussaini A, et al. Brief Electrical Stimulation Improves Functional Recovery After Femoral But Not After Facial Nerve Injury in Rats. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019;302(8):1304-1313. doi: 10.1002/ar.24127
22. Zuo KJ, Shafa G, Antonyshyn K, et al. A single session of brief electrical stimulation enhances axon regeneration through nerve autografts. *Exp Neurol*. 2020;323:113074. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113074
23. Koh GP, Fouad C, Lanzinger W, Willits RK. Effect of Intraoperative Electrical Stimulation on Recovery after Rat Sciatic Nerve Isograft Repair. *Neurotrauma Rep*. 2020;1(1):181-191. doi: 10.1089/neur.2020.0049
24. van Neerven SG, Bozkurt A, O'Dey DM, et al. Retrograde tracing and toe spreading after experimental autologous nerve transplantation and crush injury of the sciatic nerve: a descriptive methodological study. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2012 A;7(1):5. doi: 10.1186/1749-7221-7-5
25. Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*. 2007;82(4):163-201. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.06.005
26. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg*. 2001;17(1):69-75. doi: 10.1055/s-2001-12691
27. Martins RS, Siqueira MG, da Silva CF, Plese JP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006;64(3B):750-756. doi: 10.1590/s0004-282x2006000500010
28. Regeneration of Neural Tissues. In: Stocum DL. *Regenerative Biology and Medicine* (Second Edition). San Diego: Academic Press Publ.; 2012:67-97.
29. Muratori L, Ronchi G, Raimondo S, et al. Can regenerated nerve fibers return to normal size? A long-term post-traumatic study of the rat median nerve crush injury model. *Microsurgery*. 2012;32(5):383-387. doi: 10.1002/micr.21969
30. Ikeda M, Oka Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain Behav*. 2012;2(4):382-390. doi: 10.1002/brb3.61
31. Caillaud M, Richard L, Vallat JM, et al. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. *Neural Regen Res*. 2019;14(1):24-33. doi: 10.4103/1673-5374.243699
32. Kuffler DP, Foy C. Restoration of Neurological Function Following Peripheral Nerve Trauma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1808. doi: 10.3390/ijms21051808
33. Ghezzi AC, Cambri LT, Botezelli JD, et al. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4(1):16. doi: 10.1186/1758-5996-4-16

Статья поступила 02.12.2022; одобрена после рецензирования 17.01.2023; принята к публикации 08.04.2024.

The article was submitted 02.12.2022; approved after reviewing 17.01.2023; accepted for publication 08.04.2024.

Информация об авторах:

Наталья Анатольевна Шудло — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, nshchudlo@mail.ru;

Татьяна Николаевна Варсегова — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, varstn@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5430-2045>;

Татьяна Анатольевна Ступина — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, StupinaSTA@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3434-0372>.

Information about the authors:

Natalya A. Shchudlo — Doctor of Medical Sciences, leading researcher, nshchudlo@mail.ru;

Tatyana N. Varsegova — Candidate of Biological Sciences, senior researcher, varstn@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5430-2045>;

Tatyana A. Stupina — Doctor of Biological Sciences, leading researcher, StupinaSTA@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3434-0372>.