

Оригінальні статті

УДК 616.833.58-089.844-092.9

Цимбалюк В.І.¹, Третяк І.Б.¹, Гацький О.О.¹, Вернигородський С.В.²

¹Відділення відновної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

²Кафедра патологічної анатомії та судової медицини з курсом основ права, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Вінниця, Україна

Гістоморфометрична оцінка ефективності комбінованої пластики сідничного нерва при його великому дефекті у щурів в експерименті

Вступ. Метою експериментального дослідження була гістоморфометрична оцінка ефективності комбінованої пластики в цілому та порівняння ефективності варіантів комбінованої пластики сідничного нерва (СН) при його великому дефекті у щурів в експерименті.

Матеріали і методи. З метою оцінки стану нейрофібрил використовували імпрегнацію сріблом за Більшовським–Грос, для ідентифікації мієлінових волокон – фарбування за Шпільмейєром.

Висновки. 1. Результати морфометричного дослідження СН при заміщенні його дефекту з використанням методів комбінованої пластики наближаються до результатів, отриманих при заміщенні дефекту СН з використанням «золотого стандарту» відновної хірургії периферійних нервів (ПН) при їх дефектах — методу аутонейропластики. 2. Використання тубажу СН щура за допомогою трубчастого протеза, заповненого гелевим композитом Neurogel™, насиченого фактором росту нервів NGF-В щура, забезпечує найвищий ступінь мієлінізації аксонів, на 60-ту добу експерименту кількість мієлінізованих аксонів на 47% більша, ніж у тварин, в яких з метою заміщення дефекту СН використовували аутонейропластику – «золотий стандарт».

Ключові слова: гістоморфометричне дослідження, ступінь мієлінізації, щільність розташування аксонів, аутонейропластика, тубаж, комбінована пластика, великий дефект нерва, сідничний нерв, експеримент.

Український нейрохірургічний журнал. — 2013. — №1. — С. 32–39.

Надійшла до редакції 24.01.13, Прийнята до публікації 06.03.13

Адреса для листування: Гацький Олександр Олександрович, Відділення відновної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова, вул. Платона Майбороди, 32, Київ, Україна, 04050, e-mail: drgatskiy@mail.ru

Вступ. Процеси регенерації пошкодженого периферичного нерва (ПН) інтенсивно вивчають протягом останніх років [1].

Значний негативний вплив травми ПН на якість життя людини, підвищення медичних та соціальних вимог до рівня медичної допомоги зумовило появу великої кількості оперативних методик для з'єднання кінців ураженого нерва [2]. Найбільш поширені наступні: формування анастомозу кінець у кінець з використанням епіневального шва, який накладають за умови наближення відрізків нерва без «натягу» з мінімальним діастазом 1 мм, та пластика ПН з застосуванням аутологічного трансплантата, яку виконують за неможливості усунути діастаз між відрізками ушкоджених нервів [3].

Результати аутотрансплантації залежать від розміру діастазу між кінцями ушкодженого ПН, а, відповідно, довжини трансплантата [4]. За даними літератури, «критичним» вважають діастаз від 4 до 15 см [5].

Ще у 1881 р. запропоновано альтернативну методику для усунення дефекту ПН - це техніка тубажу [6]. Тубаж нерва (англ. – entubulation) – це хірургічна методика, що передбачає з'єднання дистального та проксимального кінців ушкодженого ПН шляхом їх вміщення та фіксації в трубчастій протезі з збереженням діастазу між кінцями нерва [5].

Для покращення процесів регенерації ушкодженого нерва порожнину трубчастого протеза заповнюють як синтетичними матеріалами різної хімічної структури, так і біологічними субстанціями, субстратами та клітинами, формуючи всередині протеза унікальне мікрооточення, що сприяє процесам регенерації ушкодженого нерва [5]. Це методика комбінованої пластики.

Для вивчення процесів регенерації ПН в експерименті розроблені численні експериментальні моделі [1]. Використання СН щура як об'єкту дослідження найбільш прийнятне [7, 8], що зумовлене, зокрема, доступністю великої кількості тварин з однаковим генотипом, високим регенераторним потенціалом нерва, що відповідає такому у приматів, тощо [8].

Регенерацію ПН в експерименті оцінюють за допомогою трьох основних методів: електрофізіологічного, гістоморфометричного та різних функціональних тестів [7, 9]. Вважають, що всі зазначені методи оцінки регенерації потужно корелюють один з одним, проте, дані кількісних методів (електрофізіологічного та гістоморфометричного) не завжди корелюють з даними, за якими оцінюють рівень функціонального відновлення, тобто, якісної оцінки регенерації [7, 9]. Результати клінічних спостережень та експериментальних досліджень підтверджують це [10, 11]. Наприклад, високий ступінь мієлінізації та велика

кількість аксонів, за даними гістоморфометрії [10, 11], чи максимальна сила скорочення м'яза-ефектора, за даними електрофізіологічного методу [12] не завжди забезпечують адекватну та якісну функцію ходьби, що, в насамперед, пов'язане з процесами неселективної реіннервації м'яза-ефектора [13] та, відповідно, десинхронізацією між центральним та периферійним компонентами локомоції [7].

Таким чином, від вибору методу об'єктивізації регенераторних процесів залежить загальний успіх експерименту, тому поєднання електрофізіологічного та морфологічного методів з методами оцінки відновлення функції є оптимальним.

Метою експериментального дослідження є гістоморфометрична оцінка ефективності комбінованої пластики в цілому та порівняння ефективності варіантів комбінованої пластики СН при його великому дефекті у щурів та експерименті.

Матеріали та методи дослідження. Робота проведена на 60 білих безпородних щурах — самцях масою тіла (200 ± 25) г. Тварини розподілені на 12 груп: 6 груп контролю по 5 тварин у кожній (відповідно групи 1–2, 3–4, 5–6) та 6 експериментальних груп по 5 тварин у кожній (відповідно групи 7–8, 9–10, 11–12).

Оперативне втручання виконували у стерильних умовах під перитонеальним наркозом сумішшю каліпсола та седазину на ізотонічному розчині натрію хлориду. Дози препаратів становили відповідно 5 мг/100г і 2 мг/100г. Доступ виконували в середньо-верхній третині лівого стегна за проекцією СН. Після оброблення операційного поля розсікали м'які тканини, тупо, за допомогою затискача типу «москіт» виділяли СН (**рис. 1А**). В середній третині лівого стегна на відстані ($20 \pm 1,5$) мм від точки виходу СН з порожнини малого таза, яку вимірювали за допомогою лінійки, його пересікали лезом безпечної бритви та висікали ділянку довжиною (10 ± 2) мм, формуючи дефект (**рис. 1Б**). Інтраопераційно підтверджували неможливість самовільного зближення кінців нерва навіть в положенні максимального згинання кінцівки в колінному суглобі.

В групах 1 і 2 формували дефект СН. В групах контролю 3 і 4 після перерізування СН накладали мікрохірургічні епіпериневральні шви (3–6) до задовільного зіставлення пучків (**рис. 1В**). В групах 5 і 6 після формування дефекту СН здійснювали аутонейропластику з використанням «вставки» з попередньо висіченого СН довжиною (10 ± 2) мм. На обидва кінці «вставки» та СН накладали мікрохірургічні епіпериневральні шви (3–6) до задовільного зіставлення пучків (**рис. 1Г**). В групах 3–6 шви накладали за допомогою атравматичної голки з монофіламентною поліамідною ниткою 10/0 фірми Ethicon®. Операцію виконували з використанням операційного мікроскопа при збільшенні $\times 12$. В усіх групах контролю після здійснення гемостазу рану ретельно зашивали.

В експериментальних групах тварин 7–12 для проведення тубажу як трубчастий протез використовували порожню трубку з поліхлорвінілу, дозволеного для медичного застосування, стерилізовану гамма-промінням та упаковану в індивідуальний поліетиленовий контейнер за стандартною методикою. Довжина трубки (10 ± 2) мм, внутрішній просвіт 2 мм, товщина стінки ($0,5 \pm 0,05$) мм. Для здійснення комбінованої ксеноп-

ластики порожнину трубчастого протеза попередньо щільно заповнювали стерильним дегідратованим (для забезпечення умов максимальної гідрофільності) гелевим композитом Neurogel™ – високогідрофільний полі[N-(2-гідроксипропіл)метакриламід] (PHРМА) [14], за допомогою шпателя, загальним об'ємом до 31 мм^3 – групи 9 і 10. В групах 11-12 попередньо дегідратований стерильний Neurogel™ насичували розчином, що містив фактор росту нервів NGF-В щурів в дозі 80 пг/кг. В усіх експериментальних групах після формування дефекту СН за наведеною методикою проксимальний та дистальний кінці нерва вводили в порожнину трубчастого протеза на глибину до 0,5 мм та фіксували до його стінок шляхом накладання епіневральних швів з 4 боків атравматичною голкою з монофіламентною поліамідною ниткою 10/0 фірми Ethicon® (**рис. 1Д, 1Е**). Фасцикули проксимального та дистального кінців нерва просторово орієнтували в порожнині трубчастого протеза так, щоб максимально виключити процеси гетеротопної реіннервації. Операцію виконували з використанням операційного мікроскопа при збільшенні $\times 12$. Після здійснення гемостазу рану ретельно зашивали.

Після оперативного втручання усім тваринам внутрішньом'язово одноразово вводили антибактеріальний препарат цефтріаксон в дозі 20 мг/кг. Тварини контрольних та експериментальних груп отримували однакове харчування згідно норм віварію.

Для проведення морфометричного дослідження після наркотизації тварини за зазначеною методикою за допомогою мікрохірургічних інструментів виділяли СН від місця виходу з малого таза до місця розподілу на гілки на оперованому стегні через 30 (групи 3, 5, 7, 9, 11) та 60 (групи 4, 6, 8, 10, 12) діб після операції.

В групах 1–2, при формуванні дефекту СН без подальшого відновлення його цілісності гістоморфометричне дослідження не проводили. В групах 3 і 4 для морфометричного дослідження використовували ділянку СН довжиною 5 мм дистальніше зони мікрохірургічного зшивання; в групах 5 і 6 — ділянку СН довжиною 5 мм дистальніше зони мікрохірургічного зшивання з аутогранулянтатом; в групах 7–12 — ділянку СН довжиною 5 мм дистальніше зони мікрохірургічного зшивання з трубкою з поліхлорвінілу.

Відібрані матеріали обробляли за стандартною методикою: фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну протягом 24–48 год, заливали в парафін [14].

Для оцінки морфологічних змін гістологічні зрізи СН товщиною 5–7 мкм виготовляли за допомогою автоматичного мікромому НМ 360 (Carl Zeiss Jena GmbH, Німеччина). З метою оцінки стану нейрофібрил використовували імпрегнацію сріблом за Більшовським-Грос, для ідентифікації мієлінових волокон — за Шпільмейєром [15,16]. Для морфометричного дослідження відбирали зрізи, товщина яких після фарбування та фіксації при визначенні найвищої та найнижчої точки зрізу при збільшенні $\times 100$ відрізнялася не більше ніж на 0,2 мкм.

Мікроскопію і фотографування гістологічних препаратів здійснювали за допомогою світлового мікроскопа Olimpus ВХ 41 при збільшенні $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$ і $\times 400$. Отримували і обробляли знімки, проводили морфометрію та статистичну обробку з

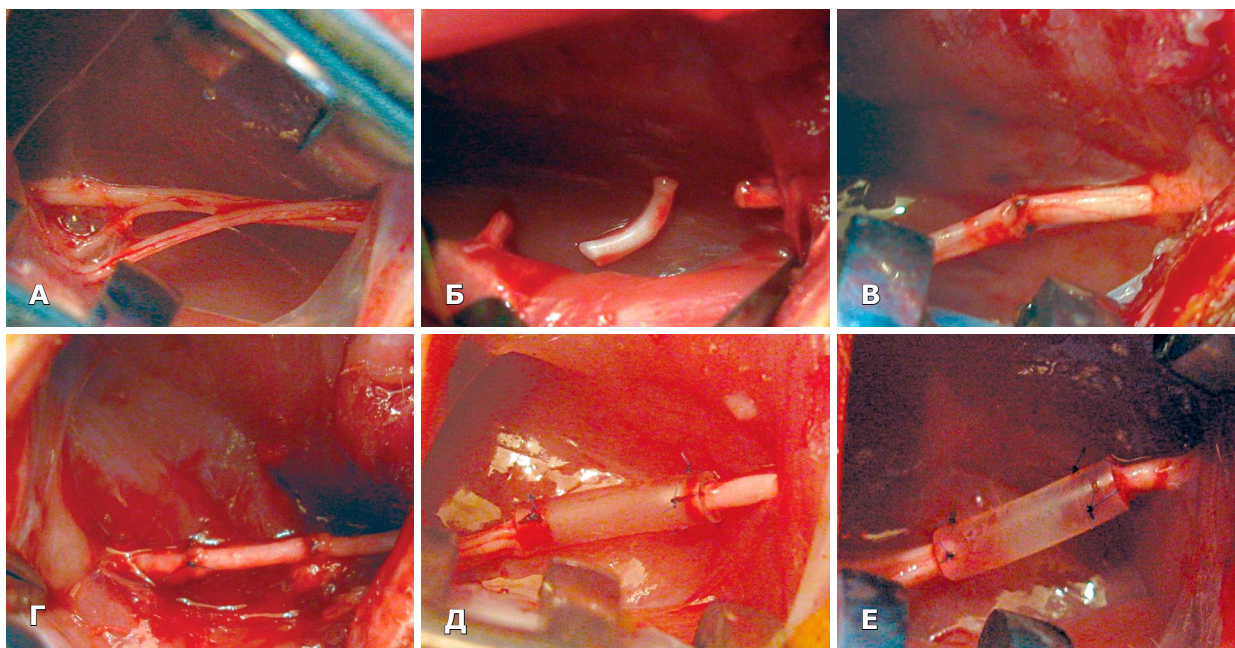


Рис. 1*. Мікрохірургічні методи, використані для відновлення функції СН у щурів: А – загальний вигляд СН; Б – формування дефекту СН; В – шов СН; Г – аутонейропластика СН; Д – тубаж СН з використанням порожнього трубчастого протеза; Е – тубаж СН з застосуванням трубчастого протеза заповненого гелевим композитом Neurogel™.

використанням «Quick PHOTO MICRO 2.3». Середню щільність розташування нервових волокон в 1 мм^2 визначали у 5 ділянках площею $0,49 \text{ мм}^2$ для кожного зрізу.

Цифровий матеріал обробляли з застосуванням комп'ютерної програми "Excel" з пакету "Microsoft Office 2003". Достовірність різниці одержаних морфометричних показників в групах тварин визначали за допомогою U-тесту Mann – Whitney.

Результати та їх обговорення. У 4 (6,6%) тварин спостерігали формування контрактури над'яtkово-гомількового суглоба ураженої кінцівки, тварини під час ходьби використовували внутрішньо-медіальну частину лівої стопи, 2 (3,3%) тварини з груп 1 і 2, 1 (1,6%) – з групи 3, 1 (1,6%) – з групи 11. У 3 (5%) тварин, в тому числі 2 (3,3%) – з групи 1, 1 (1,6%) – з групи 2 спостерігали виражені трофічні зміни на п'ятці ураженої кінцівки. Протягом 30 та 60 діб експерименту ампутації фаланг, пальців чи частини стопи не було.

В групі 3 на 30-ту добу після мікрохірургічного зшивання СН щільність розташування аксонів (N_A) у його дистальній частині становила $4960 \pm 208,80$ на 1 мм^2 ; на 60-ту добу в групі 4 – $5200 \pm 184,39$ на 1 мм^2 (**табл.**). Достовірне збільшення щільності розташування аксонів в дистальній частині СН, тобто кількості аксонів, що регенерували після його мікрохірургічного зшивання, не спостерігали ($U_{\text{емп}} N_A = 9,5, P < 0,05$).

В групі 5 на 30-ту добу після заміщення дефекту СН з використанням методу аутонейропластики N_A у його дистальній частині становила $5180 \pm 239,58$ на 1 мм^2 ; на 60-ту добу N_A в групі 6 – 5360 ± 140 на 1 мм^2 (**див. табл.**). Достовірне збільшення щільності розташування аксонів в дистальній частині СН, тобто, кількості аксонів, що регенерували після

заміщення його дефекту з використанням методу аутонейропластики, не спостерігали ($U_{\text{емп}} N_A = 9,0, P < 0,05$).

В групі 7 на 30-ту добу після тубажу дефекту СН з застосуванням порожнього трубчастого протеза N_A у його дистальній частині становила $2580 \pm 300,66$ на 1 мм^2 ; на 60-ту добу в групі 8 – $2740 \pm 250,19$ на 1 мм^2 (**див. табл.**). Достовірне збільшення щільності розташування аксонів в дистальній частині СН, тобто, кількості аксонів, що регенерували після тубажу його дефекту з застосуванням порожнього трубчастого протеза, не спостерігали ($U_{\text{емп}} N_A = 4,0, P < 0,05$).

В групі 9 на 30-ту добу після тубажу дефекту СН з використанням трубчастого протеза, заповненого гелевим композитом Neurogel™, N_A у його дистальній частині становила $4600 \pm 258,84$ на 1 мм^2 ; на 60-ту

Щільність розташування аксонів у дистальному відрізку СН на 1 мм^2 через 30 та 60 діб після проведення реконструкції дефекту СН з використанням різних мікрохірургічних методик

Група	Мікрохірургічна методика	Щільність розташування аксонів (N_A) на $1 \text{ мм}^2 \pm \delta$
3	Мікрохірургічний шов СН	$4960 \pm 208,80$
4		$5200 \pm 184,39$
5	Аутонейропластика СН	$5180 \pm 239,58$
6		$5360 \pm 140,00$
7	Тубаж СН порожнім ТП	$2580 \pm 300,66$
8		$2740 \pm 250,19$
9	Тубаж СН + Neurogel™	$4600 \pm 258,84$
10		$4920 \pm 178,88$
11	Тубаж СН + Neurogel™ + NGF-B	$5120 \pm 156,20$
12		$5340 \pm 150,33$

* Зображення в друкованій версії – у відтінках сірого, в електронній – кольорове.

добу в групі 10 — $4920 \pm 178,88$ на 1 мм^2 (див. табл.). Достовірне збільшення щільності розташування аксонів в дистальній частині СН, тобто, кількості аксонів, що регенерували, після тубажу його дефекту з використанням трубчастого протеза, заповненого гелевим композитом Neurogel™, не спостерігали ($U_{\text{емп}} N_A = 5,0$, ($P < 0,05$)).

В групі 11 на 30-ту добу після тубажу дефекту СН з застосуванням трубчастого протеза, заповненого гелевим композитом Neurogel™, насиченим фактором росту нервів NGF-B щура (в дозі 80 пг/кг), N_A у його дистальній частині становила $5120 \pm 156,20$ на 1 мм^2 ; на 60-ту добу в групі 12 — $5340 \pm 150,33$ на 1 мм^2 (див. табл.). Достовірне збільшення щільності розташування аксонів у дистальній частині СН, тобто, кількості аксонів, що регенерували після тубажу його дефекту з застосуванням трубчастого протеза, заповненого гелевим композитом Neurogel™, насиченим фактором росту нервів NGF-B щура (в дозі 80 пг/кг), не спостерігали ($U_{\text{емп}} N_A = 7,5$, ($P < 0,05$)).

Показники N_A після мікрохірургічного зшивання та заміщення дефекту СН методом аутонейропластики достовірно не відрізнялися як на 30-ту, так і на 60-ту добу експерименту (відповідно $U_{\text{емп}} N_A = 7,5$, $P < 0,05$ та $U_{\text{емп}} N_A = 7,5$, $P < 0,05$) (рис. 2).

При зіставленні N_A в групах 5–6 та 7–8, можна стверджувати, що на 30-ту добу експерименту N_A достовірно більша у тварин, у яких дефект СН заміщували з використанням методу аутонейропластики, ніж при заміщенні дефекту СН з застосуванням тубажу порожнім трубчастим протезом (відповідно $U_{\text{емп}} N_A = 0$, $P < 0,05$ та $N_A = 0$, $P < 0,05$), тобто, аутонейропластика забезпечує достовірне відновлення більшої кількості аксонів, ніж тубаж з використанням порожнього трубчастого протеза, та не залежить від строків регенерації.

При зіставленні N_A в групах 5–6 та 9–10 на 30-ту добу експерименту N_A достовірно більша в групі 5, ніж в групі 9 ($U_{\text{емп}} N_A = 0$, $P < 0,05$). На 60-ту добу N_A в групі 6 достовірно не відрізнялася від такої в групі 10 ($U_{\text{емп}} N_A = 2,5$, $P < 0,05$), що свідчило про регенерацію відповідної кількості аксонів. Тобто, трубчастий протез, заповнений гелевим композитом Neurogel™,

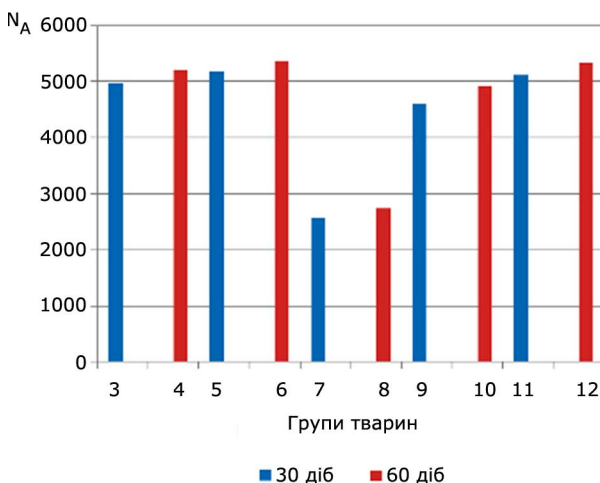


Рис. 2*. Щільність розташування аксонів у дистальному відрізку СН на 1 мм^2 через 30 і 60 діб після реконструкції дефекту СН з використанням різних мікрохірургічних методів.

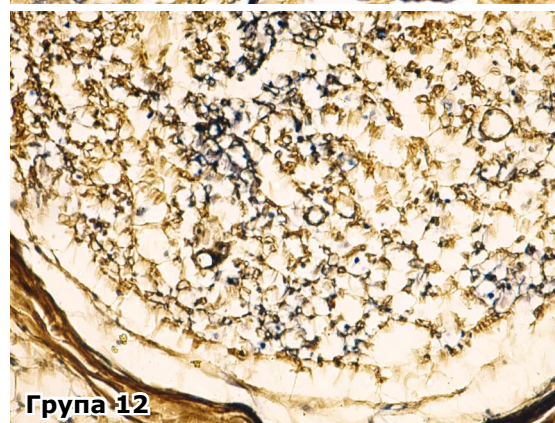
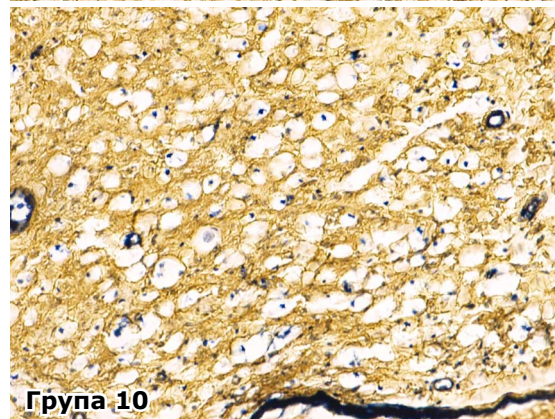
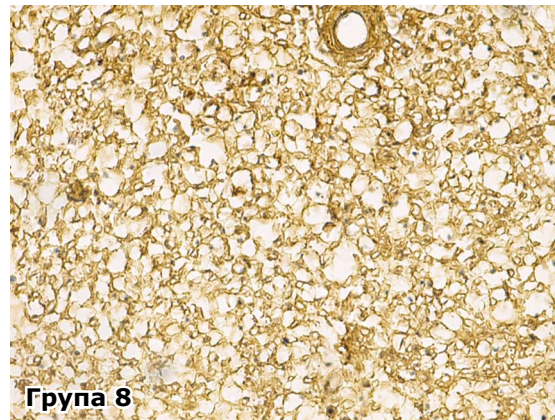
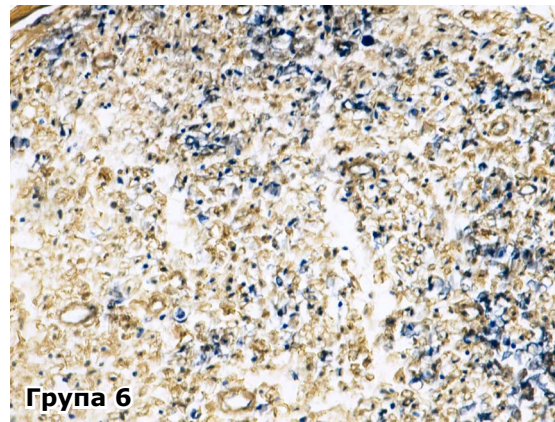


Рис. 3*. Мієлінізація осевих циліндрів при використанні аутонейропластики (група 6), тубажу дефекту СН з використанням порожнього трубчастого протеза (група 8) та варіантами комбінованої пластики (групи 10 і 12) на 60-ту добу експерименту. Забарвлення за Шпільмейером. 36×200 та $\times 400$.

використаний з метою заміщення дефекту СН, має відповідний аутонейропластиці регенераторний потенціал.

При зіставленні N_A в групах **5–6** та **11–12** можна стверджувати, що на 30-ту та 60-ту добу експерименту N_A достовірно не відрізнявся (відповідно $U_{\text{емп}} N_A = 12,5$, $P < 0,05$ та $U_{\text{емп}} N_A = 12,5$, $P < 0,05$). Таким чином, можна стверджувати, що метод тубажу дефекту СН з використанням трубчастого протеза, заповненого гелевим композитом Neurogel™, насиченого фактором росту нервів NGF-В щура (в дозі 80 пг/кг), має регенераторний потенціал аутонейропластики, аналогічний такому, що не залежить від строків регенерації.

Не менш важливим показником, що характеризує регенераторний потенціал різних варіантів комбінованої пластики, є ступінь мієлінізації аксонів, що регенерували. Оскільки процес ремієлінізації розтягнутий у часі, а процеси відновлення кількості аксонів відбуваються паралельно, проте, не одночасно з процесами їх мієлінізації, ступінь мієлінізації аксонів, які регенерували, визначали лише на 60-ту добу експерименту.

В групі **12** спостерігали більш високий ступінь мієлінізації волокон (86%), ніж в групах **8** і **10**, в яких кількість мієлінізованих волокон становила відповідно 46 та 73% (рис. 3).

Висновки

1. При здійсненні тубажу з використанням порожнього трубчастого протеза з метою заміщення дефекту СН ступінь мієлінізації аксонів, що регенерували, був найменшим з усіх груп тварин та не залежав від строків регенерації.

2. Результати морфометричного дослідження СН при заміщенні його дефекту з використанням методів комбінованої пластики аналогічні результатам, отриманим при заміщенні дефекту СН з використанням «золотого стандарту» відновної хірургії ПН при їх дефектах — методу аутонейропластики, тобто, варіанти комбінованої пластики мають відповідний аутонейропластиці регенераторний потенціал.

3. Тубаж СН з використанням трубчастого протеза, заповненого гелевим композитом Neurogel™, насиченого фактором росту нервів NGF-В щура (в дозі 80 пг/кг), забезпечує найвищий ступінь мієлінізації аксонів, що регенерували. Так, на 60-ту добу експерименту кількість мієлінізованих аксонів на 47% більший, ніж в групі тварин, у яких з метою заміщення дефекту СН використовували аутонейропластику — «золотий стандарт».

Список літератури

1. Sarikcioglu L. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat / L. Sarikcioglu, B.M. Demirel, A. Utuk // *Folia Morphol.* — 2009. — V. 68, 1. — P.1–7.
2. Цымбалюк В.И. Хирургическое лечение поврежденных периферических нервов при больших дефектах/ В.И. Цымбалюк, А.Т. Сташкевич // *Врачеб. дело.* — 1987. — №6. — С.47
3. Григорович К.А. Хирургическое лечение поврежденных нервов / К.Л. Григорович. — Л.: Медицина, 1981. — 301 с.
4. Хирургічне лікування ушкоджень плечового сплетення / В.І. Цимбалюк, Г.В. Гайко, М.М. Сулій, С.С. Страфун. — Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. — 211 с.
5. de Olivera A.R.L. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique / A.R.L. de Olivera, A. Pierucci, K. de Brito Pereira // *Braz. J. Morphol. Sci.* — 2004. — V. 21, N4. — P. 225–231.
6. Ijpm F. F. A. The early history of tubulation in nerve repair/ F. F. A. Ijpm, R. C. Van De Graaf, M. F. J. Meek // *Hand Surg. (Eur. V.)*. — 2008. — V.33. — P.581–586.
7. Dellon A.L. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration / A.L. Dellon, S.E. Mackinnon // *Ann. Plast. Surg.* — 1989. — V. 23. — P.197–202.
8. Mackinnon S.E. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat/ S.E. Mackinnon, A.R. Hudson, D.A. Hunter // *Plast. Reconstr. Surg.* — 1985. — V.75. — P.384–388.
9. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration / C.A. Munro, J.P. Szalai, S.E. Mackinnon, R. Midha // *Muscle Nerve.* — 1998. — V.21. — P.1095–1097.
10. Kanaya F. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration / F. Kanaya, J.C. Firrell, W.C Breidenbach // *Plast. Reconstr. Surg.* — 1996. — V.98. — P.1264–1271 (discus. 1272–1274).
11. Mackinnon S.E. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model / S.E. Mackinnon, A.L. Dellon, J.P. O'Brien // *Muscle Nerve.* — 1991. — V.14. — P.1116–1122.
12. Rat walking tracks do not reflect maximal muscle force capacity./ M.S. Urbanchek, K.C. Chung, H. Asato [et al.] // *J. Reconstr. Microsurg.* — 1999. — V.15. — P.143–149.
13. Gramsbergen A. Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervation of hindleg muscles / A. Gramsbergen, M.F. Meek // *Exp. Neurol.* — 2000. — V.161. — P.183–193.
14. Грабовий О.М. Ізопропанол-целоїдин-парафіновий метод заливки матеріалу для гістологічних досліджень / О.М. Грабовий, М.В. Проша // *Укр. журн. мед. техніки та технології.* — 1994. — №1–2. — С.34–36.
15. Автандилов Г.Г. Основы патологоанатомической практики: руководство / Г.Г. Автандилов — М.: Рос. мед. акад. последиплом. образования, 2007. — 480 с.
16. Сапожников А.Г. Гистологическая и микроскопическая техника: руководство / А.Г. Сапожников, А.Е. Доросевич. — Смоленск: САУ, 2000. — 476 с.

Цымбалюк В.И.¹, Третяк И.Б.¹, Гацкий А.А.¹, Вернигородский С.В.²

¹ Отделение восстановительной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

² Кафедра патологической анатомии и судебной медицины с курсом основ права, Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И.Пирогова, Винница, Украина

Гистоморфометрическая оценка эффективности комбинированной пластики седалищного нерва при его большом дефекте у крыс в эксперименте

Введение. Целью исследования была гистоморфометрическая оценка эффективности методов комбинированной пластики при замещении большого дефекта седалищного нерва у крыс в эксперименте.

Материалы и методы. Для оценки состояния нейрофибрилл использовали импрегнацию серебром по Бильшовскому–Грос, для идентификации миелиновых оболочек – окраску по Шпильмайеру.

Выводы. 1. Результаты морфометрического исследования седалищного нерва при замещении его дефекта с использованием методов комбинированной пластики приближаются к результатам, полученным при замещении дефекта седалищного нерва с применением метода аутонейропластики – «золотого стандарта» в восстановительной хирургии периферических нервов при их дефектах. 2. Тубаж седалищного нерва с использованием трубчатого протеза, заполненного гелевым композитом Neurogel™, насыщенным фактором роста нервов NGF-B крыс, обеспечивает наивысшую степень миелинизации аксонов, на 60-е сутки эксперимента количество миелинизированных аксонов на 47% больше, чем в группе животных, у которых в целях замещения дефекта седалищного нерва использовали аутонейропластику – «золотой стандарт».

Ключевые слова: гистоморфометрическое исследование, степень миелинизации, плотность расположения аксонов, аутонейропластика, тубаж, комбинированная пластика, большой дефект нерва, седалищный нерв, эксперимент.

Поступила в редакцию 24.01.13. Принята к публикации 06.03.13.

Адрес для переписки: Гацкий Александр Александрович, Отделение восстановительной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова, ул. Платона Майбороды, 32, Киев, Украина, 04050, e-mail: drgatskiy@mail.ru

Tsymbalyuk V.I.¹, Tretyak I.B.¹, Gatskiy A.A.¹, Vernigorodskiy S.V.²

¹ Restorative Neurosurgery Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov, NAMS Ukraine, Kiev, Ukraine

² Department of pathologic anatomy, forensic medicine and course of basics of medical law, National Medical University named after N.I.Pirogov, Vinnitsa, Ukraine

Morphometric evaluation of efficacy of modified nerve guidance tubes at bridging large rat sciatic nerve gap: experimental study

Introduction. The primary goal of this experimental study was to evaluate the efficacy of modified nerve guidance tubes and to compare the efficacy of different modifications of intraluminal space of nerve guidance tubes at bridging large rat sciatic nerve gap.

Materials and methods. To quantify status of neural fibres we utilized silver impregnation by Bilshovskiy–Gross, to identify myelin sheaths – samples were stained by Spielmeyer.

Conclusions. 1. Level of myelination of axons after bridging the gap with hollow guidance tube was the lowest among all other groups of animals and did not depend on regeneration terms. 2. Bridging the gap with different types of modified nerve guidance tubes allowed us to obtain morphometric results reliably equal to “gold standard” of reconstructive surgery – autologous nerve grafting technique.

Key words: morphometric evaluation, myelination level, axon density, autologous nerve grafting, tubulization, modified nerve guidance tubes, large nerve gap, sciatic nerve, experiment.

Received, January 24, 2013. Accepted, March 06, 2013.

Address for correspondence: Alexander Gatskiy, Restorative Neurosurgery Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P.Romodanov, 32, Platona Mayborody St., Kiev, Ukraine, 04050, e-mail: drgatskiy@mail.ru

Комментарий

к статье Цымбалюка В.И. и соавторов «Гистоморфометрическая оценка эффективности комбинированной пластики седалищного нерва при его большом дефекте у крыс в эксперименте»

Травма нервов – частая патология мирного и военного времени, ей всегда уделялось большое внимание. Благодаря внедрению в нейрохирургическую практику в последнее десятилетие новых методов диагностики, микрохирургического метода, многие вопросы тактики, хирургических подходов, наложения шва нерва, пластики, невротизации являются предметом постоянного обсуждения, в их решении достигнута определенная ясность. Наряду с этим, существуют вопросы, требующие дальнейшего развития и совершенствования. Одним из таких вопросов является устранение большого дефекта нервного ствола. Этой проблеме посвящена статья. В настоящее время существует большое число методик устранения диастаза.

Одним из новейших методов устранения диастаза является нейротрансплантация эмбриональной ткани в зону дефекта при хирургическом восстановлении пораженного нерва [1–3]. Перспективным направлением является трансплантация в зону между отрезками нерва стволовых клеток [4]. Новый подход к регенерации нерва при большом диастазе предусматривает использование направляющего нервного канала в виде трубки вокруг пучка нерва. Направляющий канал выполняет функцию искусственного перинеурия, отделяющего фиброзную ткань от регенерирующего аксона, до восстановления непрерывности перинеурия. В качестве такого искусственного нервного канала часто используют трубки из силикона, коллагена, ламинина, фибропектина, альгината [5, 6], заполненные коллагеновым и фибриновым гелем [7–10], специальным пористым рассасывающимся сополимером коллагена и гликозаминогликана (Сг) [11], которые являются аналогами невритостимулирующей внеклеточной матрицы и улучшают регенерацию периферического нерва.

В последние годы для улучшения регенерации нервных волокон используют трубки из биорассасывающихся материалов.

Изучена регенерация срединного нерва взрослых приматов как после сшивания его отрезков с применением микрохирургического шва, так и тубулизации с использованием биорассасывающегося полигликольнокислотного устройства. Эти два метода сравнивали по результатам электрофизиологических и гистологических исследований, проведенных через 6 и 12 мес. Анализ показал отсутствие достоверных различий этих методов восстановления. Эти оценки доказывают, что тубулизационная восстановительная техника не уступает по эффективности технике микрохирургического сшивания нерва [12–15]. В настоящее время в эксперименте испытано большое число рассасывающихся трубчатых устройств, изготовленных из полигликолевой кислоты [8, 9], неорганического стеклообразного полимера [17], синтетических вискополимеров и биологического коллагена [5, 6, 16, 17]. Для улучшения регенерации аксонов биоискусственные трубчатые нервные трансплантаты заполняют рассасывающимся Сг-

сополимером, гиалуроново́й кислотой, популяцией нейролеммоцитов. Предложена конструкция, в которой выровненные полимерные волокна представляют рельефные стимуляторы, облегчающие регенерацию периферических нервов при большом диастазе нерва [10]. Мнение о том, что регенерация улучшается, если периферическую матрицу, заполняющую трубчатый трансплантат, выровнять по оси трубки, высказано в более ранних работах [18, 19]. Для этих целей можно использовать магнитные поля [20]. Показано, что действие сильных магнитных полей (4,7, 9,4 Т) во время создания фибрилл выравнивает растущие волокна коллагена, и таким образом, можно создавать выровненные гели коллагена. Трубчатый коллагеновый трансплантат, заполненный таким гелем, по данным гистологических и иммуногистохимических исследований, обеспечивает хорошую регенерацию при диастазе седалищного нерва мыши длиной 6 мм [21, 22]. К сожалению, все приведенные методики испытаны в эксперименте на животных, а в клинике выполнены единичные операции.

С учетом изложенного представленная работа является современной и актуальной. На достаточном экспериментальном материале (60 крыс) авторы доказали с использованием гистоморфометрического метода, что количество миелинизированных аксонов на поперечном срезе периферического отрезка седалищного нерва было наибольшим в группе животных, у которых применяли трубчатый протез, заполненный Neurogel с добавлением фактора роста. Это в полной мере соответствует данным исследований зарубежных авторов.

Следует отметить чисто терминологическое замечание: в работе слова «тубаж» и «трубчатый протез» использованы как синонимы. Тубаж – это окутывание нерва в области наложенного шва различными тканями и материалами для защиты места сшивания от рубцовой ткани. Такой метод в данной работе не использовали.

Указанное замечание не умаляет значения работы.

Список литературы

1. Вплив трансплантації ембріональної нервової тканини на регенерацію периферичних нервів / В. І. Цимбалюк, М. М. Сулій, Б. М. Лузан [та ін.] // Бюл. Укр. асоц. нейрохірургів. — 1998. — № 7. — С. 17–21.
2. Изменения в иммунной системе экспериментальных животных при использовании эмбриональной нервной ткани для восстановления целостности периферического нерва в условиях иммуносупрессии / В. А. Руденко, Н. И. Лисяный, В. И. Цимбалюк, Б. Н. Лузан // Бюл. Укр. асоц. нейрохірургів. — 1998. — № 6. — С. 6–8.
3. Регенерация седалищного нерва крысы после аллотрансплантации в нерв эмбриональной нервной ткани с последующим вытяжением нерва / И. Рагинов, Р. Масгутов, Г. Фомина [и др.] // IV съезд нейрохирургов России: материалы съезда (Москва, 18–22 июня. 2006 г.). — М., 2006. — С. 529–530.
4. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stomal cell – derived inducing activity / H. Kawasaki, K. Mizuseki, S. Nishikawa [et al.] // Neuron. — 2000. — V. 28. — P. 31–40.

5. Meek M. F. Secondary digital nerve repair in the foot with resorbable p(DLLA-epsilon-CL) nerve conduits / M. F. Meek, J. P. Nicolai, P. H. Robinson // J. Reconstr. Microsurg. — 2006. — V. 22, N 3. — P. 149–151.
6. Nerve regeneration through artificial tubular implants (Review) / R. D. Fields, J. M. Le Beau, F. M. Longo [et al.] // Prog. Neurobiol. — 1989. — V. 33. — P. 87–134.
7. Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration / G. R. D. Evans, K. Brandt, S. Katz [et al.] // Biomaterials. — 2002. — V. 23. — P. 841.
8. Toba T. Evaluation of peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap using a polyglycolic acid (PGA)-collagen nerve conduit filled with laminin Soaked collagen sponge in dogs / T. Toba, T. Nakamura, A. K. Lynn [et al.] // Intl. J. Artif. Org. — 2002. — V. 25. — P. 230.
9. Toba T. Regeneration of canine peroneal nerve with the use of a polyglycolic acid-collagen tube filled with laminin-soaked collagen sponge: a comparative study of collagen sponge and collagen fibers as filling materials for nerve conduits / T. Toba, T. Nakamura, Y. Shimizu [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. — 2001. — V. 58. — P. 622.
10. The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps / Young-tae Kim, K. Valerie Haftel, Satish Kumar [et al.] // Biomaterials. — 2008. — V. 29. — P. 3117–3127.
11. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft / L. J. Chamberlain, I. V. Yannas, H. P. Hsu [et al.] // Exp. Neurol. — 1998. — V. 154, N 2. — P. 315–329.
12. A comparison of peripheral nerve repair using an absorbable tubulization device and conventional suture in primates / C. P. Tountas, R. A. Bergman, T. W. Lewis [et al.] // J. Appl. Biomater. — 1993. — V. 4, N 3. — P. 261–268.
13. Meek M. F. US Food and Drug Administration Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves / M. F. Meek, J. H. Coert // Ann. Plast. Surg. — 2008. — V. 60, N 1. — P. 110–115.
14. Schnell E. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/poly-epsilon-caprolactone blend / E. Schnell, K. Klinkhammer, S. Balzer // Biomaterials. — 2007. — V. 28, N 19. — P. 3012–3036.
15. The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves / P. Sierpinski, J. Garrett, J. Ma [et al.] // Biomaterials. — 2008. — V. 29, N 1. — P. 118–128.
16. A tissue-engineered conduit for peripheral nerve repair / T. Hadlock, J. Elisseeff, R. Langer [et al.] // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. — 1998. — V. 124, N 10. — P. 1081–1086.
17. Early peripheral nerve healing in collagen and silicone tube implants: myofibroblasts and the cellular response / L. J. Chamberlain, I. V. Yannas, A. Arrizabalaga [et al.] // Biomaterials. — 1998. — V. 19, N 15. — P. 1393–1403.
18. Letourneau P. C. Axonal growth and guidance / P. C. Letourneau // TINS. — 1983. — V. 11. — P. 451–455.
19. Exogenous matrix precursors promote functional nerve regeneration across a 15-mm gap within a silicone chamber in the rat / L. R. Williams, N. Danielsen, H. Muller [et al.] // J. Comp. Neurol. — 1987. — V. 264. — P. 284–900.
20. Кардаш А. М. Экспериментальное изучение влияния направленного магнитного поля на регенерацию нервов и реиннервацию мышц / А. М. Кардаш // Укр. нейрохирург. журн. — 2001. — № 3. — С. 16–23.
21. Byers J. M. Effect of pulsed electromagnetic stimulation on facial nerve regeneration / J. M. Byers, K. F. Clark, G. C. Thompson // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. — 2005. — V. 124, N 34. — P. 383–389.
22. Dubey N. Guided neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration / N. Dubey, P. C. Letourneau, R. T. Tranquillo // Exp. Neurol. — 1999. — V. 158. — P. 338–350.

*А.М. Кардаш, доктор медицинских наук профессор,
заведующий кафедрой нейрохирургии
Факультета интернатуры и последипломного обучения
Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького*