

Ультраструктурные особенности влияния липофлавона на восстановление травмированного периферического нерва

Ю.Б.Чайковский, Е.В.Храпай

Национальный медицинский университет им. А.А.Богомольца, кафедра гистологии и эмбриологии
Киев, Украина

Проблема регенерации нервных стволов привлекает к себе внимание многих исследователей, так как повреждение периферических нервов приводит к инвалидности, особенно в молодом возрасте. Одновременно с этим данный аспект является недостаточно изученным, поскольку по-прежнему более 60% пострадавших становятся инвалидами II-III групп. С этой целью изучены характерные стойкие нарушения различных морфофункциональных систем периферического нерва при полной невротомии в эксперименте на крысах и их фармакологическая коррекция липофлавоном. Для этого были использованы методы световой и электронной микроскопии. Липофлавоном — препарат, который представлен липосомальной формой кверцетина. Мы использовали липофлавоном как более эффективную форму доставки лекарственного средства к терапевтическим мишеням при травматическом повреждении нервных волокон. Липофлавоном (0,1 мг/кг, «Биолек», Харьков) вводили ежедневно в течение первых 10 дней с момента воспроизведения полной невротомии. Улучшение восстановления нервных волокон за 12-недельный период мы встречали в проксимальном отделе и зоне травмирования нерва. В дистальном отделе качественных изменений количества ламелл миелина не отмечали. Результаты данных исследований свидетельствуют, что использование липофлавоном может быть эффективным для улучшения восстановительного процесса при травмах периферических нервов.

Ключевые слова: седалищный нерв, регенерационная неврома, морфофункциональные изменения, липофлавоном.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема регенерации нервных стволов привлекает к себе внимание многих исследователей в области биологии и медицины, так как повреждение периферических нервов приводит к инвалидизации, особенно в молодом возрасте. Одновременно с этим данный аспект является недостаточно изученным, поскольку по-прежнему более 60% пострадавших становятся инвалидами Ii-Iii групп [1, 3-5].

Целью исследования явилось изучение характера процессов де- и регенерации в травматически поврежденном нерве у крыс, а также их фармакологическая коррекция липофлавоном на поздних этапах восстановительного процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 14 белых крысах-самках массой 200-250 г. Животные были разделены на три группы: 1 — контроль, интактные животные (n=7); 2 группа — травма нерва (n=9); 3 группа — травма с использованием липофлавоном (n=10). Полную аксотомию седалищного нерва экспериментальных животных воспроизводили в следующем порядке: производили оперативный доступ к правому седалищному нерву, последний мобилизовали и перерезали на уровне середины бедренной кости крыс. Проксимальный и дистальный концы нерва сшивали эпиневральным швом ниткой «Ethicon» (Шотландия) 10/0 с атравматической иглой, оставляя диастаз размером 1 мм. Проксимальный отдел нерва на расстоянии 3-5 мм от области травмирования размокнули с помощью пинцета. Рану зашивали наглухо. Препараты вводили параневрально в течение 10 дней после травмы. Липофлавоном («Биолек», Харьков) вводили в дозе 0,1 мг/кг, липин («Биолек», Харьков) — 0,1 мг/кг, корвитин («Борщаговский химико-фармацевтический завод», Киев) — 0,2 мг/кг.

Спустя 12 недель у животных произвели забор материала для дальнейшего ультраструктурного исследования. Отдельные образцы нерва (проксимальный и дистальный концы, зона шва) фиксировались в 2,5% растворе глутаральдегида с последующей дофиксацией в 1% растворе осмиевой кислоты на фосфатном буфере при pH 7,4. Материал обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Из эпоксидных блоков изготавливали ультратонкие срезы на ультратоме Райхарт (Голландия). Для повышения контрастности ультратонкие срезы окрашивали раствором уранилацетата и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе EM-400T фирмы «Philips» (Голландия) [6]. Морфометрические исследования проводились на микроскопе Olympus BX 51 (Япония) с помощью программы UTHSCSA ImageTool, Version 2.0 (alpha 3) для Microsoft Windows 95, Windows NT. Измеряли площадь миелиновых нервных волокон и их осевых цилиндров, толщину и площадь миелиновой оболочки, среднее количество ламелл миелиновой оболочки в нервном волокне [2]. Достоверность межгрупповых различий численных значений оценивали согласно t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На момент взятия образцов ткани экспериментальных животных в области невротомии наблюдались сращения концов дистального и проксимального отделов нерва, в зоне шва выявляли развитие посттравматического рубца и восстановление васкуляризации нерва. Через 12 недель в ткани нерва наблюдали выраженные структурные изменения, в нервных волокнах и стенке капилляров во всех исследуемых отделах перерезанного нерва.

В проксимальном отделе нерва установлено наличие отека вокруг капилляров, что проявляется в отслоении базальной мембраны от структурно измененных эндотелиоцитов. Эндотелий на люменальной поверхности формирует выпячивания, цитоплазма резко вакуолизована микропиноцитозными везикулами. В отдельных местах базальная мембрана имеет выраженную деструкцию. Вокруг капилляров проксимального отдела определяются многочисленные пучки коллагеновых волокон, которые ориентированы в разных направлениях. В этих зонах установлена инфильтрация лейкоцитами. Миелиновые оболочки поврежденных нервных волокон деформированы, они утратили свою округлую или овальную форму, приобретая не свойственную им структуру.

Встречаются полигональные и плоские миелинизированные нервные волокна. В отдельных волокнах аксоплазма электронно-плотная без наличия ожидаемых органелл. Также в проксимальном отделе отмечается наличие безмиелиновых нервных волокон в состоянии гидропической дистрофии. Шванновские клетки таких волокон электронно-плотные. Отмечено значительное уменьшение морфометрических показателей нервных волокон (табл. 1). В зоне непосредственной невротомии нами были установлены существенные отличия в организации структуры нерва, описанные для предыдущего отдела травмированного нерва. В зоне шва сформирован соединительнотканый рубец, который практически полностью лишен сосудистых элементов нерва. Сосуды в зоне формирования рубца регенерировали по периферии и отличаются по своим ультраструктурным особенностям от сосудов нерва интактных животных. Капилляры, локализованные ближе к рубцу, характеризуются выраженными нарушениями. Их стенка тонкая, а ядра отдельных эндотелиоцитов приобретают полигональную, звездчатую форму. Люменальная и базальная поверхности этих клеток формируют выпячивания. Цитоплазма многих эндотелиоцитов наполнена множественными микропиноцитозными везикулами, особенно на базальном полюсе клеток. Митохондрии этих клеток повреждены, они не имеют свойственную данным органоидам организацию крист: кристы отсутствуют либо раздутые. В зоне рубца встречаются также капилляры в стагнированном состоянии, в просвете которых скопления эритроцитов и тромбоцитов. Перициты данной исследуемой области травмированного нерва расположены на определенном расстоянии от базальной мембраны капилляров, вокруг них отмечается отек ткани. Достаточно высокий уровень васкуляризации установлен на периферии регенерационной невротомии. Именно вдоль этой новообразованной сосудистой системы отмечаются процессы регенерации нервных стволов. Миелиновая оболочка регенерированных нервных волокон в зоне шва имеет локальные расслоения ламелл, но чаще она гомогенно прокрашена осмием, электронно-плотная. Аксоплазма этих волокон имеет элементы аксоскелета, везикулы и митохондрии. Цитоплазма активированных нейроремонтоцитов характеризуется признаками активации: определяются стопки аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума, восстанавливается микрорегиональная базальная мембрана вокруг отдельных нервных волокон. Также в зоне

шва зустрічаються регенеровані нервні волокна овальної і плоскої форми. В окремих волокнах мієлінова оболочка деформована в вигляді наслоєння, при цьому повного ультраструктурного відновлення ламеллярної організації мієліна, характерного для інтактних нервних волокон, не встановлено. В зоні шва відзначається скоплення активірованих фібробластів і макрофагів. Вокруг них розположені численні пучки різнонаправлених колагенових волокон, в стані неколагеногенезу. При вивченні дистального відділу сидлищного нерва крыс при повній невротомії була встановлена різко виражена картина структурно-функціональних змін. Судини середнього калібру своєю внутрішньою поверхню формують листовидні випячювання, які різко звужують просвіт судини. Капіляри в цьому відділі нерва характеризуються високою транспортною активністю, що виражається в формуванні численних мікропіноцитозних везикул в цитоплазмі ендотеліоцитів. Базальна мембрана таких капілярів диссоційована, з локальною деструкцією. На периферії капілярів відзначаються очаги рубцювання: скоплення численних пучків колагенових волокон і активірованих фібробластів з макрофагами. Вблизі цих зон волокна знаходяться в стані дегенерації, їх мієлінові оболонки деформовані, електронно-плотні. В міжклітинному просторі зустрічаються окремі ламеллоподібні утворення. Безмієлінові волокна також з ознаками порушення структурної організації, їх аксолемма відшарована від відростків нейролемоцитів. Одночасно з цим багато шванновських клітин в активному стані: цитоплазма з елементами апарату Гольджі і ендоплазматического ретикулула, мітохондріями. Ядра кліток з

диспергованим хроматином. Мієлінізовані нервні волокна відокремлені від оточуючого міжклітинного мікрорегіональної базальної мембраною, яка в багатьох зонах має ознаки деструкції. Між регенерованими нервними волокнами встановлено наявність груп активірованих фібробластів і макрофагів, пучки колагенових волокон. Слід відзначити, що кількість вказаних кліток значно більше, ніж в проксимальному відділі травмованого нерва. Зустрічаються окремі макрофаги і нейролемоцити з фагоцитованими фрагментами детриту пошкоджених нервних волокон.

При вивченні дії ліпофлавонон встановлено, що в проксимальному відділі травмованого нерва нервні волокна розташовувалися групами, між ними зустрічалися колби росту. Вокруг регенерованих волокон присутствовали пучки колагенових волокон, як і у тварин без лікування препаратом. В ростючих аксонах зустрічаються елементи цитоскелета, мітохондрії. В окремих місцях ростючі аксоны розташовані групами. Встановлено, що ліпофлавонон стимулює ангиогенез в області травми нерва. В цьому відділі травмованого нерва численні кровоносні судини формують анастомози. Відзначається відновлення ультраструктурної організації гемокапілярів в проксимальному відділі і зоні шва, а їх базальна мембрана менше пошкоджена. В області шва при введенні ліпофлавонона також зустрічаються нервні волокна на різних стадіях мієлінізуючого процесу. В аксонах добре розвинуті елементи аксоскелета, присутствуют мітохондрії і везикули. В дистальному відділі капіляри характеризуються локальним відшаруванням базальної мембрани і їх локальною деструкцією. При використанні ліпофлавонона зростає кількість

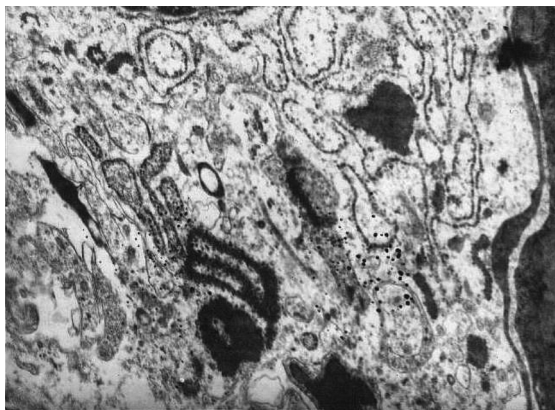


Рис. 1. Дистальний відділ. Деформація нервних волокон. Неколагеногенез. 12 тижнів після операції. Електронне фото: *13000.

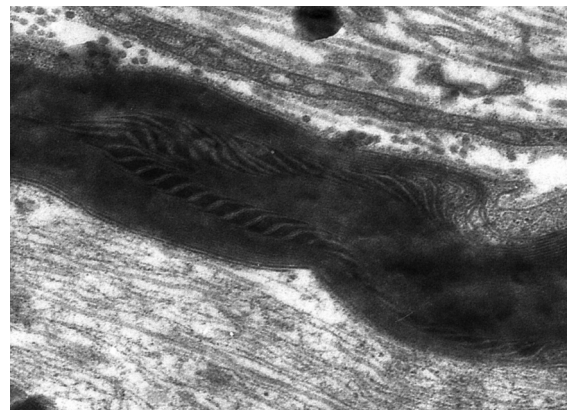


Рис. 2. Дистальний відділ. Ліпофлавонон. Насечка Шмідта-Лантермана. Плотна організація ламелл мієлінових оболонок нервних волокон. 12 тижнів після операції. Електронне фото: *8000.

ТАБЛИЦА 1

Показатели морфометрических изменений нервных волокон дистального отдела нерва при травмировании и применении лекарственных средств

Группа	Площадь миелинового волокна, мкм ²	Площадь осевого цилиндра, мкм ²	Толщина миелиновой оболочки, мкм	Площадь миелиновой оболочки, мкм ²
Контроль	84,77±18,98	73,27±12,63	1,13±0,21	7,26±0,27
Травма (проксимальный отдел)	54,27±12,18a	44,83±13,62a	0,85±0,19a	5,54±0,24a
Травма (область травмы)	39,74±7,33a	33,86±10,09a	0,90±0,15a	5,72±0,24a
Травма (дистальный отдел)	26,62±9,34a	22,04±10,97a	0,52±0,11a	3,40±0,16a
Липофлавон (проксимальный отдел)	43,20±14,00a	37,54±11,81a	0,80±0,11a	5,22±0,12a,c
Липофлавон (область травмы)	33,08±6,07a	26,47±6,51a	0,75±0,16a	4,91±0,18a,b
Липофлавон (дистальный отдел)	36,06±9,20a	30,41±11,20a	0,81±0,11a,b	5,42±0,12a,b

Примечания: а — достоверно по отношению к группе контроля ($p < 0,05$); b — достоверно по отношению к травме без лечения ($p < 0,05$); c — достоверно по отношению к травме с лечением липином и корвотином ($p < 0,05$).

регенерировавших нервных волокон в проксимальном и дистальном отделах. Во всех исследуемых отделах травмированного нерва встречаются новообразованные нервные волокна. Установлено восстановление их ультраструктурной организации. Миелиновые оболочки имеют нормальную структуру без отека и расслоения (рис. 2). Лишь в некоторых нервных волокнах встречается локальное расслоение ламелл миелина. Шванновские клетки характеризуются высокой синтетической активностью, о чем свидетельствует возрастание в ядрах количества эухроматина и формирование отростков, контактирующих с регенерированными нервными волокнами. При влиянии липофлавона установлено увеличение количества ламелл миелиновых оболочек в проксимальном отделе и области шва (табл. 2). Таким образом, липофлавон оказывает существенное влияние на процессы регенерации и восстановления нервных волокон кровеносных сосудов и нервных волокон в травмированном нерве. Восстановление структурной организации нерва в большей степени происходит в проксимальном отделе и зоне шва.

Таким образом, ультраструктурные нарушения в травмированном периферическом нерве имеют полиморфный характер. При этом даже через 12 недель посттравматического периода мы не наблюдали нормальной структуры регенерированных нервных стволов. На осно-

вании анализа фармакологического действия липофлавона был сделан вывод о том, что терапия данным препаратом повышает эффективность регенерации нервных волокон в травмированном нерве. Препарат способствует регенерации нервных волокон и восстановлению их ультраструктурной организации. При этом возрастает количество ламелл в миелиновых оболочках нервных волокон, снижается количество нервных волокон с отеком и расслоением миелина. Также отмечен активный ангиогенез. Это обусловлено тем, что липофлавон, который представлен липосомальной формой кверцетина, защищает нервные клетки от окислительного стресса, активизирует эндогенные антиоксидантные системы защиты, снижает развитие воспалительного процесса и повышает рост нейритов [7]. Разработанная в Украине липосомальная форма кверцетина, используемая при многих заболеваниях и экспериментальных патологических состояниях, оказалась очень эффективной. Антиоксидант кверцетин является нерастворимым, поэтому разработана его липосомальная форма. Мы использовали липофлавон как более эффективную форму доставки лекарственного средства к терапевтическим мишеням при травматическом повреждении нервных волокон. В нашей работе представлены результаты терапевтического эффекта липофлавона на поздних этапах восстановительного процесса.

ТАБЛИЦА 2

Изменения среднего количества ламелл миелиновых оболочек в нервных волокнах при травматическом повреждении нерва

Группа	Проксимальный отдел	Зона травмы	Дистальный отдел
Контроль		65,33±12,53	
Травма	36,00±5,04a	31,60±5,03a	29,20±4,63a
Корвитин + липин	44,20±1,85a	38,20±7,42a	30,20±7,42a
Липофлавон	42,80±5,53a	31,16±3,36a	34,20±6,72a

Примечание: а — достоверно по отношению к группе контроля ($p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

1. Позитивный эффект липофлавона можно связывать с тем, что липосомальная форма как продукт нанотехнологических разработок имеет высокую тропность к клеточным мембранам.

2. Такая форма препарата ускоряет прорастание и миелинизацию нервных волокон. Это связано с антиоксидантными свойствами, которыми обладает кверцетин. Даже при коротких сроках введения (10 дней) липофлавоном демонстрирует выраженный эффект.

3. Липосомальная форма кверцетина (липофлавоном) способствует эффективной доставке лекарственного средства к терапевтическим мишеням. Это стимулирует процессы регенерации нервных волокон и их восстановления, что может предотвратить развитие дегенеративных процессов на поздних этапах восстановления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геращенко С.Б., Дельцова О.І., Коломійцев А.К., Чайковський Ю.Б. Периферійний нерв (нейрон-судинно-десмальні взаємовідношення в нормі та патології). — Тернопіль: Укрмедкнига, 2005. — 342 с.
2. Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. — Житомир: Полісся, 2005. — 288 с.
3. Корсак А.В. Регенерація периферичного нерва за умов застосування омега-3-поліненасичених жирних кислот: Автореф. ... дис. к.мед.н. — К., 2008 — 184 с.
4. Сокурченко Л.М. Регенерація периферичного нерва в умовах нейропластики, проведеної в різні терміни після пошкодження та стимуляції мієліногенезу: Автореф. ... дис. к.мед.н. — К., 2003 — 180 с.
5. Цымбалюк В.И., Чайковский Ю.Б., Ломако Л.А., Фисенко Л.И. Повышение эффективности микрохирургических операций у больных с последствием травм срединного и локтевого нервов области предплечья. — К.: АТЗТ «Компанія «РАДА», 1998. — 118 с.
6. Moskaug J.O., Carlsen H., Myhrstad M., Blomhoff R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods // Mechanisms of ageing and development. — 2004. — Vol. 125. — P. 315-324.
7. Myhrstad M., Carlsen H., Nordstrom O., Blomhoff R., Moskaug J.O. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter // Free Radical Biology & Medicine. — 2002. — Vol. 32. — №5. — P. 386-393.

**Ю.Б.Чайковський, О.В.Храпай. Ультрас-
структурні особливості впливу ліпофлавоноу на
відновлення травмованого периферичного не-
рва. Київ, Україна.**

Ключові слова: сідничний нерв, регенераційна неврома, морфофункціональні зміни, ліпофлавоном.

Проблема регенерації нервових стовбурів привертає до себе увагу багатьох дослідників, так як ушкодження периферичних нервів викликає інвалідність, особливо в молодому віці. Одночасно із цим даний аспект є недостатньо вивченим, оскільки, як і раніше, більше 60% постраждалих стають інвалідами ІІ-ІІІ груп. Із цією метою досліджені характерні стійкі порушення різних морфофункціональних систем периферичного нерва при повній невротомії в експерименті на щурах та їх фармакологічна корекція ліпофлавоном. Для цього використали методи світлової та електронної мікроскопії. Ліпофлавоном — препарат, представлений ліпосомальною формою кверцетину. Ми використали ліпофлавоном як більш ефективну форму доставки лікарського засобу до терапевтичних мішеней при травматичному пошкодженні нервових волокон. ліпофлавоном (0,1 мг/кг, «Біолек», Харків) вводили щоденно впродовж перших 10 днів з моменту відтворення повної невротомії. Покращення відновлення нервових волокон за 12-тижневий період ми спостерігали в проксимальному відділі та зоні травмування нерва. У дистальному відділі якісних змін кількості ламелл мієліну не відмічали. Результати даних досліджень свідчать, що використання ліпофлавонону може бути ефективним для покращення відновлювального процесу при травмах периферичних нервів.

Yu.B.Tchaikovsky, O.V.Khrapay. Ultrastructural features of the influence of Lipoflavon to restore the injured peripheral nerve. Kyiv, Ukraine.

Key words: sciatic nerve, regeneration neuroma, morphofunctional changes, Lipoflavon.

The problem of regeneration of nerve trunks has attracted the attention of many researchers, as damage of peripheral nerves leads to disability, especially at young age. Simultaneously, this aspect is poorly studied as more than 60% of victims become disabled of II-III groups like earlier. With this aim, we investigated characteristic persistent violations of various morphofunctional systems of peripheral nerve at full neurotomy in experiment on rats and their pharmacological correction by Lipoflavon. For this purpose, we used the methods of light and electron microscopy. Lipoflavon is a drug, the liposomal form of quercetin. We used Lipoflavon as more effective form of drug delivery to therapeutic targets in traumatic damage of nerve fibers. Lipoflavon (0,1 mg/kg, Biolek, Kharkov) was injected daily during the first 10 days of full neurotomy. Improved of recovery of nerve fibers in the 12-week period, we observed in the proximal zone and nerve injury. In the distal part, the qualitative changes in the number of myelin lamellae were not noted. The results of these studies indicate that the use of lipoflavon can be effective for improving the recovery process in case of injuries of peripheral nerves.

Надійшла до редакції 15.08.2010 р.