

© Группа авторов, 2004

Динамика изменений большеберцового нерва при удлинении голени собак автодистрактором

В.И. Шевцов, Т.Н. Варсегова, М.М. Щудло, С.А. Ерофеев

The dynamics of tibial nerve changes in the process of canine leg lengthening using an autodistractor

V.I. Shevtsov, T.N. Varsegova, M.M. Chtchoudlo, S.A. Yerofeyev

Государственное учреждение

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

Изучали динамику изменения количественных показателей большеберцовых нервов на этапах удлинения голени 14 взрослых беспородных собак высокоразрешающими автоматическими дистракторами. В конце дистракции на дистальном уровне средней 1/3 голени наблюдается уменьшение общей площади поперечного сечения нерва и суммарной площади пучков нервных волокон в сравнении с контролем (контралатеральный нерв). К концу фиксации нерв становится равномерно тоньше, через 30 дней после снятия аппарата площадь его поперечного сечения у двух животных восстанавливается, а у двух становится достоверно больше контрольных значений. Морфологические признаки тракционного повреждения отсутствуют. Происходящие изменения в соотношении внутripучковых структурных компонентов нерва приводят к повышению объемной плотности миелиновых нервных волокон по сравнению с контралатеральным нервом, что является показателем восстановления морфологической структуры и функции нерва.

Ключевые слова: автодистракция, большеберцовый нерв, морфометрия, стереология.

The dynamics of the changes of tibial nerve quantitative indices has been studied at the stages of leg lengthening in 14 adult mongrel dogs using automatic distractors of high division. Decrease of the total area of the nerve cross-section and the general area of nerve fiber bundles is noted at the end of distraction at the distal level of the leg middle 1/3 comparing with the control (contralateral) nerve. The nerve becomes uniformly thinner by the end of fixation, the area of its cross-section is restored in 30 days after the autodistractor removal in two animals and in the other two it becomes to be reliably more than the control values. There are no morphological signs of traction injury. The changes which occur in the correlation of the nerve intra-bundle structural components lead to the increase of the volume density of the nerve myelin fibers in comparison with the contralateral nerve, being an indicator of the recovery of the nerve morphologic structure and function.

Keywords: autodistraction, tibial nerve, morphometry, stereology.

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени в специальной литературе накопилось значительное количество фактов, свидетельствующих о высокой чувствительности периферической нервной системы к различным экспериментальным воздействиям [7, 10, 12]. Морфологическое описание берцовых нервов в условиях дистракционного остеосинтеза было предметом специальных исследований [3, 6, 8]. По мере разработки новых методических подходов возрастает интерес к изучению количественных показателей периферических нервов, отражающих полноту их функционального и морфологического

восстановления после различных видов повреждений [4, 9, 11] и объективно характеризующих направленность и временные изменения их морфофункционального состояния при удлинении конечности в высокоразрешающих режимах. Учитывая отсутствие таких данных, мы поставили перед собой задачу изучить в эксперименте на животных динамику изменения гистоморфометрических показателей большеберцового нерва на этапах удлинения голени высокоразрешающими автоматическими дистракторами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали большеберцовые нервы 14 взрослых беспородных собак, которым после закрытой флекссионной остеоклазии удлинляли

голень на 15% в течение 28 дней аппаратом Илизарова с автоматическим приводом, обеспечивающим дистракцию костных фрагментов с

суточной скоростью 1,0 мм и шагом 0,017 мм. Животных выводили из опыта передозировкой барбитуратов в конце distraction (n=7), через месяц фиксации (n=3) и через месяц после снятия аппарата (n=4). Большеберцовые нервы контралатеральной (условный контроль) и опытной конечностей на уровне средней 1/3 голени закрепляли на твердой основе и иссекали для морфологического исследования. Проксимальный и дистальный концы иссеченных фрагментов нервов замораживали в жидком азоте и на микротоме-криостате МК-25 ТУ 64-1-856-78 при $t = -18^{\circ}\text{C}$ разлагали на тотальные поперечные срезы толщиной 7-10 мкм. В них кальций-кобальтовым методом [3. Лойда, 1982] выявляли активность миоминовой АТФ-азы. Остальной материал фиксировали в смеси 2% растворов глутарового и параформальдегидов на фосфатном буфере (рН 7,4), постфиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия, дегидратировали в этаноле возрастающей концентрации и заливали в эпоксидные смолы. Поперечные полутонкие (0,5-1,0 мкм) срезы большой площади получали на ультратоме "Nova" фирмы LKB (Швеция), монтировали на заранее целлоидинированные предметные стекла и окрашивали раствором метиленового синего и основного фуксина.

Препараты изучали в большом исследовательском фотомикроскопе и стереомикроскопе фирмы "Opton", оснащенных аппаратно-программным комплексом "DiaMorph", что позволило оцифровывать изображения в ходе исследования. В цифровых изображениях гистохимических препаратов в программе "MEDIAS" ("DiaMorph", Россия) измеряли общую площадь поперечного сечения нерва, суммарную площадь пучков нервных волокон вместе с окружающим их периневрием. Полученные значения сопоставляли по критерию Манна-Уитни (двусторонний вариант).

В цифровых изображениях полутонких срезов методом точко-счетной объемметрии рассчитывали относительный объем нервных волокон ($V_{v_{nf}}$), эндоневрия ($V_{v_{endo}}$) [1]. Определяли численные плотности мягкотных нервных волокон (NA_{mnf}), их реактивно измененных форм (NA_{dmnf}) и долю последних в общем объеме выборки. Анализ цифрового материала проводили методами непараметрической статистики в программе Microsoft Excel 97 по W-критерию Вилкоксона для независимых выборок (статистические тесты запрограммированы И.П. Гайдышевым [2] и помещены в динамически подключаемую библиотеку).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 28 дней удлинения на дистальном уровне общая площадь поперечного сечения большеберцового нерва оперированной конечности и суммарная площадь пучков нервных волокон в 1,5 раза меньше, чем на контралатеральной стороне (рис. 1). На проксимальном уровне достоверные отличия по этому параметру отсутствуют ($p > 0,05$).

Мякотные нервные волокна не обнаруживаются патологических изменений, вместе с тем встречаются отдельные проводники крупного калибра с признаками реактивно-деструктивных изменений в виде вакуолизации аксона и дезинтеграции миелина, составляющие в среднем 1,78% в нервах опытной и 0,47% – контралатеральной конечностей.

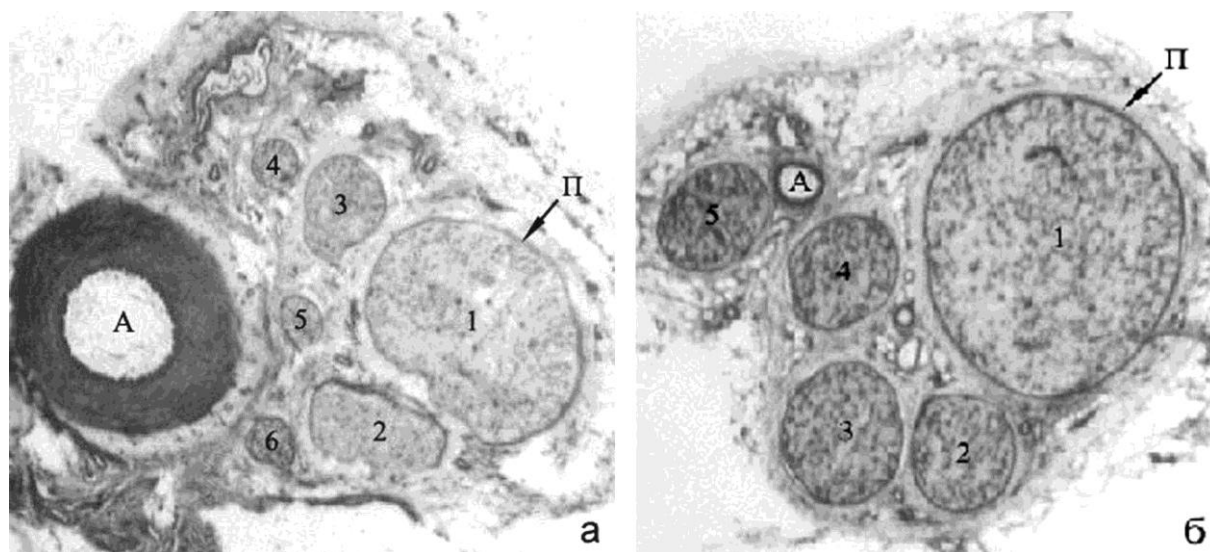


Рис. 1. Большеберцовый нерв, дистальный уровень, distraction 28 дней: а) оперированная, б) контралатеральная конечности; 1-6 – пучки нервных волокон, П – периневрий, А – артерия. Криостатные срезы, реакция на миоминовую АТФ-азу. Об.- 1, ок.- 10х. Эксперимент № 2084

Объемная доля нейральных элементов в нерве оперированной конечности на 14,5% ниже, чем в контралатеральном нерве ($p<0,05$) (табл. 1), а доля эндоневрия соответственно выше. Численная плотность мягкотных волокон в удлинённом нерве незначительно выше, чем в контралатеральном ($p>0,05$). Как на оперированной, так и на контралатеральной стороне встречаются тонкие миелинизирующиеся рематовские волокна малого калибра с разной степенью зрелости мягкотной оболочкой.

К концу distraction в большинстве наблюдений животные пользовались удлинённой конечностью, приступая на нее в стойке или при ходьбе. Положение стопы, как правило, было близко к физиологическому.

В конце фиксации площадь поперечного сечения нерва оперированной стороны меньше (в среднем в 1,2 раза) на обоих уровнях. Соответственно уменьшена и суммарная площадь пучков.

Объёмная плотность нервных волокон незначительно (на 2,2%) ниже, а численная плотность мягкотных волокон в удлинённом нерве на 18% выше ($p<0,05$), чем на контралатеральной стороне. Как и на предыдущем сроке эксперимента, в нерве оперированной конечности содержатся незрелые миелинизирующиеся волокна.

На стороне удлинения продолжают встречаться единичные (0,45%) реактивно-изменённые мягкотные волокна, а в нервах контралатеральной конечности (рис. 2) количество их возрастает до 1,09% (табл. 1). При этом численная плотность деструктивно изменённых мягкотных нервных волокон и их процентная доля в общем объёме вы-

борки по сравнению с контралатеральной стороной уменьшается примерно в 2 раза.

Объёмная плотность эндоневрия большеберцового нерва опытной конечности, как и на предыдущем сроке, превышает контрольные значения на 8% при $p<0,05$ (табл. 1).

Нужно отметить, что в период фиксации все собаки активно нагружали оперированную конечность, амплитуда движений в коленном суставе приближалась к норме и составляла 90-100° (норма 100-110°), в голеностопном суставе сохранялось ограничение амплитуды движений – 50-60°.

Через месяц после снятия аппарата у двух животных общая площадь нерва и суммарная площадь пучков нервных волокон на опытной конечности в 1,3 раза больше ($p<0,05$), чем на контралатеральной. У остальных двух общая площадь нерва достоверно не отличается от контроля, а суммарная площадь пучков меньше в 1,2 раза ($p<0,05$).

Объёмная плотность нервных волокон на этом сроке наблюдения оказывается выше на оперированной стороне (в среднем на 5,5%). Численная плотность мягкотных волокон ниже, однако это различие статистически незначимо. Процентное содержание мягкотных нервных волокон с признаками реактивно-деструктивных изменений на опытной и контралатеральной сторонах составляет 0,54 и 0,92% соответственно.

Объёмная плотность внутripучковой соединительной ткани понижена на 13% по сравнению с контролем, при $p<0,05$ (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрические характеристики большеберцовых нервов собак на этапах эксперимента

Сроки	Число опытов	Конечность	Vv _{nf}	Vv _{endo}	NA _{mnf}	NA _{dmnf}	Доля (%) dmnf
Д - 28	7	оперированная	50,6*	49,4*	22,5	0,4*	1,78
		контралатеральная	65,1	34,9	21,4	0,1	0,47
Ф - 30	3	оперированная	72,2*	27,8*	22,2 *	0,1*	0,45
		контралатеральная	74,4	25,6	18,3	0,2	1,09
БА - 30	4	оперированная	62,6*	37,4*	18,6	0,1*	0,54
		контралатеральная	57,1	42,9	21,7	0,2	0,92

* - различия между опытной и контралатеральной конечностью достоверны по W – критерию Вилкоксона для независимых выборок ($p<0,05$).

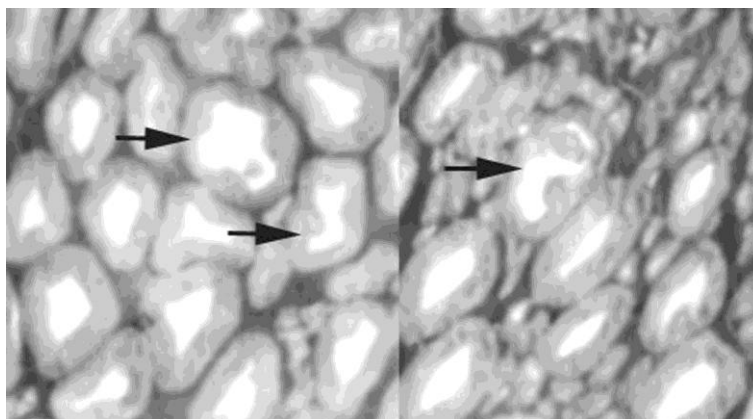


Рис. 2. Левый большеберцовый нерв. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об. 40, ок. 12,5х. Эксперимент № 2210, distraction 28, фиксация 30 дней. Стрелки – реактивноизменённые крупные мягкотные нервные волокна

После снятия аппарата каких-либо ограничений функции оперированной конечности клинически выявлено не было.

Полученные результаты количественного исследования большеберцового нерва на разных этапах удлинения голени свидетельствуют о том, что в конце distraction на оперированной стороне уменьшение общей площади поперечного сечения нерва и суммарной площади пучков нервных волокон наблюдается только на дистальном уровне средней 1/3 голени. Данный факт можно объяснить тем, что большеберцовый нерв связан с окружающими тканями в области голеностопного (скакательного) сустава и при удлинении голени его дистальный участок испытывает наибольшее растяжение. К концу периода фиксации нерв становится равномерно, но незначительно истонченным в сравнении с контралатеральной стороной, а через 30 дней после снятия аппарата площадь его поперечного сечения у двух животных восстанавливается, у двух же достоверно превышает контрольные значения.

Исследование показывает отсутствие каких-либо морфологических признаков тракционного повреждения нерва, что согласуется с данными К. Ikeda, К. Tomita, S. Tanaka [11], которые при удлинении бедра кролика с суточной скоростью 0,8-2,0-4,0 мм за 1 прием ни в одной из экспериментальных групп не обнаружили явлений валлеровской дегенерации волокон седалищного нерва. Нами отмечено развитие незначительных реактивных изменений толстых мякотных нервных волокон, которые, по мнению многих авторов [5, 6, 8], являются наиболее чувствительными к механическим воздействиям. В конце distraction численная плотность реактивно-

измененных мякотных нервных волокон в четыре раза выше в нерве оперированной конечности, чем в контралатеральной, но на этапе фиксации и после снятия аппарата этот параметр в два раза выше в контралатеральном нерве. Их доля в общем объеме выборки меняется аналогично. Это свидетельствует не только об уменьшении действия факторов, влияющих на нервные волокна, но и о некотором приросте численности волокон с нормальной структурой.

Изменения соотношений площадей поперечного сечения нерва, суммарной площади его пучков, объемной плотности нервных волокон и эндоневрия, а также численной плотности мякотных волокон отражают различные процессы, протекающие на этапах эксперимента. Мы предполагаем, что это прежде всего результат перераспределения эндоневральной жидкости, изменения аксоплазматического тока, перекалибровки мякотных нервных волокон, новообразования и дифференцировки нервных проводников, а также морфогенетических процессов в оболочках нерва. Увеличение объемной доли нейральных элементов и уменьшение доли измененных нервных волокон в нерве оперированной конечности по сравнению с контралатеральным к концу эксперимента свидетельствует о восстановлении аксонального транспорта в зрелых волокнах и образовании новых нервных проводников.

Полученные в результате проведенного исследования данные об отсутствии морфологических признаков тракционного повреждения нерва указывают на малую травматичность оперативного вмешательства и удлинения конечности, а также о структурно-функциональной адаптации нейронов к увеличению длины конечности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов, Г.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса / Г.Г. Автандилов, Н.И. Яблунинский, В.Г. Губенко. - М.: Медицина, 1981. - 192 с.
2. Гайдышев, И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник / И.П. Гайдышев. - СПб: Питер, 2001. - 752 с.
3. Значение ритма distraction для реализации «эффекта Илизарова» в нервах удлиняемого сегмента конечности / Г.А. Илизаров, М.М. Щудло, Н.Р. Карымов и др. // Гений ортопедии. - 1995. - № 1. - С. 12-17.
4. Индекс невротизации и параметры мякотных 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. - № 4, Вып. 13. - С. 82-87.
5. Клинико-физиологические морфологические характеристики адаптивной перестройки в мягкотканых структурах удлиняемой конечности / В.И. Калякина, А.П. Шеин, Н.А. Шеховцова и др. // Значение открытых Г.А. Илизаровым общебиологических закономерностей в регенерации тканей: Сб. науч. тр. - Курган, 1988. - Вып. 13. - С. 63-71.
6. Кочуткина, Л.Н. Репаративный миелиногенез и изменения в периферических нервах голени в условиях удлинения ее методами моно- и биллокального distractionного остеосинтеза в эксперименте / Л.Н. Кочуткина, И.П. Кудрявцева, А.И. Реутов // Реактивность организма и регенерация тканей при компрессионно-distractionном остеосинтезе: Сб. науч. тр. ВКНЦ «ВТО». - Курган, 1991. - С. 32-44.
7. Мирошникова, М.Е. Регенерация седалищного нерва крысы после его различных экспериментальных повреждений / М.Е. Мирошникова, Е.И. Чумасов // Арх. анат. - 1988. - № 10. - С. 30-35.
8. Морфологические изменения крупных нервных стволов и нервно-мышечного аппарата голени при ее дозированном удлинении / Л.А. Смирнова, Л.И. Беленко, Н.Н. Мажара, В.М. Яковлев // Ортопед., травматол. - 1972. - № 8. - С. 37-44.
9. 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.
10. Чайковский, Ю.Б. Регенерационная неврома / Ю.Б. Чайковский // Морфология. - 1999. - № 1, Т. 115. - С. 55-67.
11. Ikeda, K. Experimental study of peripheral nerve injury during gradual limb elongation / K. Ikeda, K. Tomita, S. Tanaka // Hand Surgery. - 2000. - Vol. 5, N 1. - P. 41-47.
12. Stoll, G. Peripheral Neuropathies Nerve Injury, Axonal Degeneration and Neural Regeneration: Basic Insights / G. Stoll, H.W. Muller // Brain Pathology - 1999. - N 9. - P. 313-325.

Рукопись поступила 07.10.03.