

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ВІДНОВЛЕННЯ СІДНИЧНОГО НЕРВА ПРИ РІЗНИХ СПОСОБАХ АУТОПЛАСТИКИ

С. С. Страфун¹, В. В. Гайович¹, А. А. Безуглий¹, С. І. Савосько²
¹ДУ “Інститут травматології та ортопедії НАМН України”, м. Київ
²Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, м. Київ, Україна

COMPARATIVE ANALYSIS OF SCIATIC NERVE RECOVERY IN DIFFERENT AUTOGRAFTING METHODS

S. S. Strafun, V. V. Gayovych, A. A. Bezugly, S. I. Savosko

Introduction. Experimental research is devoted to analyze the efficiency of recovery of peripheral nerve large defects by autografting and nerve connections epineural sutures and method of high-frequency electric welding equipment.

Materials and methods. The area of reconstruction and the distal segment of rat sciatic nerve are investigated with light and electron microscopy.

Results. Reconstruction of large defects in rat sciatic nerve is characterized by low efficiency of regeneration and the formation of glial and connective tissue scars in proximal and distal neurotaphy. Electric welding of nerve ends negatively affected on recovery process and caused fragmental lysis and had poor effectiveness (density of nerve fibers was 27.5% vs. 46.1% at epineural suture).

Conclusions. The efficiency of recovery of damaged nerve determined by the degree of connective and glial scar formation around epineural suture. High-frequency electric connection as a way to end the nerve (end-to-end) is untenable and not effective. Microsurgical reconstruction of large nerve defects ways autografting needs improvement and further research.

Key words: autografting, nerve large defect, sciatic nerve, epineural suture, high-frequency electric welding equipment, experiment.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ АУТОПЛАСТИКИ

С. С. Страфун, В. В. Гайович, А. А. Безуглий, С. И. Савосько

Введение. Экспериментальное исследование посвящено сравнительному анализу эффективности восстановления периферического нерва при больших дефектах путем реконструкции аутотрансплантатом, соединением нерва эпиневральным швом и методом высокочастотной электросварочной техники.

Материалы и методы. Методами световой и электронной микроскопии исследовали зону шва нерва и дистальный сегмент седалищного нерва крысы.

Результаты. Реконструкция крупных дефектов седалищного нерва крысы характеризуется низкой эффективностью регенерации и образованием глиальных и соединительнотканых рубцов в участках проксимальной и дистальной нейрорафии. Электросварка концов нерва отрицательно повлияла на процессы восстановления, вызвала лизис фрагментов реконструкции и имеет низкую эффективность (плотность нервных волокон составила 27,5% против 46,1% при эпиневральном шве).

Выводы. Эффективность восстановления поврежденного нерва определяется степенью глиального и соединительнотканного рубца в зоне эпиневрального шва. Высокочастотная электросварка в качестве способа соединения концов нерва является несостоятельной и неэффективной. Микрохирургическая реконструкция крупных дефектов нерва требует усовершенствования способов аутопластики и дальнейшего исследования.

Ключевые слова: аутопластика, большой дефект нерва, седалищный нерв, эпиневральный шов, высокочастотная электросварочная техника, эксперимент.

Вступ

Проблема ефективного відновлення цілісності нервових стовбурів та активації посттравматичної регенерації периферійного нерва залишається однією з найбільш актуальних проблем хірургії нервів. Мета хірургічної реконструкції застарілих травм – забезпечити регенерацію нервових стовбурів у дистальні кінці ушкодженого нерва при наявності дефекту, який утворюється після висічення невроми та ретракції ушкоджених кінців нерва. Методом вибору у таких випадках залишається аутонейропластика [6]. Трансплантація аутологічного нерва є “золотим стандартом” у реконструкції застарілих дефектів периферійних нервів [17]. Після хірургічної реконструкції регенеруючі нервові волокна ростуть від проксимального кінця нерва, через трансплантат і дистальний сегмент нерва до цільових м'язів і визначаються способом і ефективністю з'єднання кінців нерва і трансплантата.

Незважаючи на впровадження в хірургічну практику нових видів шовного матеріалу і способів з'єднання нерва, епіневральний шов залишається основним [8]. Епіневральний шов вимагає адекватної орієнтації кінців пересічених нервів, що потребує застосування операційного мікроскопа та технічних засобів і сприятливо позначається на результаті регенерації фасцикул нерва [13].

З'єднання кінців нерва без шва є привабливою й потенційно сприятливою технологією реконструкції травмованого нерва, порівняно з традиційною технікою нейрорафії (end-to-end, end-to-side) [9, 12]. Цей метод має потенціал бути більш ефективним, зменшити гліально-сполучнотканинну організацію навколо шва і поліпшити проростання фасцикул. Два методи, які ретельно оцінені, – це з'єднання білковим (фібриновим, колагеновим, альбуміновим) і вуглеводним (хітозановим) клеєм [2, 4, 14,16].

В останні роки в хірургії широко впроваджується високочастотна електрозварювальна техніка. Дія високочастотних електрохірургічних інструментів пояснюється хімічними та фізичними процесами, що відбуваються в тканинах під впливом високочастотного струму. Застосування технології високочастотного електрозварювання (ВЧЕ) м'яких тканин у хірургії дозволило суттєво знизити частоту інтраопераційних ускладнень, значно зменшити об'єм крововтрати під час операції та значно скоротити час самого оперативного втручання [1]. Проте питання застосування такого підходу в хірургії травмованих периферійних нервів є досить дискусійним і не розробленим. У точному оцінюванні можливості виконання і результатів реконструкції ушкодженого нерва в короткий період після ВЧЕ є значні труднощі, тому для аналізу можливості застосування технології ВЧЕ нерва було проведено експериментальне дослідження.

Мета роботи — порівняти ефективність методів відновлення периферійного нерва при великих дефектах: з'єднання нерва епіневральним швом і високочастотної зварювальної техніки.

Матеріали і методи

У роботі використовували протоколи ведення дослідних тварин, хірургічного втручання, гістологічного, морфометричного, статистичного досліджень та методи світлової і електронної мікроскопії.

1. Протокол ведення дослідних тварин

Щурів лінії WKY (200–215 г) утримували при контрольованих умовах температури ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), вологості ($55,0 \pm 5,0\%$) і світлового періоду. Тварини мали вільний доступ до стандартного гранульованого комбінованого корму і питної води. Премедикацію дослідних тварин здійснювали шляхом введення тіопенталу натрію (60 мг/кг). Експериментальні маніпуляції проводили відповідно до правил “Regulations on the animal use of in research biomedical research”, “European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes”, “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

2. Протокол хірургічного втручання

Моделювання великого дефекту сідничного нерва здійснювали у 20 щурів, яких розподілили на три групи:

- у *I* групи (контрольну) ввійшли 5 інтактних щурів. Доступ до сідничного нерва виконували в середньо-верхній третині задньої кінцівки щура. Розсікали шкіру та м'які тканини, виділяли сідничний нерв. На рівні середньої третини нерва видаляли фрагмент довжиною 1 см;
- у *II* групи ввійшли 7 тварин, у яких аутопластику сідничного нерва здійснювали шляхом нейрорафії епіневральним швом (проленові нитки 8/0 на атравматичній голці, “Ethicon”, Шотландія) завдяки фрагменту нерва довжиною 1 см, який шивали в діастаз ушкодженого нерва протилежними кінцями (рис. 1);

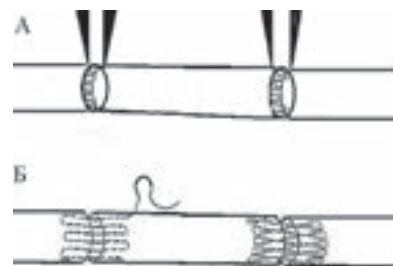


Рис. 1. Схема реконструкції сідничного нерва щура шляхом ВЧЕ (А) та епіневральним швом (Б)

- у *III* групи ввійшли 8 тварин, у яких дистальний і проксимальний шви сідничного нерва здійснювали за допомогою високочастотної електрозварювальної техніки ЕКВЗ-300 “ПАТОНМЕД”, Україна.

Після завершення етапу реконструкції сідничного нерва місце доступу та шкіру щурів зашивали і обробляли спиртовим розчином.

3. Протокол гістологічного дослідження

Сідничний нерв щурів через 30 діб після аутопластики фіксували в 10%-му нейтральному формаліні. Поздовжні криозрізи імпрегнували азотнокислим сріблом та досліджували на світлооптичному рівні.

Для дослідження ультраструктурних змін фрагменти дистального сегмента сідничного нерва фіксували 2,5%-м розчином глютарового альдегіду на фосфатному буфері з дофіксацією в 1%-му забуференому розчині чотириокису осмію. Зневоднення проводили у спиртах зростаючої концентрації (70,80,90 та 100%) і ацетоні. Зразки нерва

просочували та заливали у суміш епон-аралдит згідно з загальноприйнятою методикою. Для прицільної орієнтації напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім, після чого на ультратомі Reihart (Австрія) виготовляли ультратонкі зрізи. Контрастування проводили 2%-м розчином уранілацетату та цитратом свинцю. Препарати досліджували та фотографували під електронним мікроскопом Tescan Mira 3 LMU (Чехія) при збільшеннях у 6–40 тисяч разів.

4. Протокол морфометричного та статистичного дослідження

Морфометричний аналіз виконували за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.49.1) та мікроскопа Olympus BX 51 (Японія). За критерії відновлення обрали:

1. щільність нервових волокон (од/мм²);
2. діаметр осьового циліндра (мкм);
3. товщину мієлінової оболонки (мкм);
4. щільність гемокапілярів (од/поле зору на мікрофото ×20). Порівняння отриманих результатів здійснювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Рівень статистичної значущості був установлений на рівні $p < 0,05$.

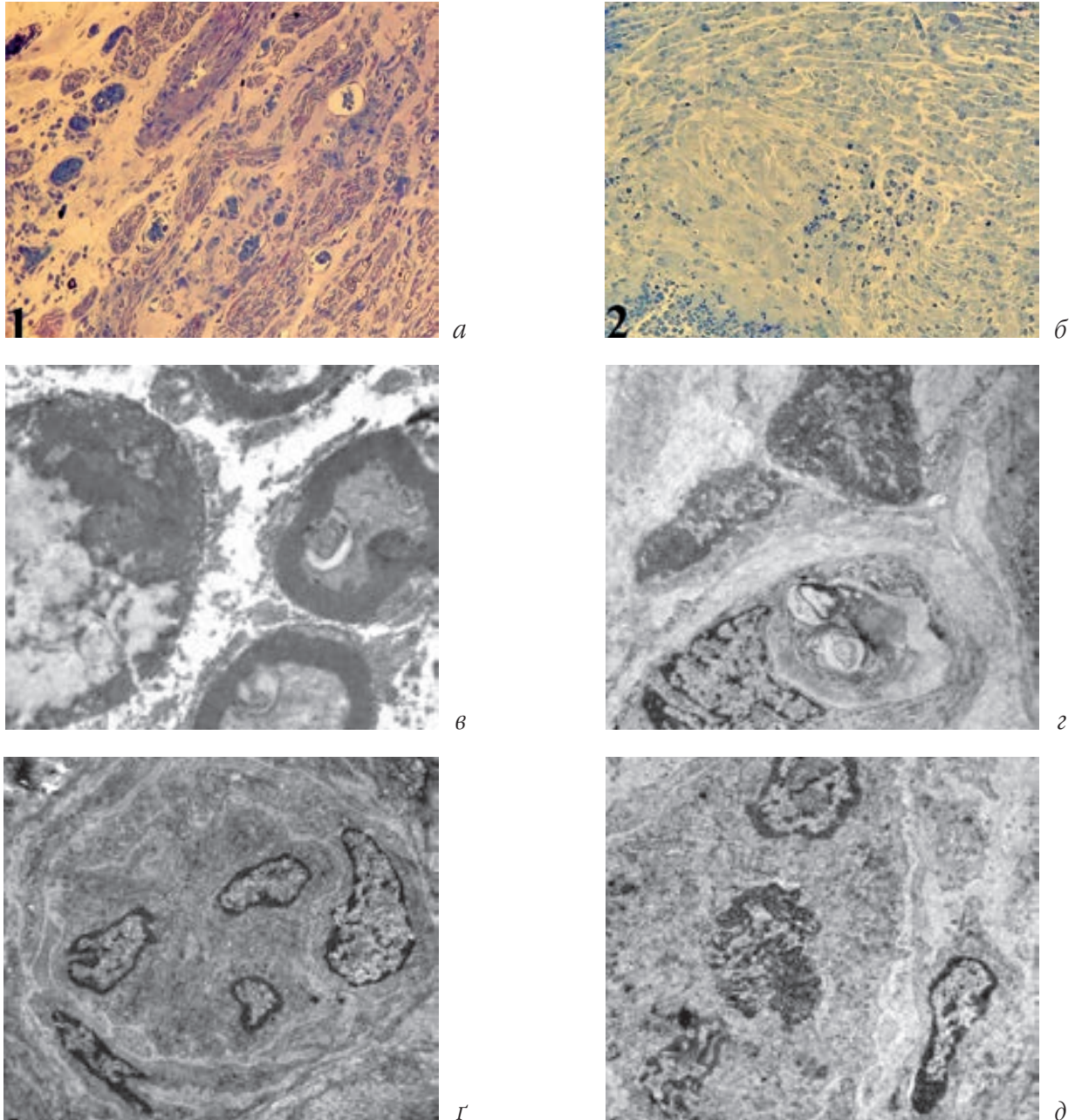


Рис. 2. Структура дистального сегмента сідничного нерва після реконструкції. Набряк та розшарування мієлінової оболонки. Апоптоз нейролемоцитів дистального фрагмента сідничного нерва після застосування ВЧЕ. Відсутня регенерація, післякоагуляційний колагеногенез. Активовані нейролемоцити, ремоделювання ендоневрію. *а, в, з* – епіневральний шов; *б, г, д* – ВЧЕ. Толуїдиновий синій (*а-б*): об. 20, ок. 10. Електронна мікрофотографія (*в-д*): ×34000

Результати та їх обговорення

На моделі аутопластики великих дефектів сідничного нерва (довжина дефекту до 1 см) порівнювалися ефективність регенерації структурно-функціональних кластерів у дистальний відділ ушкодженого нерва. Дистальний і проксимальний шви сідничного нерва здійснювали за допомогою високочастотної електрозварювальної техніки ЕКВЗ-300 "ПАТОНМЕД" (див. рис. 1). У ділянках з'єднання кінців нерва із аутотрансплантата на макрорівні реєструвалися ділянки термокоагуляції, що на макрорівні реєструвалися у вигляді неврови, а у випадку некрозу трансплантата – кінці нерва без утворення регенеруючих терміналей.

При гістологічному дослідженні через 30 днів після аутопластики морфологічна структура сідничного нерва характеризувалась формуванням посттравматичної неврови із явищем гіперваскуляризації (щільність мікросудинного русла збільшилась на 27,5%, $p < 0,05$). У ділянках трансплантата і дистального відділу ушкодженого нерва відмічено активну проліферацію активованих нейролемоцитів і утворення щільної сітки мікросудинного русла та ремоделювання сполучнотканинних елементів нерва (рис. 2,3). Стадія активації гліоцитів відповідала так званому етапу "бюнгнерівських стрічок", тобто початковим стадіям посттравматичного відновлення. Ознаки регенерації нервових волокон крізь трансплантат встановлено лише у 3 випадках серед 8 дослідних щурів (щільність нервових волокон ($n=3$) становила $2875,8 \pm 211,9$ од./мм² проти $4797,3 \pm 491,0$ од./мм² при епіневральному шві), при цьому в інших щурів ($n=5$) прояви регенерації були відсутні, що спричинено лізисом (некрозом) трансплантата або посттравматичним рубцюванням (табл. 1), що унеможлиблюють потенційне проростання нервових

волокон. Таким чином, ВЧЕ як спосіб з'єднання травмованого периферійного нерва є неспроможним, спричинює негативний вплив на потенційну регенерацію фасцикул крізь трансплантат і суттєво поступається ефективності відновлення після епіневрального шва. Відомо, що ефективність відновлення та реіннервації м'яза визначається способом реконструкції та процесами, які розвиваються в трансплантаті. У трансплантаті структурні зміни розвиваються аналогічно до дистального сегмента нерва і включають валлерівську дегенерацію, щоб забезпечити вільні канали ремоделюваного ендоневрію для регенерації нервових волокон. Вживання нейролемоцитів у трансплантаті має вирішальне значення для цього процесу, тому трансплантат повинен бути відповідним чином реваскуляризований. Цей процес відбувається як від проксимальних і дистальних нервових кінців, так і від оточуючої тканини. На тваринних моделях нейрорафії сідничного нерва відмічено високу реваскуляризацію неврови, що є звичайним етапом посттравматичної регенерації [8]. У свою чергу гіперваскуляризацію може спровокувати супутній запальний процес, а сполучнотканинна організація з оточуючими тканинами створює спайки, які іммобілізують трансплантат. У перші кілька днів після реконструкції нерва життєздатність клітин залежить виключно від дифузії метаболітів та енергетичних субстратів з оточуючих тканини [11]. Рівень метаболічної підтримки визначається довжиною трансплантата, тому некроз великих трансплантатів збільшується за межами адекватного обсягу перфузії або реваскуляризації [2, 14]. У такому аспекті проблеми реконструкції нерва найбільш сприятливим є використання аутогенного нерва, що забезпечує відповідне середовище для регенерації і не призводить до розвитку імунної реакції на трансплантат. На протидію цьому запропоновано

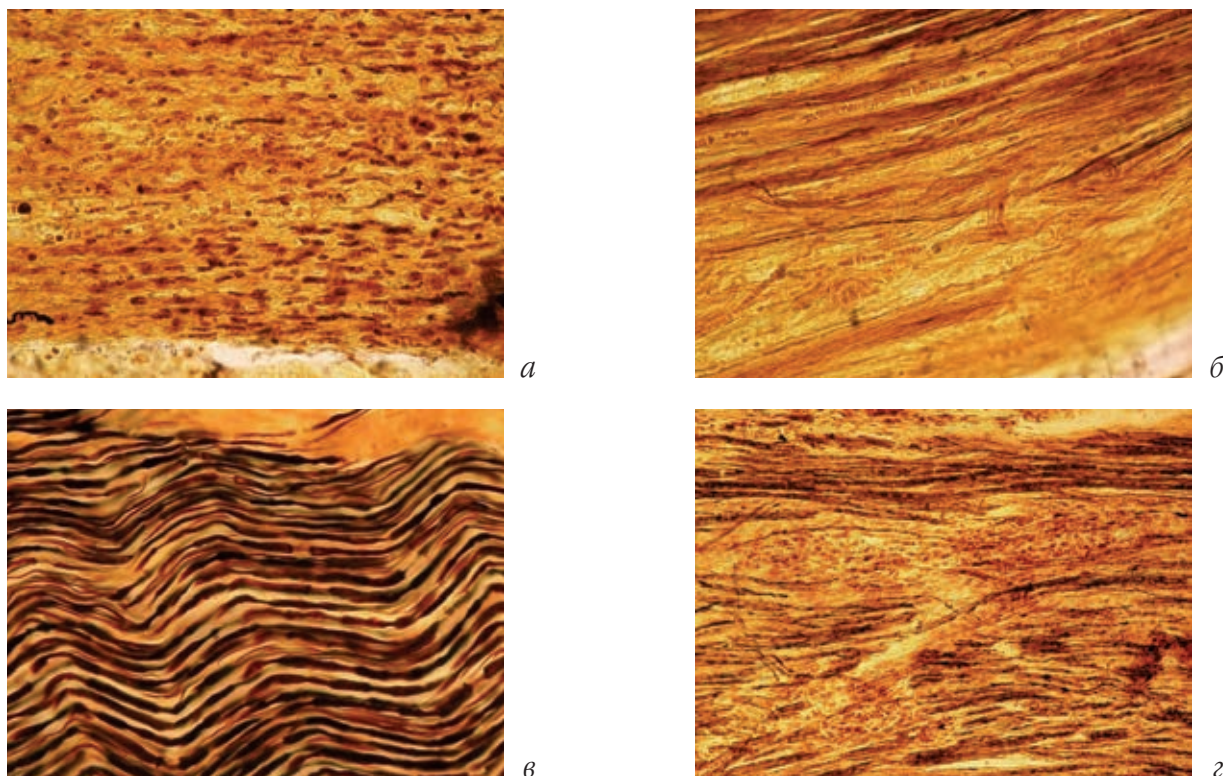


Рис. 3. Сідничний нерв щурів після реконструкції епіневральним швом та ВЧЕ. Низький рівень регенерації нервових волокон у дистальний сегмент нерва після нейрорафії епіневральним швом, після ВЧЕ нервові волокна реєструються лише в трансплантаті: а – контроль; б – епіневральний шов, дистальний сегмент; в – ВЧЕ, трансплантат; г – ВЧЕ, дистальний сегмент.

Імпрегнація сріблом. Об. 20, ок. 10

тубаж діастаза ушкодженого нерва, що особливо привабливо при відсутності матеріалу для реконструкції нерва та з точки зору доставки нейротрофічних та метаболіотропних засобів до регенеруючого нерва [6].

Таблиця 1

Регенерація нервових волокон у дистальному відділі сідничного нерва за умов аутопластики у щурів різних груп

| № з/п | Показники | Групи тварин | | |
|-------|--|---------------|-------------------------|--|
| | | I (n=5) | II (n=7) | III (n=8) |
| 1 | Щільність нервових волокон, од/мм ² | 10731,0±416,9 | 4949,3±491,0 | 2875,8±211,9 |
| | | t-критерій | p ₁₋₂ <0,001 | p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ <0,001 |
| 2 | Товщина мієлінової оболонки, мкм | 4,73±0,63 | 0,74±0,09 | – |
| | | t-критерій | p ₁₋₂ <0,001 | p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ =0,007 |
| 3 | Діаметр осевих циліндрів, мкм | 20,41±3,00 | 3,17±0,51 | – |
| | | t-критерій | p ₁₋₂ <0,001 | p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ =0,370 |
| 4 | Щільність гемокapілярів | 19,66±1,38 | 14,15±1,99 | 25,08±3,14 |
| | | t-критерій | p ₁₋₂ =0,008 | p ₁₋₃ =0,03 p ₂₋₃ =0,002 |

Використання васкуляризованого трансплантата нерва забезпечує кілька потенційних переваг:

1. уникнення ішемії;
2. необхідність реваскуляризації,
3. запобігання центральному некрозу.

Експериментальні дані показали, що нейрорафія васкуляризованим нервом дає більш високий результат, хоча переконливих клінічних доказів досі не наведено [13]. Отримані дані свідчать, що висока васкуляризація трансплантата і дистального сегмента нерва після ВЧЕ є результатом посттравматичної реакції сполучної тканини на термічне ушкодження і звичайно супроводжує явища інкапсуляції запального вогнища, чужорідних часток і обуглених дериватів тканин. Часткова регенерація, аномальна іннервація або некроз електрокоагульованого нерва візуально реєструються і не потребують додаткового оскарження та підтвердження.

Висновки

1. Реконструкція великих дефектів периферійного нерва ауто трансплантатом за умов епіневрального шва забезпечує відновлення на рівні 46,1% регенованих нервових волокон. Результат відновлення визначається ступенем гліального і сполучнотканинного рубця у проксимальному і дистальному шві реконструйованого нерва.
2. Високочастотне електроварування як спосіб з'єднання кінців не дозволяє отримати бажаного результату відновлення, здійснює повторне термічне ураження нерва, що завершується лізісом ураженого фрагмента реконструкції нерва.
3. Застосування мікрочірургічної техніки при лікуванні травматичних ушкоджень периферійного нерва сприяє відновленню його структури і функції, проте невисока ефективність реконструкції великих дефектів нерва потребує подальшого дослідження і розробки нових методів мікрочірургічного лікування травматичної хвороби периферійних нервів.

Література

1. Досвід застосування височастотного електроварування в ендокринній хірургії / *Нечитайло М. Ю., Литвиненко О. М., Гулько О. М. [та ін.]* // Клін. хірургія. – 2013. – № 8. – С. 5–8.
2. Challenges in sciatic nerve repair: anatomical considerations / *Burks S. S., Levi D. J., Hayes S., Levi A. D.* // *J. Neurosurg.* – 2014. – Vol. 121, № 1. – P. 210–218.
3. Changes of the donor nerve in end-to-side neurorrhaphies with epineurial window and partial neurectomy: a long-term evaluation in the rat model / *Liu H. F., Chen Z. G., Fang T. L. [et al.]* // *Microsurgery.* – 2014. – Vol. 34, № 2. – P. 136–144.
4. Fibrin glue mitigates the learning curve of microneurosurgical repair / *Whitlock E. L., Kasukurthi R., Yan Y. [et al.]* // *Microsurgery.* – 2010. – Vol. 30, № 3. – P. 218–222.
5. Functional motor recovery after peripheral nerve repair with an aligned nanofiber tubular conduit in a rat model / *Jim J., Park M., Rengarajan A. [et al.]* // *Regen Med.* – 2012. – Vol. 7, № 6. – P. 799–806.
6. Hypoglossal schwannoma-successful reinnervation and functional recovery of the tongue following tumour removal and nerve grafting / *Mathiesen T., Svensson M., Lundgren J. [et al.]* // *Acta Neurochir. (Wien).* – 2009. – Vol. 151, № 7. – P. 837–841.
7. *Lei T.* Prevention of facial nerve injury in acoustic neuroma microsurgery / *T. Lei, L. Li* // *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* – 2008. – Vol. 46, № 1. – P. 58–60.
8. *Ma X.* Facial nerve preservation in geniculate ganglion hemangiomas / *Ma X., Chen D., Cai L., Wang D.* // *Acta Otolaryngol.* – 2014. – Vol. 16. – P. 1–3.
9. Overall assessment of regeneration in peripheral nerve lesion repair using fibrin glue, suture, or a combination of the 2 techniques in a rat model. Which is the ideal choice? / *Martins R. S., Siqueira M. G., Da Silva C. F., Plese J. P.* // *Surg. Neurol.* – 2005. – Vol. 64, Suppl 1:S1:10–6; discussion S1:16.
10. *Payne S. H. Jr.* Nerve repair and grafting in the upper extremity / *S. H. Jr. Payne* // *J. South Orthop. Assoc.* – 2001. – Vol. 10, № 3. – P. 173–189.
11. Reverse end-to-side nerve transfer: from animal model to clinical use / *Kale S. S., Glaus S. W., Yee A. [et al.]* // *J. Hand Surg.* – 2011. – Vol. 36-A, № 10. – P. 1631–1639.
12. *Sadek A. F.* Functional and electrophysiological outcome after autogenous vein wrapping of primary repaired ulnar nerves / *Sadek A. F., Fouly E. H., Hamdy M.* // *Microsurgery.* – 2014. – Vol. 34, № 5. – P. 361–366.
13. *Sameem M.* A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair / *Sameem M., Wood T. J., Bain J. R.* // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2011. – Vol. 127, № 6. – P. 2381–2390.
14. Supercharged end-to-side anterior interosseous to ulnar motor nerve transfer for intrinsic musculature reinnervation / *Barbour J., Yee A., Kahn L. C., Mackinnon S. E.* // *J. Hand Surg.* – 2012. – Vol. 37-A, № 10. – P. 2150–2159.
15. The effect of autogenous vein grafts on nerve repair with size discrepancy in rats: an electrophysiological and stereological analysis / *Acar M., Kara calar A., Ayyildiz M. [et al.]* // *Brain Res.* – 2008. – Vol. 1198. – P. 171–181.
16. The proximal medial sural nerve biopsy model: a standardised and reproducible baseline clinical model for the translational evaluation of bioengineered nerve guides / *Bozkurt A., van Neerven S. G., Claeys K. G. [et al.]* // *Biomed Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 121452.
17. *Tse R.* Nerve glue for upper extremity reconstruction / *R. Tse, J. H. Ko* // *Hand Clin.* – 2012. – Vol. 28, № 4. – P. 529–5240.