

*Н. О. Борзих, С. С. Страфун, С. І. Савосько, О. М. Макаренко
ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, Україна
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна*

ОСОБЛИВОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТРАВМОВАНОГО СЕРЕДИННОГО НЕРВА ПРИ АУТОПЛАСТИЦІ ТА ФОРМУВАННІ ДИСТАЛЬНОГО МІЖНЕРВОВОГО АНАСТОМОЗУ

У статті наведено результати експериментальних досліджень по вивченню можливості застосування «захищеного шва» у пластиці дефектів серединного нерва. Експерименти проведено на кролях, яким моделювали дефект серединного нерва і проводили його нейрорафію. Додатково створювали з'єднання між ліктьовим і серединним нервом. Вставкою виступав аутотрансплантат сідничого нерва. Результати гістологічного дослідження дозволили оцінити рівень регенерації у дистальному сегменті травмованого нерва. При нейрорафії серединного нерва регенерували $10,6 \pm 1,4\%$ нервових волокон, а при додатковому створенні «захищеного шва» ступінь відновних процесів досяг $15,1 \pm 1,1\%$ ($p=0,01$). На основі аналізу електрофорезу ДНК, виділеної із дистального сегмента травмованого нерва, молекулярних маркерів загибелі нейролемоцитів (апоптозу і некрозу) не встановлено. Гістологічними дослідженнями також підтверджено стійкість нерва впродовж 30 діб після невротомії. Отримані результати довели, що виконання кабельної пластики між травмованим серединним і інтактним ліктьовим нервом дає можливість покращити регенеративні процеси ушкодженого серединного нерва.

Ключові слова: серединний нерв, травма, пластика.

Пошкодження серединного і ліктьового нервів складають значну частину всіх травм периферичних нервів верхньої кінцівки. Проблема мікрохірургічного відновлення цих нервів далека від вирішення, оскільки не дивлячись на застосування сучасних методик автори зазначають велику кількість незадовільних результатів. Складність вибору адекватних методик при тяжких травматичних ушкодженнях верхньої кінцівки, спірні питання в підходах до мікрохірургічного відновлення, визначають необхідність створення особливої тактики ортопедо-хірургічного відновлення кінцівки. Аналізу закономірностей регенеративних явищ в хірургічно відновленому нерві присвячено значну кількість експериментальних досліджень. Зокрема, на моделі невротомії і зшиванні нерва «кінець в кінець» показано досить високий рівень регенерації нерва і функціонального відновлення нейрон-м'язового апарату [1]. Відтворення діастазу у травмованому нерві показало низьку ймовірність і часто неможливість відновлення нерва. заміщення діастазу трансплантатом дозволило покращити регенерації нерва, якість якого в значній мірі залежав від місцевих посттравматичних структурних змін (запалення, рубець, неспроможність шва) [2]. Наступним завданням стало вирішення проблеми мікрохірургії периферичного нерва при неможливості з'єднання проксимального і

дистального сегмента ушкодженого нерва і нейрорафія дистальної кукси і стовбур сусіднього донорського нерва. Запропоновано гіпотезу згідно якої така мікрохірургічна операція може забезпечити задовільний рівень функціонального відновлення нерва одержувача, без будь-якого погіршення функції донорського нерва [3]. Підтвердження цієї гіпотези стало метою експериментального дослідження.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на кролях-самцях масою 3,8–4,5 кг ($n=4$), що отримувалися у віварії за стандартних умов харчування та добового періоду світла. Тварини були розділені на 4 групи: 1) повна невротомія серединного нерва; 2) повна невротомія серединного нерва з нейрорафією; 3) повна невротомія серединного нерва і створення з'єднання між серединним і ліктьовим нервами дистальніше невротомії серединного нерва; 4) повна невротомія серединного нерва і його нейрорафія з створенням з'єднання між серединним і ліктьовим нервами дистальніше місця нейрорафії серединного нерва. Невротомію нерва здійснювали на рівні середньої третини плечової кістки, а формування анастомозу – між ліктьовим і серединним нервом на рівні середньої третини передпліччя. Схеми

операцій наведено на рисунку 1. Премедикацію тварин здійснювали шляхом внутрішньочеревинного введення тіопенталу натрію (60 мг/кг). Усі експериментальні процедури були виконані згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС), відповідно до правил «Regulations on the animal use of inresearch biomedical research», «European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes» и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Виділення та електрофорез ДНК в агарозному гелі

Фрагменти серединного нерва після попередньої інкубації гомогенізували на холоді в скляному гомогенізаторі і виділяли ДНК. Розділення фрагментів ДНК проводили в 1,7% агарозному гелі (Agarose Serva Premium, «Serva», Німеччина) на TE-буфері, що містив 10 ммоль/л Трис і 10 ммоль/л ЕДТА (рН 8,0). Тривалість електрофорезу становила 1,5–2 год при напрузі 100 мВ. Після електрофорезу в агарозному гелі фотографували цифровою відеокамерою в транслюмінаторі, сканували з використанням програми «PhotoCaptMw», а за допомогою програми «GelProAnalyzer» визначали інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК. Цей метод дозволяє встановити характер розвитку дистрофічних змін в тканинах, тобто визначити тип фрагментації ДНК у зразках за апоптичним або некротичним механізмом. Відсутність ознак фрагментації ДНК у досліджуваних зразках оцінювали як результат, що відображає життєздат-

ність фрагментів нерва (анастомозу і дистального сегмента нерва).

Гістологічне дослідження

У тварин дослідних груп здійснювали видалення травмованого серединного нерва по всій довжині кінцівки для гістологічного дослідження. Фрагменти нерва поміщали в 10% нейтральний формалін, після чого із фіксованих ділянок на кріотомі виготовляли гістологічні зрізи товщиною 15–20 мкм. Із гістологічних методик фарбування були використані імпрегнація азотнокислим сріблом. Морфометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss (Axio Vision SE64 Rel.4.9.1) та мікроскопу Olympus BX 51 (Японія).

Статистична обробка результатів

Статистичну обробку одержаних даних проводили за загальноприйнятими методами з використанням t-критерію Стьюдента. Рівень статистичної значущості був встановлений на рівні $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Через 30 діб після операції досліджували особливості регенерації серединного нерва в залежності від способу мікрохірургічної пластики. Проведено порівняльний аналіз рівня регенерації нервових волокон, морфометричні дані якого наведено у таблиці 1. Як видно з рисунку 2 цілісність швів аутонейротрансплантату на 30 добу після пластики зберігалась, відсутні були ознаки розвитку запалення і формування рубця.

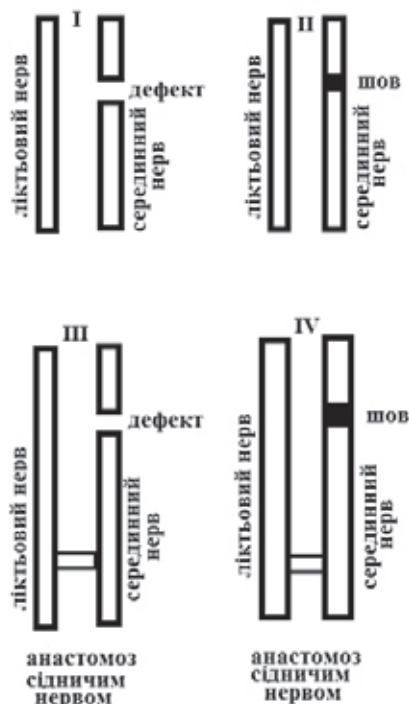


Рис. 1. Схема проведення експериментального дослідження

Щільність регенованих нервових волокон у дистальному сегменті серединного нерва через 30 діб після операції

Група тварин	Щільність нервових волокон		p-value
	Абс., од/мм ³	%	
Контрольна	10735,2±276,6	100,0±0,0	–
№ 1	0	0	–
№ 2	1127,4±137,4	10,6±1,4	–
№ 3	1421,5±195,2	13,2±1,8	P ₂₋₃ =0,11
№ 4	1617,6±115,7	15,1±1,1	P ₂₋₄ =0,01; P ₃₋₄ =0,20



Рис. 2. Препарат серединного нерва з проксимальним швом і дистальним аутонейротрансплантатом.

У групі 1 відмічено наявність дистального сегменту нерва. На гістологічному рівні встановлено завершені явища елімінації продуктів розпаду нервових волокон (явища валлерівської дегенерації) (рис. 3а). При цьому денервовані нейролемоцити (шваннівські клітини) характеризувалися збільшеним об'ємом ядер, високою щільністю дедиференційованих клітин, а також зміненою організацією стромальних елементів нерва. Зазначені гістологічні ознаки вказують на активні регенеративні процеси на рівні місцевої глії, їх життєздатність і готовність до реіннервації.

В проксимальному сегменті невротомованого серединного нерва реєстрували нервові волокна з ознаками формування «колб росту» в «культурі» нерва. Стромальні елементи проксимального сегменту ушкодженого нерва також зазнали виражених структурних змін, тому для повноцінної оцінки результату регенерації та ефективності «захисеного шва» оцінювали обидва сегменти серединного нерва.

У проксимальному сегменті серединного нерва тварин групи 2 відмічено морфологічні ознаки активної регенерації, проявом якої було виражене збільшення щільності нейролемоцитів у структурно зміненій нервовій тканині. Групи нейролемоцитів були орієнтовані вздовж вісі нерва, формуючи так звані «стрічки Бюнгнера». Вздовж дедиференційованих нейролемоцитів регенерували осьові циліндри. При цьому відмічено збереження епіневрїю, ремоделювання сполучної тканини, реєстрували поодинокі острівці жирової тканини.

У дистальному сегменті серединного нерва встановлено наявність окремих кластерів регенеруючих нервових волокон. Реєстрували лише поодинокі фасцикули, що вказує лише на початкові етапи регенеративних процесів (рис. 3б). Новоутворені фасцикули мали власний периневрій і мікросудини. Таким чином, на 30 добу після нейрорафії у серединному нерві відбуваються лише часткова регенерація у дистальному сегменті нерва, а основні процеси у нерві перебувають на стадії відновлення нейрогліальних взаємодій.

У групі 3 відмічене збереження аутонейротрансплантату на 30 добу після пластики. Було досліджено гістологічну структуру усіх відділів пластики нерва. У проксимальному сегменті серединного нерва виявлені поодинокі регенеруючі нервові волокна, ознаки активації ремієлінізації (збільшення діаметру та рівня імпрегнації нервових волокон). Загальна гістологічна структура нерва збережена, відмічено навіть утворення нових терміналей нерва («колб росту»).

У сегменті нерва дистальніше аутонейротрансплантату виявлено регенеруючі нервові волокна (рис. 3с). В гістологічній структурі нерва розпізнано активовані нейролемоцити та контактуючі з ними регеновані осьові циліндри. Реєстрували ділянки нерва без гліоцитів, але з наявними нервовими волокнами, часто з «колбами росту». Морфометричний аналіз показав тенденцію до збільшення кількості регенеруючих осьових циліндрів у дистальній сегмент нерва порівняно із групою 2 (p=0,11).

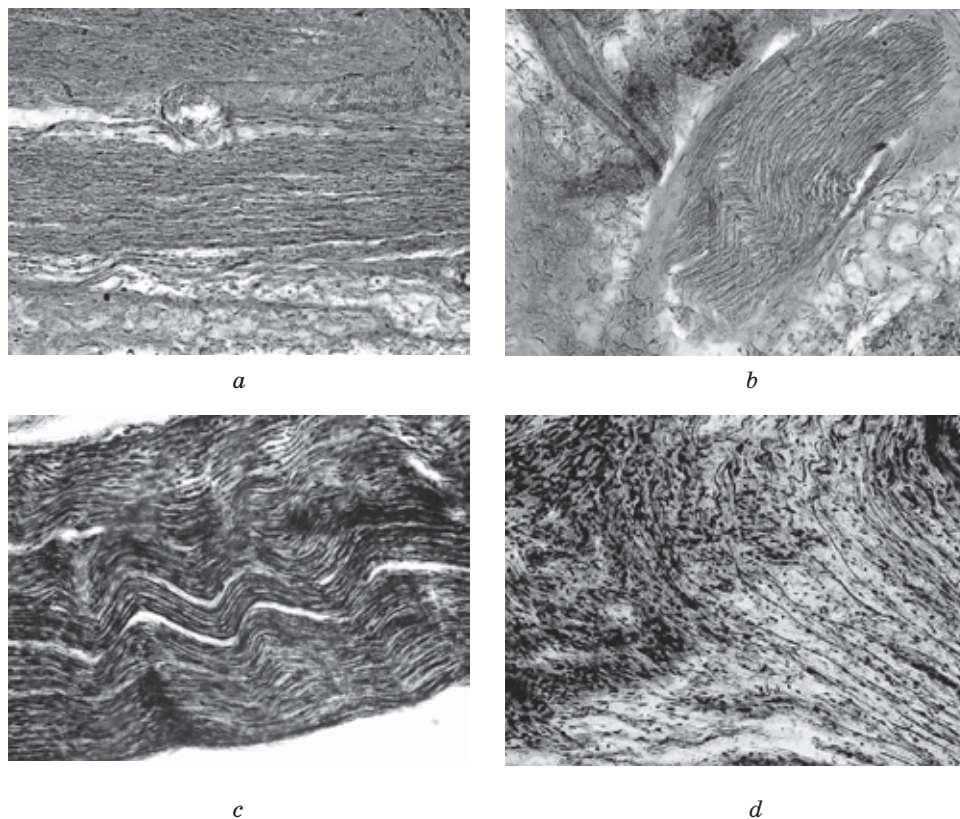


Рис. 3. Регенерація нервових волокон у дистальному сегменті серединного нерва кролів.
Примітка: а – активовані нейролемоцити, венула і елементи периневрію; б – регенеруючий кластер нервових волокон, реорганізація стромальних елементів нерва; с – регенерація нервових волокон серединного нерву дистальніше анастомозу із ліктьовим нервом; д – дистальний сегмент серединного нерва в ділянці шва з анастомозом ліктьового нерва; регенеруючі волокна аутонейротрансплантату у серединний нерв. Імпрегнація сріблом. Об. 20, ок. 10

У групі 4 було встановлено збільшення рівня відновних процесів у дистальному сегменті серединного нерва. Підтверджено достовірне збільшення кількості регенеруючих нервових волокон у сегменті нерва дистальніше проксимального шва (аутонейротрансплантату). Регенерація відбувалась як фасцикулами, так і неорганізованими групами нервових волокон (рис. 3d). В фасцикулах реєстрували регенеруючі осові циліндри і активовані нейролемоцити. На рівні дистального шва, тобто ділянки кабельної вставки між нервами, встановлено активну проліферацію нейролемоцитів, а також окремі клітини в стані апоптозу, що вказує на ініціацію деструктивних змін сегменту нерва при тривалій денервації і відсутності своєчасного відновлення нейрон-гліальних взаємодій [Gomez]. Морфометричний аналіз дозволив кількісно оцінити ефективність морфологічної регенерації нерва у дослідних групах порівняння. Нажаль на 30 добу встановлено лише початковий етап проростання осових циліндрів дистальніше кабельної пластинки (в межах $15,1 \pm 1,1\%$), хоча статистичні дані вказують до збільшення рівня регенерації порівняно з групою 2. Причиною цього може бути реорганізація стромальних елементів нерва, зокрема формування гліально-сполучнотканинного

рубця навколо шва аутонейротрансплантату, що сформувало тканинний бар'єр на шляху регенерації нервових волокон. При цьому нерв характеризувався збереженням епіневрію і частково периневрію.

Результати гістологічних досліджень дозволили оцінити особливості регенеративних процесів на різних рівнях серединного нерва від ділянки травми. Зокрема, важливі дані вказують на виражені структурні зміни і можливий їх перебіг у дистрофічні явища у дистальному сегменті нерва невіддалому (група 1) або незадовільному відновленні нерва (група 2). Дистрофічні явища в нерві можуть розвиватися за двома незалежними, але часто супутніми один одному механізмам, – некрозу і апоптозу. Некроз нерва, а маються на увазі саме механізми клітинного некрозу, спричинюється головним чином травматичним і ішемічним ураженням. Некроз уражає всі структурні елементи нерва, як нейролемоцити і нервові волокна, так і фібробласти стромальних елементів, в тому числі і мікросудини. Натомість апоптоз нейролемоцитів ушкодженого нерва розглядається як реакція клітин на втрачену нейро-гліальну взаємодію. Доказом цієї гіпотези є молекулярні дані, що вказує на взаємозалежну експресію трофічних факторів

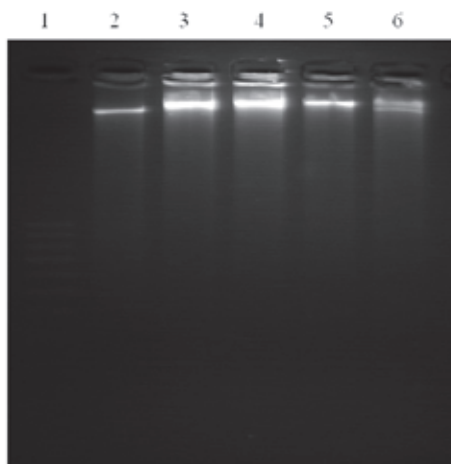


Рис. 4. Електрофореграма ДНК, яка була одержана з серединного нерва кролів.
Примітки: 1 – маркер (100-1000 пар основ); 2 – контроль; 3 – група 1; 4 – група 2; 5 – група 3; 6 – група 4

диференційованими нейролемоцитами ушкодженого нерва і виділення інших факторів регенеруючими «колбами росту» [4]. Зважаючи на це тактика підтримки ушкодженого нерва після його хірургічного відновлення є різною. Саме тому важливим було дослідити цитопатологічний механізм змін травмованого нерва для визначення закономірностей регенерації нерва при створенні «захищеного шва».

Для реалізації поставленої задачі фрагменти нерва досліджували методом молекулярної біології – розділення ДНК методом електрофорезу в агарозному гелі. Цінність цього методу полягає в тому, що за його допомогою ми маємо змогу кількісно і якісно оцінити механізм ушкодження ДНК і його кількісний рівень. Зважаючи на те, що об'єм ушкодженого нерва на етапі регенерації значною мірою представлений активними нейролемоцитами, отримані результати ми екстраполюємо саме на гліальний компонент нерва. Електрофореграма ДНК, отриманої із дистального сегмента серединного нерва груп порівняння наведено на рисунку 4. При аналізі електрофоретичного розділення ДНК в агарозному гелі характерних ознак фрагментації ДНК для апоптозу («апоптозної драбинки») [5] та некрозу (плями коротких фрагментів ДНК) не виявлено. Отже, через 30 діб після ушкодження і пластики серединного нерва його дистальний сегмент залишається стійким, життєздатним і сприятливим до регенерації.

Отримані результати є досить цінними для розуміння закономірностей розвитку регенеративних процесів у травматично ушкодженому нерві і способів її стимуляції. Зважаючи на результати молекулярних досліджень можна стверджувати, що активація регенерації серединного нерва піс-

ля формування аутонейротрансплантату відбувалася завдяки збереженню життєздатності диференційованих нейролемоцитів дистального сегмента впродовж 30 діб після невротомії. При цьому апоптоз нейролемоцитів відбувався на рівні поодиноких клітин, що могло бути ініційовано різними чинниками, в тому числі і імунними реакціями, міжклітинними взаємодіями [6]. Одночасно з цим своєчасне виконання «захищеного шва» запобігало деструктивним змінам і активувало регенеративні процеси, в тому числі і крізь аутонейротрансплантат.

Таким чином, узагальнюючи результати експериментальних досліджень можна зробити висновок про те, що дистальний сегмент серединного нерва залишається життєздатним, в стані регенерації і повної елімінації продуктів розпаду осьових циліндрів (овоїди дегенерації), тобто потенційно сприятливим до регенерації осьових циліндрів із проксимального сегмента за умов вдалої мікrohrurgічної пластики нерва. Виконання кабельної пластики аутонейротрансплантатом між травмованим серединним і інтактним ліктьовим нервом дає можливість покращити регенеративні процеси серединного нерва. За рахунок формування міжнервового анастомозу підтримується життєздатність дистального нерва, що має кращий потенціал до відновлення нейро-м'язового апарату.

Перспективи подальших досліджень

В наступних дослідженнях планується дослідити електропровідність регенеруючого нерва, реакцію м'язів на виконання «захищеного шва» на структурному і електрофізіологічному рівнях.

Список літератури

1. Prognostic factors in sensory recovery after digital nerve repair / T. Bulut, U. Akgün, A. Çıtlak [et al.] //

ActaOrthopTraumatolTurc. – 2016. – Vol. 50(2). – P. 157–161.

2. Sénès F. M. Use of tubulization (nerve conduits) in repairing nerve defects in children / F. M. Sénès, N. Catena, J. Sénès // *Indian J. Orthop.* – 2015. – Vol. 49 (5). – P. 554–560.
3. Lykissas M.G. Current concept sin end-to-side neurorrhaphy / M.G. Lykissas // *World J.Orthop.* – 2011. – Vol. 2 (11). – P. 102–106.
4. Namgung U. The role of Schwann cell-axon interaction in peripheral nerve regeneration / U.Namgung // *Cells Tissues Organs.* – 2014. – Vol. 200(1). – P. 6–12.
5. Banasiak K. J. Mechanism sunderlying hypoxia-induced neuronal apoptosis / K. J. Banasiak, Y. Xia, G. G. Haddad / *Prog. Neurobiol.* – 2000. – Vol. 62. – P. 215–249.
6. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves / J. A. Gomez-Sanchez, L. Carty, M. Iruarrizaga-Lejarreta[et al.] // *The Journal of Cell Biology.* – 2015. – Vol. 210 (1). – P. 153–168.

Стаття надійшла до редакції 29.05.2016

Н. А. Борzych, С. С. Страфун, С. И. Савосько, А. Н. Макаренко
 ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины», Киев, Украина
 Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев, Украина

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОГО СРЕДИННОГО НЕРВА ПРИ АУТОПЛАСТИКЕ И ФОРМИРОВАНИИ ДИСТАЛЬНОГО МЕЖНЕВРАЛЬНОГО АНАСТОМОЗА

В статье приведены результаты экспериментальных исследований по изучению возможности применения «защищённого шва» в пластике дефектов срединного нерва. Эксперименты проведены на кроликах, которым моделировали дефект срединного нерва и проводили его нейрорафию. Дополнительно создавали соединение между локтевым и срединным нервом. Вставкой выступал аутоотрансплантат седалищного нерва. Результаты гистологического исследования позволили оценить уровень регенерации в дистальном сегменте травмированного нерва. При нейрорафии срединного нерва регенерировали $10,6 \pm 1,4\%$ нервных волокон, а при дополнительном создании «защищённого шва» степень восстановительных процессов достиг $15,1 \pm 1,1\%$ ($p=0,01$). На основе анализа электрофореза ДНК, выделенной из дистального сегмента травмированного нерва, молекулярных маркеров гибели нейролемоцитов (апоптоза и некроза) не установлено. Гистологическими исследованиями также подтверждена устойчивость нерва в течение 30 суток после невротомии. Полученные результаты показали, что выполнение кабельной пластики между травмированным срединным и интактным локтевым нервом позволяет улучшить регенеративные процессы повреждённого срединного нерва.

Ключевые слова: срединный нерв, травма, пластика.

N. O. Borzykh, S. S. Strafun, S. I. Savosko, O. M. Makarenko
 Institute of Traumatology and Orthopedics NAMS Ukraine, Kyiv, Ukraine
 Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

FEATURES OF REGENERATION IN INJURED MEDIAN NERVE AFTER AUTOPLASTIC AND FORMATION OF DISTAL INTERNERVAL ANASTOMOSIS

The paper presented results of experimental studies about possibilities of using “protected suture” in plastic median nerve defects. Experiments were conducted on rabbits which modeled defect of median nerve and their neurorrhaphy. Additionally were created graft between the ulnar and median nerve. Sciatic nerve was used for autografting. The results of histological study allowed assessing the level of regeneration in the distal segment of the injured nerve. Neurorrhaphy provided regeneration of $10,6 \pm 1,4\%$ nerve fibers in distal segment of median nerve, in group with “protected suture” repair degree increase to $15,1 \pm 1,1\%$ ($p=0,01$). The analysis of DNA electrophoresis isolated from distal segment of injured nerve, not revealed the molecular markers of cell death (apoptosis and necrosis). Histological studies were also confirmed the stability of distal nerve segment within 30 days after injury. The results showed that the implementation of graft between injured medial nerve and intact ulnar nerve makes it possible to improve the regenerative processes of the damaged median nerve.

Keywords: median nerve, trauma, plastics.