

УДК 616.833—001—003.93—089.843:611—013.7/8—018.8

Ультраструктурна характеристика ушкодженого периферичного нерва при трансплантації ембріональної нервової тканини

Цимбалюк В.І., Носов А.Т., Баюн Ю.В., Лузан Б.М., Васлович В.В.

Інститут нейрохірургії імені акад. А.П. Ромоданова АМН України, м.Київ, Україна

Ключові слова: трансплантація, ембріональна нервова тканина, регенерація, периферичні нерви.

Нині в Інституті нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України велику увагу приділяють експериментальному дослідженню регенераторної здатності ушкодження нервових волокон з метою поглибленого вивчення проблеми стимуляції відновлення нервових волокон після оперативного втручання. Значне місце в експериментальних дослідженнях останніх років займає трансплантація ембріональної нервової тканини (ЕНТ). Так, проведені раніше експерименти [1] засвідчили, що під впливом трансплантації ЕНТ (ТЕНТ) відбувається відновлення морфофункціонального стану ушкодженого нервового апарату ЦНС. Проте нечисленні наукові роботи, присвячені дослідженню периферичних нервів [2,3], не дають можливості повною мірою охарактеризувати процеси репаративної регенерації ушкодженого нерва в результаті пересадження ЕНТ. У зв'язку з цим метою нашої роботи була ультраструктурна оцінка морфофункціонального стану ушкодженого периферичного нерва при трансплантації ЕНТ.

Для здійснення поставленої мети були проведені дослідні на 30 статевозрілих білих безпородних щурах, котрих, згідно із завданням, розділили на три групи:

1. Тварини, у яких здійснювали переріз сідничного нерва, після чого зшивали його способом кінець в кінець.

2. Тварини, у котрих перерізували сідничний нерв з наступним зшиванням його кінець в кінець і трансплантацією ЕНТ.

3. Контрольна група тварин — з інтактним сідничним нервом.

У кожній групі досліджували три ділянки: ділянку шва, проксимальний відрізок периферичного нерва, дистальний відрізок периферичного нерва.

З метою визначення динаміки розвитку патологічного процесу тварини кожної групи виводили з експерименту на 7-му, 14-ту і 30-ту доби від початку його.

Для електронно-мікроскопічного дослідження

фрагменти тканини периферичного нерва експериментальних тварин розміром $1 \times 1 \text{ мм}^3$ забирали відразу після декапітації їх, фіксували в суміші 4% параформальдегіду, 2,5% глутаральдегіду і 4% сахарози на 0,1 молярному фосфатному буфері (рН=7,4) з наступною дофіксацією в 1% розчині чотириокису осмію (Palladi, 1957), зневоднювали в зростаючих концентраціях етанолу і оксипропілену та заливали сумішшю епоксидних смол (епон-аралдит) за стандартними методиками електронної мікроскопії. Ультратонкі зрізи завтовшки 600 А виготовляли на ультратомах ЛКБ і Рейхардта. Для підвищення контрастності забарвлювали за методом Рейнтгольдса (1963) і розглядали в електронному мікроскопі EM-400T фірми "Філіпс". Для прицільного ультратомування і поглибленої оцінки одержаних даних з епоксидних блоків виготовляли напівтонкі зрізи завтовшки 1 000 А, забарвлювали метиленовим синім (піроніном) і розглядали в світлооптичному мікроскопі.

Морфологічне дослідження тварин з перерізом сідничного нерва і відновленням його способом зшивання кінець в кінець засвідчило, що найбільш виражені зміни спостерігалися на 7—14-ту добу після проведення експерименту в ділянці шва і в дистальному відділі нервового волокна. Ці зміни на світлооптичному рівні (напівтонкі зрізи) характеризувалися дистрофічно-деструктивними порушеннями загальної маси аксонів з напливом нейроплазми і розпадом аксонів за типом валлерівської дегенерації (рис.1). В ділянці шва були помітні численні тромбовані мікросудини, набряк інтерстицію. При електронно-мікроскопічному дослідженні спостерігалися досить виражені дистрофічно-деструктивні зміни шванівської оболонки нервових волокон. Особливо виражені зміни шванівських клітин виявлялись на 7-му добу після перетину волокон у зоні шва. Загальна маса шванівських клітин була зруйнована, а в тих, що зберегли свою структурну цілісність (переважно в проксимальному відділі), виявлялися досить виражені зміни з деструкцією внутрішньоклі-

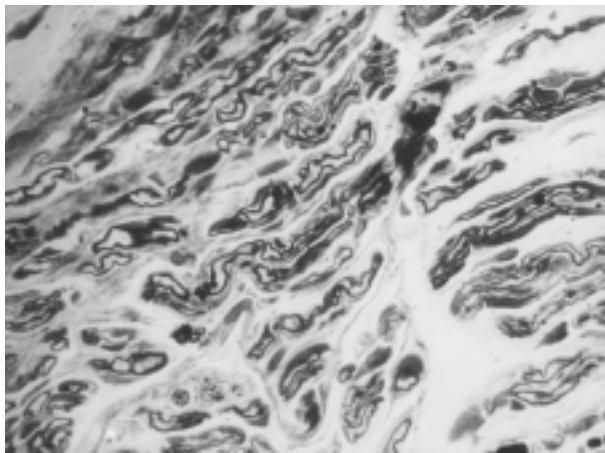


Рис.1. Переріз сідничного нерва щура. Зона шва. 7-ма доба. Виражені деструктивні зміни нервових волокон на тлі вираженого периневрального набряку. Напівтонкий зріз. Забарвлення метиленовим синім (піроніном). Ч600

тинних органел при наявності вакуольної або жирової внутрішньоклітинної дистрофії (рис.2). На 30-ту добу після перерізу нерва з його наступним зшиванням у зоні шва констатовано процеси відновлення структурної цілісності ушкодженого нерва з наявністю рубця, що утворився, фібробластичною активністю і появою в зоні рубця сформованих колагенових волокон, переважно за рахунок розростання периневрія, та з невромами різного ступеня вираженості. Серед невром виявлялись новоутворені нервові волокна, наявність яких більшою мірою простежувалась не в ділянці шва, а в дистальному відділі нервового волокна. У проксимальному відділі спостерігались нерівномірні стовщення нервових волокон з явищами напливу нейроплазми і змінами гістоархітекtonіки окремих з них. Проведене електронно-мікроскопічне дослідження показало, що на 30-ту добу після експерименту в ділянці шва частково відновились структура шванівських клітин. В частині шванівських клітин відбувались процеси внутрішньої репаративної регенерації за рахунок збільшення утворення мітохондрій і посилення рибосомальної активності (рис.3). При цьому мала міра незначно виражена проліферація шванівських клітин, що носила переважно вогнищевий характер і була найбільше представлена в проксимальному та дистальному відділах нервового волокна, в той час, як в ділянці шва спостерігалась проліферація клітин сполучнотканинного ряду, і, в першу чергу, фібробластів, котрі розміщувалися в основному вздовж мікросудин та оточувались новоутвореними колагеновими волокнами, що свідчи-

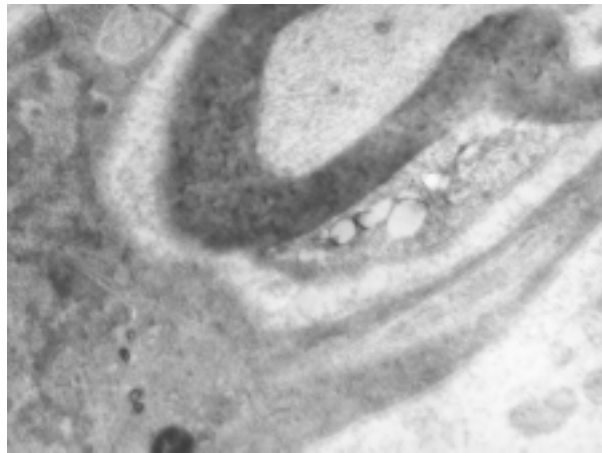


Рис.2. Переріз сідничного нерва щура. Зона шва. 7-ма доба. Виражені деструктивно-дистрофічні зміни шванівської клітини з явищами вакуольної дистрофії. Електроннограма. Ч17 000.

ло про формування в зоні шва рубця сполучнотканинного походження.

При трансплантації ЕНТ в зону шва на 7-му добу після проведення експерименту зміни нервових волокон на світлооптичному рівні характеризувалися явищами гіпер- і гіпохроматозу з напливом нейроплазми вздовж аксонального відростка, а також вогнищевим руйнуванням нервових волокон з ознаками валлерівської дегенерації. В проксимальному відділі гістоархітекtonіка нервових волокон була змінена незначно. Тут виявлявся переважно набряк інтерстицію і практично не було запальної інфільтрації, яка спостерігалась у відповідний термін дослідження при відновленні нерва без ТЕНТ. Структура шванівських клітин найбільше зазнала змін у зоні шва, де переважали клітини з явищами вакуольного і жирового переродження, в той час, як у дистальному і,

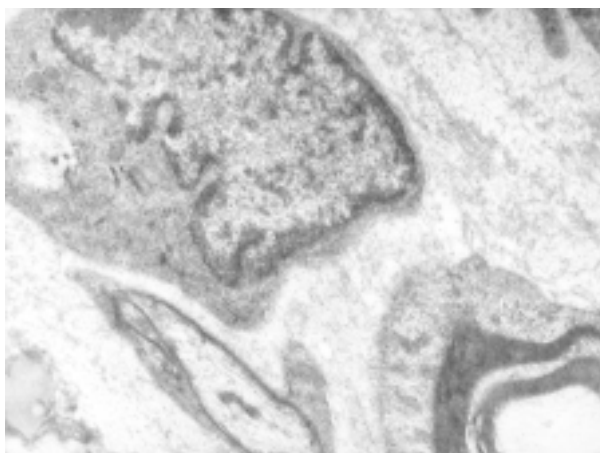


Рис.3. Переріз сідничного нерва щура. Зона шва. 30-та доба. Помірно виражені процеси внутрішньоклітинної репаративної регенерації в цитоплазмі шванівської клітини. Електроннограма. Ч13 000

меншою мірою, в проксимальному відділах ушкодженого нерва більше виявлялись набухлі шванівські клітини з дистрофічними змінами різного ступеня вираженості. Якщо на 14-ту добу після ураження периферичного нерва (в попередній групі дослідження — без застосування ТЕНТ) зміни нервових волокон носили досить помітний дистрофічно-деструктивний характер, то після ТЕНТ значно відновлювалась структурна цілісність периферичного нерва, що спостерігалось на світлооптичному рівні. Порівняно з тваринами попередньої групи дослідження у щурів зменшувався периневральний набряк, особливо в проксимальному відділі ушкодженого нерва, де загальна маса нервових волокон характеризувалася нерізно вираженими дистрофічними змінами. Запальна інфільтрація практично була відсутня. В зоні шва і проксимального відрізка ушкодженого нерва ще мали місце вогнища демієлінізації нервових волокон, поодинокі неврони, а також досить значний периневральний набряк (рис.4). В цих зонах виявлялася запальна інфільтрація з переважанням макрофагів і лейкоцитів, котрі знаходились не тільки в зоні мікросудин, а й вздовж нервових волокон. Усе це свідчило про те, що в даний термін після перерізу нерва з наступним зшиванням його та трансплантацією ЕНТ відбувалося відновлення структурної цілісності ушкодженого нерва. Ультраструктурне дослідження шванівських клітин показало, що на 14-ту добу після перерізу нерва з подальшим зшиванням його і ТЕНТ у всіх ділянках нервового волокна, що вивчалися, спостерігались нечисленні шванівські клітини з добре розвинутою цитоплазмою і наявністю незмінних внутрішньоклітинних органел. Гіперплазія шванівських клітин більш виражена в ділянках

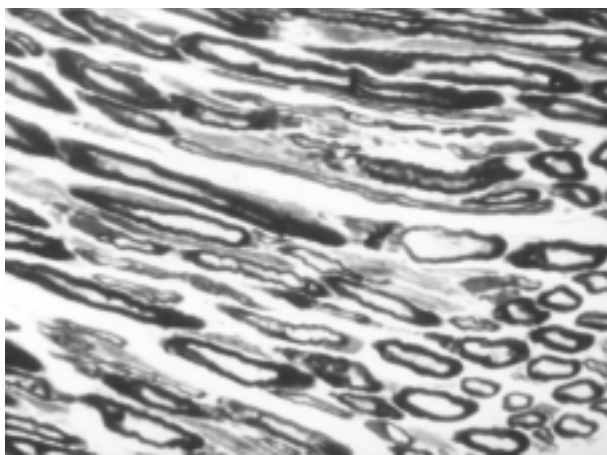


Рис.4. Переріз сідничного нерва щура +ТЕНТ. Зона шва. 14-та доба. Помірно виражені зміни аксонів на тлі незначно вираженого периневрального набряку. Напівтонкий зріз. Забарвлення метиленовим синім (піроніном). Ч600

рубця і дистального відділу ушкодженого нерва. Відростки їх, проникаючи по периневральних просторах, оточували окремі нервові волокна. Вздовж деяких нервових волокон розміщувалися гіпертрофовані шванівські клітини з наявністю великої кількості внутрішньоклітинних органел, зокрема, молодих форм мітохондрій, розвинутого ендоплазматичного ретикулуму і рибонуклеїнових гранул (рис.5).

На 30-ту добу після проведення експерименту у всіх ділянках ушкодженого нерва, що вивчалися, констатувалося посилення процесів нейрогенерации з відновленням цілісності мієлінової оболонки та проліферацією шванівських клітин. Особливо це було помітно в проксимальному і дистальному відділах ушкодженого нервового волокна. Гістоархітекtonіка нерва в проксимальному відділі мало чим відрізнялась від контрольної, а в дистальному відрізку нервового волокна серед новоутворених аксонів і з наявною гіперплазією шванівських клітин спостерігались дистрофічно змінені нервові волокна (рис.6). На відміну від попередньої групи дослідження, в зоні шва замість фібробластів виявлялися скупчення макрофагів зі збільшеною кількістю лізосом і численними цитоплазматичними відростками, що свідчило про їхню підвищену морфофункціональну активність. Численні проліферуючі шванівські клітини формували тяжі, між якими були помітні новоутворені осьові циліндри. Внаслідок ТЕНТ в зоні шва проліферація клітин стромы (фібробластів) була виражена дещо менше, ніж у тварин першої групи. В зв'язку з цим синтезувалося менше колагенових волокон і сполучнотканинний рубець в зоні шва набував меншої щільності, а зона шва являла собою гіперплазую

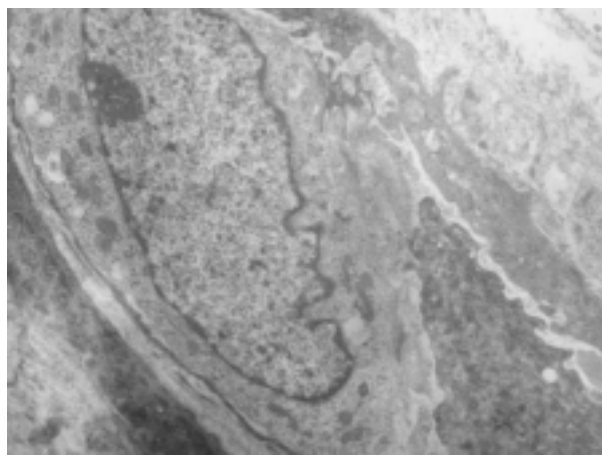


Рис.5. Переріз сідничного нерва щура + ТЕНТ. Зона шва. 14-та доба. Виражені репаративні процеси в цитоплазмі шванівської клітини. Електроннограма. Ч13 000

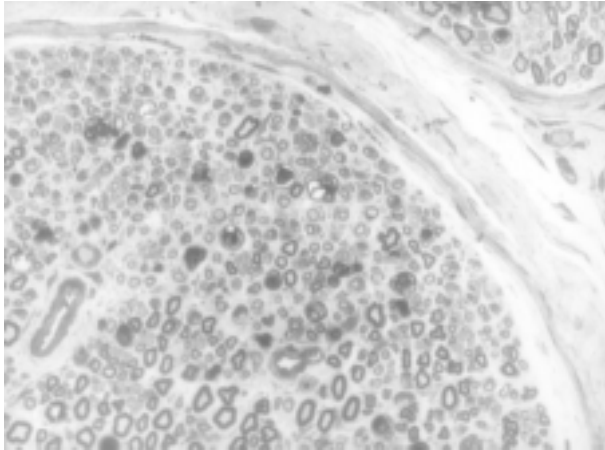


Рис.6. Переріз сідничного нерва щура + ТЕНТ. Зона шва. 30-та доба. Практично незмінена структура нервових волокон проксимального відділу сідничного нерва. Напівтонкий зріз. Забарвлення метиленовим синім (піроніном). Ч600

вані шванівські клітини та новоутворені осьові циліндри.

Таким чином, проведено дослідження засвідчило, що в першій групі тварин протягом перших 7 діб у зоні шва і в дистальному відділі периферичного нерва переважали дистрофічно-деструктивні зміни нервових волокон з порушенням цілісності шванівських клітин на тлі порушеного кровообігу і невираженої лімфоїдноклітинної інфільтрації. Починаючи з 14-ї доби, у всіх відділах ушкодженого нерва, що досліджувалася (зона шва, проксимальний і дистальний відділи), розвивалися процеси репаративного характеру у вигляді відновлення й активації шванівських клітин і відновлення структури нервового волокна на тлі нормалізації мікроциркуляторного судинного русла та зниження лімфоїдноклітинної інфільтрації. До 30-ї доби в зоні шва формувалася сполучнотканинний рубець, що складався з колагенових волокон. Структурна цілісність ушкодженого нерва в цей термін повністю не відновлювалася.

При ТЕНТ на 7-му добу після перерізу нервового волокна в зоні шва і дистальному відділі спостерігались процеси відновного характеру, які полягали у вогнищевій проліферації шванівських клітин, що значно наростала до 14-ї доби від початку експерименту. При цьому на 14-ту добу в зоні шва виявлялася регенерація осьових циліндрів, а до 30-ї доби зона шва характеризувалася появою сформованих осьових циліндрів на тлі вогнищового, переважно безклітинного, склерозу з наявністю невеликої кількості колагенових волокон.

Список літератури

1. Лосева Е.В., Цымбалюк В.И., Пичкур Л.Д., Брагин А.Г. Влияние трансплантации эмбриональной мозговой ткани на структурные изменения в мозге крыс после черепно-мозговой травмы // *Нейрофизиология*. — 1996, — № 5(66). — С.350—360,
2. Петрова Е. С. Имплантация эмбриональной ткани мозга в периферический нерв // *Механизмы регуляции физиологических функций: Тез. докл.* — Л., 1988. — С. 105.
3. Чумасов Е.И., Светикова К.М., Петрова Е.С., Мирошникова М.Е. Репаративная регенерация нервной ткани ЦНС и ПНС и разработка методов восстановления нервных стволов // *Диагностика и лечение поражений периферической нервной системы: Сб. науч. трудов*. — Л.: Издательство ЛНХИ им. Поленова, 1989. — С.96—101.

Ультроструктурная характеристика поврежденного периферического нерва при трансплантации эмбриональной нервной ткани

Цымбалюк В.И., Носов А.Т., Байун Ю.В.,
Лузан Б.Н., Васлович В.В.

Авторы провели ультроструктурное исследование влияния ТЭНТ на регенерацию поврежденного периферического нерва у подопытных крыс. Электронно-микроскопические исследования засвидетельствовали усиление регенераторной способности периферических нервных волокон, с одной стороны, за счет активации процессов внутриклеточной и клеточной репаративной регенерации структур поврежденного нерва, проявлявшейся в улучшении функции микроциркуляторного русла, усилении пролиферации швановских клеток, ускорении роста осевых цилиндров, и, с другой стороны, за счет некоторого угнетения пролиферативной способности соединительной ткани, что выражалось в уменьшении размеров соединительнотканного рубца.

Ultra-structural characteristics of a damaged peripheral nerve under the transplantation of the embryonic nervous tissue

Tymbalyuk V.I., Nosov A.T., Bayun Yu.V.,
Luzan B.N., Vaslovych V.V.

An ultra-structural study was performed on researching the influence of TENT on regeneration of the damaged peripheral nerve in rats. The electronic and microscopical studies showed the intensification of the regeneration ability of peripheral nerve fibers due to activation of processes of intracellular and cellular reparation regeneration of the damaged nerve structures, demonstrated by the improved functions of the micro-circulation channel, intensification of proliferation processes of Shvann cells, acceleration of growth of pivotal cylinders on the one hand; and due to some oppression of the proliferation ability of the conjunctive tissue, which is demonstrated by decrease of sizes of the conjunctive tissue cicatrices, on the other hand.

КОМЕНТАР

до статті В.І.Цимбалюка, А.Т.Носова, Ю.В.Баюна, Б.М.Лузана, В.В.Васлович "Ультраструктурна характеристика ушкодженого периферичного нерва при трансплантації ембріональної нервової тканини"

Останнім часом колектив 5-ї клініки Інституту нейрохірургії ім.акад.Ромоданова АМН України під керівництвом проф. В.І.Цимбалюка виконує великий обсяг робіт у галузі трансплантації ембріональної нервової тканини. Ознайомившись із статтею, що ґрунтується на одержаному колективом матеріалі, я досить уважно вивчив її назву та порушену авторами проблематику. Насамперед хотів переконатися в обґрунтованості даних електронної мікроскопії, що цікавило мене як фахівця-морфолога.

Доцільність застосування ТЕНТ широко дискутується як у вітчизняних наукових медичних джерелах, так і в зарубіжних, особливо російських. Ставлення науковців до даного методу є діаметрально протилежним. І вагомим аргументом у цій дискусії насамперед, безумовно, мають бути дані про ефективність методу, підтверджені в морфологічних і електрофізіологічних дослідженнях.

У пропонуваній увазі читачів журналу статті для переконливості аргументів на користь ТЕНТ авторам слід було б подати дещо більший обсяг матеріалу, який би повніше характеризував переваги методу перед іншими. Крім того, варто було б приділити більше уваги описові тих змін, які відбуваються з нейротрансплантатом у ділянці нервового шва. У зв'язку з великою кількістю опонентів згаданої методики вважаю за необхідне поради-ти авторам значно ширше висвітлювати власні експериментальні (і клінічні!) досягнення в перспективі, якщо така передбачається. Це буде сприяти формуванню об'єктивної думки про запропонований авторами метод.

З позитивних моментів можу відзначити вичерпну та обґрунтовану морфологічну ультраструктурну характеристику нерва, що дає підстави повірити в доцільність застосування ТЕНТ.

*Професор Ю.Б.Чайковський
Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця*