

УДК 616.8.3

**ИНДЕКС НЕВРОТИЗАЦИИ И ПАРАМЕТРЫ МЯКОТНЫХ ВОЛОКОН  
В ПЕРЕСЕЧЕННОМ И РЕГЕНЕРИРУЮЩЕМ НЕРВЕ  
ПОСЛЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКОГО СКЛЕИВАНИЯ ТОРЦОВ ЕГО ОТРЕЗКОВ  
И МИКРОХИРУРГИЧЕСКОГО АНАСТОМОЗИРОВАНИЯ**

Н.А. Щудло (1), М.М. Щудло (1), И.В. Борисова (2), И.А. Мещерягина (1)  
e-mail: telemed@rncvto.kurgan.ru

(1) Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия»  
им. акад. Г.А. Илизарова, г. Курган, Россия

(2) ПНИЛ «Управляемые гисто– и органогенезы»  
Курганского филиала Южно–Уральского научного центра РАМН, г. Курган, Россия

Статья поступила 5 ноября 2001 г.

**Введение**

Повреждения нервов — частый вид травмы. По данным И.Г. Гришина [5] из 1167 микрохирургических операций, проведенных в ЦИТО за 18 лет, 500 выполнено на нервах конечностей. Функциональное восстановление нерва, оперированного по поводу анатомического перерыва, редко бывает полным [13]. Зарубежными и отечественными исследователями проводятся разнообразные разработки по оптимизации процесса регенерации нервной ткани [8, 18]. Клинические результаты операций определяются множеством разноуровневых регенераторных событий [16]. Важнейший фактор реституции — ориентация регенерирующих нервных волокон в зоне повреждения, их контактное и химическое ориентирование и жизнеобеспечение в «старых» и вновь формирующихся эндоневральных трубках и в органах–мишенях. На уровне спинальных ганглиев и спинного мозга полнота восстановления определяется явлениями клеточной смерти или внутриклеточной регенерации нейроцитов, на уровне соматосенсорной коры — адекватностью ее функциональной реорганизации. Многоуровневый подход необходим при проведении реабилитационной терапии. В момент операции на поврежденном нервном стволе главным является тщательное сопоставление пучков нервных волокон и других структурных компонентов. Для этой цели предложены разные способы проведения микрохирургической иглы и ультратонкой нити через оболочки нерва: эпиневральный, периневральный, межпучковый, интраневральный, эпи–периневральный [1]. Микрохирургический эпиневральный шов в одних руководствах [2] описывается как основной способ восстановления нервных стволов; в других акцентированы его недостатки: пучки нервных волокон трудно сопоставить, нередко между ними остается диастаз, который заполняется фибриновым сгустком, а затем рубцом [6]. Эпи–периневральный шов сложен в выполнении и не позволяет сопоставить пучки, расположенные в центре ствола. Периневральный шов, включающий продольное рассечение или циркулярную резекцию эпиневрия, диссекцию нерва на отдельные пучковые группы и наложение 1–2 швов калибра 10/0 на каждый пучок, травматичен, не учитывает морфо–физиологические особенности эпи–периневрального комплекса [7], а прецизионность такого способа сопоставления сомнительна [22]. Для улучшения сопоставления пучков при эпиневральной нейроррафии предлагалось проведение ультратонких швов через межпучковый эпиневральный шов [12]. Однако другие

авторы [2] подчеркивают, что нить нужно проводить только через наружный эпиневррий, не пытаясь захватить клетчатку между пучками и периневррий.

В РНЦ «ВТО» разработан способ реконструкции нерва [11], при котором трансневральные межпучковые швы используются в качестве провизорного; после выполнения дефинитивных эпи–периневральных швов его удаляют. Плазматическое склеивание сопоставленных провизорным швом поверхностей предотвращает заполнение диастаза между пучками нервных волокон сгустком крови — субстратом для формирования внутривольной невromы. Описаны качественные особенности репарации нерва после такого шва [10]. Для более детального изучения особенностей роста регенерирующих волокон через зону повреждения необходима гитоморфометрия, которая относится к числу стандартных методов изучения процесса регенерации нерва наряду с поведенческими и электрофизиологическими тестами. Цель данного исследования — сравнительная количественная оценка регенерации нервных волокон после восстановления нерва по разработанной методике или эпиневральным микрохирургическим швом.

## 1. Методика исследования

Эксперименты проведены на 6 взрослых беспородных собаках, оперированных под внутривенным комбинированным наркозом в асептических условиях. В экспериментах опытной (О) серии ( $n = 3$ ) правый седалищный нерв пересекали и анастомозировали по оригинальной [11] методике: концы нерва сближали трансневральным провизорным швом до контакта и плазматического склеивания торцов пучков нервных волокон, а затем накладывали дефинитивные эпи–периневральные швы по всей окружности анастомоза. В контрольной (К) серии ( $n = 3$ ) выполняли стандартный микрохирургический эпиневральный шов нерва. Через 3–4 месяца животных выводили из опыта передозировкой барбитуратов. Иссекали кусочки оперированного седалищного нерва на 10 мм дистальнее (Д) и прокси–мальнее (П) линии швов; после альдегидно–осмиевой фиксации материал по стандартной методике заливали в эпоксидные смолы. Поперечные полутонкие срезы толщиной 1 мкм получали на ультратомах фирмы LKB (Швеция) и после специальной обработки [9] окрашивали метиленовым синим и основным фуксином. Используя исследовательские микроскопы фирмы «Opton» (Германия) и аппаратно–программный комплекс «ДиаМорф» (Москва), с каждого уровня оцифровывали от 30 до 80 полей зрения — более 5 % площади пучка [14] с изображениями не менее 500 мягкотных нервных волокон (МНВ). Определяли численную плотность их профилей ( $NA_{\text{МНВ}}$ ), рассчитывали индекс невротизации — отношение  $NA_{\text{МНВ}}$  дистальнее и проксимальнее анастомоза. По правилу эквивалентного круга измеряли диаметры МНВ ( $D_{\text{МНВ}}$ ) и их аксонов; рассчитывали число  $G$  как отношение диаметра осевого цилиндра к диаметру волокна [20] и среднюю толщину миелина ( $L_{\text{миел}}$ ). Для сравнения с нормой морфометрировали полутонкие срезы седалищных нервов 3 интактных собак.

## 2. Результаты

Гистоморфометрические характеристики седалищного нерва интактных собак и человека [14] сопоставимы. Численная плотность профилей нервных волокон в доминантных пучках варьировала от 9 до 12 тыс на  $1 \text{ мм}^2$ . Распределение МНВ по диаметру бимодально: первый пик находится в диапазоне 2,1–4,0 мкм, а второй — 8,1–10,0 мкм. Распределение их по калибру унимодально, причем мелких (мел) волокон ( $< 4$  мкм диаметром) не более 25 %, средних (ср — 4,1–7,0 мкм) — не более 40 %, а крупных (кр  $> 7$  мкм) — от 35 до 60 %. Самые крупные МНВ имеют диаметр 14–16 мкм, единичные превышают 18 мкм в диаметре, но встречаются они не у всех индивидов. Число  $G$  в разных фракциях варьирует от 0,69 до 0,75.

Как видно из табл. 1, через 3–4 месяца после операции у всех животных  $NA_{\text{МНВ}}$  проксимальнее линии шва превысила интактную норму в 1,5–2 раза. Срезы проксимального отрезка нерва помимо зрелых МНВ содержали большое количество волокон малого диаметра с повышенным индексом аксон/миелин, многие из них располагались в кластерах. В дистальном отрезке нерва в экспериментах с эпиневральным швом численная плотность профилей мягкотных волокон и индекс невротизации достоверно выше, чем в опытной серии.

Дистальнее зоны швов (табл. 2) доля мелких МНВ ниже, а доли средних и крупных — выше в опытной серии. Во фракции крупных МНВ выше максимальный и средний диаметры, средняя толщина миелина.

Таблица 1

**Численная плотность профилей МНВ ( $M \pm m$ ) дистальнее (Д)  
и проксимальнее (П) зоны швов**

Серия– №№ собак	Срок эксперимента	$N_{\text{МНВ}} (M \pm m)$		Д/П (индекс невротизации)
		Д	П	
О–0914	4 мес.	20833 ± 784	15103 ± 843	1,4
О–0922	3 мес.1 нед.	28333 ± 1480	22967 ± 1319	1,2
О–1310	3 мес.	24643 ± 1066	24556 ± 1268	1,0
К–2035	4 мес.	33677 ± 1252	21267 ± 921	1,6
К–2607	4 мес.	37364 ± 1356	15000 ± 1222	2,5
К–2231	4 мес.	39833 ± 1825	23533 ± 1855	1,7

По данным табл. 1 и 2 с помощью программы Microsoft Excel 97 (статистические тесты запрограммированы И.П. Гайдышевым [3] на алгоритмическом языке С++ и помещены в динамически подключаемую библиотеку) был выполнен статистический расчет по критерию рандомизации компонент Фишера и критерию Вилкоксона. Выбор непараметрических критериев обусловлен малой численностью выборок. Установлено, что различия между группой выборок 0914, 0922, 1310 и группой выборок 2035, 2231, 2607 по параметрам  $N_{\text{МНВП}}$  и  $G_{\text{средн}}$  статистически недостоверны,  $p > 0,05$ . Для всех остальных параметров различия статистически достоверны на уровне значимости  $p < 0,05$ .

Таблица 2

**Численно–размерный состав МНВ дистальнее зоны швов**

Серия и №№ собак	$n_{\text{МНВ}}$	$D_{\text{МНВ}} (M \pm m)$	Распределение (%) МНВ по калибрам			Характеристики фракции крупных волокон			
			мел	ср	кр	$D_{\text{макс}}$	$D_{\text{средн}}$	$L_{\text{миел}}$	$G_{\text{средн}}$
О–0914	500	4,79 ± 0,07	35,8	54,8	9,4	10,4	7,91 ± 0,11	1,64 ± 0,03	0,792 ± 0,004
О–0922	510	4,04 ± 0,07	55,5	41,4	3,1	9,2	7,91 ± 0,16	1,47 ± 0,06	0,813 ± 0,007
О–1310	511	5,16 ± 0,1	35,8	42,7	21,5	11,0	8,28 ± 0,88	1,83 ± 0,04	0,778 ± 0,003
К–2035	500	3,76 ± 0,05	63,4	35,8	0,8	7,4	7,27 ± 0,07	1,38 ± 0,14	0,810 ± 0,022
К–2607	503	3,91 ± 0,07	57,4	40,2	2,4	8,1	7,49 ± 0,09	1,30 ± 0,05	0,825 ± 0,007
К–2231	507	3,96 ± 0,06	59,6	37,6	2,8	8,8	7,71 ± 0,14	1,40 ± 0,07	0,816 ± 0,011

Ширина прецизионной гистограммы распределения мягкотных волокон по диаметру (табл. 3, рис. 1) на 1–2 класса больше в опытной серии.

Таблица 3

**Распределение (%) регенерировавших МНВ по диаметрам (интервал = 1 мкм)**

Серия– №№ собак	Интервалы									
	1,1–2,0	2,1–3,0	3,1–4,0	4,1–5,0	5,1–6,0	6,1–7,0	7,1–8,0	8,1–9,0	9,1–10,0	10,1–11,0
О–0914	0,2	15,8	21,8	21,8	16,2	14,8	6,4	2,4	0,4	0,2
О–0922	5,5	26	24,1	16,9	16,1	8,2	2,2	0,8	0,2	0,0
О–1310	4,1	14,9	16,8	16,6	12,3	13,8	11	5,7	4,1	0,7
К–2035	5,20	29	29,20	20,80	11,60	3,60	0,60	0,0	0,0	0,0
К–2231	5,2	23,7	31,0	19,3	13,8	4,5	2,2	0,6	0,0	0,0
К–2607	8,90	26,60	21,90	16,50	16,10	7,60	2,20	0,20	0,0	0,0

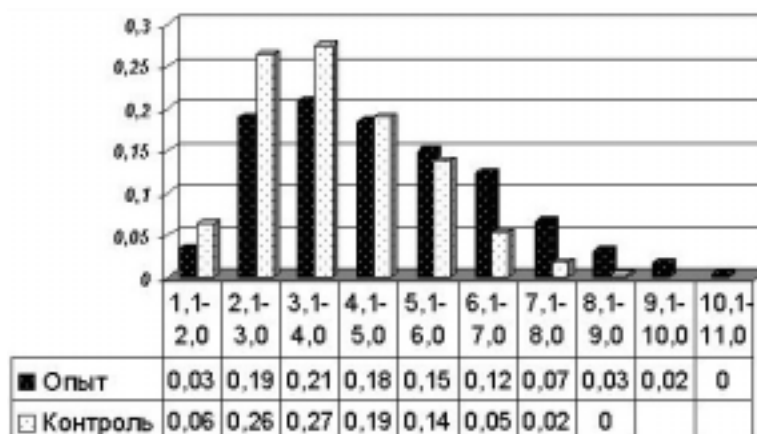


Рис. 1. Усредненные гистограммы распределения регенерировавших МНВ по диаметру в опытной ( $N = 1521$ ) и контрольной ( $N = 1510$ ) сериях

По данным табл. 3 с помощью программы Microsoft Internet Explorer 5.5 (алгоритм запрограммирован [3] на алгоритмическом языке JavaScript) И.П. Гайдышевым выполнен статистический расчет по непараметрическому критерию Колмогорова–Смирнова. Значение статистики критерия равно 0,07. Установлены статистически достоверные различия эмпирических функций распределения между группой выборок 0914, 0922, 1310 (общая численность 1521) и группой выборок 2035, 2231, 2607 (общая численность 1510) на уровне значимости  $p < 0,01$ .

### 3. Обсуждение

К.А. Григорович [4], ссылаясь на многочисленные эксперименты на разных видах животных, указывает, что чем больше протяженность рубца между концами сшитого нерва, тем меньше регенерирующих аксонов прорастает в периферический отрезок. Если же длина диастаза превышает определенный критический предел, то регенерирующие аксоны вообще не могут достичь дистального отрезка [15]. При заполнении диастаза длиной 4 мм фибриновым сгустком индекс невротизации составляет около 70 % [19]; при этом отмечено нарушение ориентации регенерирующих осевых цилиндров, что, по-видимому, предопределяется случайной ориентацией фибриновых нитей. Ранее нами было показано, что аккуратное сближение пучков нервных волокон провизорным швом обеспечивает их плазматическое склеивание, профилактирующее образование внутривольной гематомы и обеспечивающее продольную ориентацию регенерирующих волокон [11]. По-видимому, при сближении пучков нервных волокон до контакта в соединяющем их фибриновом сгустке появляются нити, которые прикрепляются концами к противоположным раневым поверхностям и ориентируются продольно при ретракции сгустка. Результаты данного исследования показывают, что при наличии диастаза в 1—2 мм (в серии с микрохирургическим эпинеуральным швом) *NA* регенерировавших МНВ в дистальном отрезке и индекс невротизации оказываются более высокими, чем при сопоставлении до контакта пучков нервных волокон (опыт). По мнению L. de Medinacelli et al. [17] индекс невротизации отражает интенсивность регенераторного роста нервных волокон: если он меньше единицы, невротизация неудовлетворительная, значение 1 является «нормальным», если превышает единицу — это отражает ветвление аксонов в зоне анастомоза, что, по мнению авторов, не является «необходимо полезным».

В интактном седалищном нерве численно–размерный состав МНВ характеризуется преобладанием крупных волокон. Следовательно «необходимо полезными» параметрами регенерации следует считать те, которые отражают восстановление фракции крупных волокон. К 3—4 месяцам, как известно из литературы [23], мягкотных нервных волокон толще 10 мкм в дистальном отрезке регенерирующего нерва нет при любом способе восстановительной операции. В нашем исследовании они были единичны в опытной и совсем не встретились в контрольной серии. Доля волокон толще 7 мкм достоверно выше в опытной серии, степень дифференцировки этих

волокон также выше, о чем свидетельствуют их максимальный и средний диаметры, средняя толщина миелина, число G.

Таким образом, микрохирургический эпинеуральный шов создает условия для интенсивного ветвления регенерирующих нервных волокон на уровне анастомоза, а применение разработанной методики реконструкции нерва способствует заметному ускорению их роста в длину и толщину, особенно если учесть, что в опытной серии в 2-х случаях из 3-х сроки эксперимента на 3—4 недели меньше, чем в контрольной. По-видимому, различна не только структура соединяющего концы нерва фибринового сгустка, но и последующие условия микроокружения. В литературе [8, 16], посвященной молекулярно-биологическим механизмам регенерации нерва, приводятся данные о том, что продвижение конуса роста аксона определяется нейрит-стимулирующими факторами *in vivo* так же, как *in vitro*; ветвление аксональных отростков либо их элонгация могут быть стимулированы отдельно, добавлением в культуральную среду ламинина либо гепаран-сульфата. В наших экспериментах *in vivo* преобладание одной из обозначенных тенденций регенераторного роста аксонов определялось способом восстановительной операции на нерве.

## Заключение

Представленные результаты свидетельствуют, что небольшой протяженности рубец между концами регенерирующего нерва (при эпинеуральной микрохирургической нейроррафии) может способствовать не снижению, а увеличению численности аксонов, невротизирующих дистальный отрезок, за счет их интенсивной арборизации. Специальные микрохирургические приемы, обеспечивающие сближение основных пучков нервных волокон до контакта, позволяют улучшить не только ориентацию регенерирующих волокон, но и условия их дифференцировки. Полученные данные имеют теоретическое и практическое значение.

## Список литературы

1. Белоусов А.Е., Ткаченко С.С. Микрохирургия в травматологии и ортопедии. — Л.: Медицина, 1988. — 224 с.
2. Берснев В.П., Давыдов Е.А., Кондаков Е.Н. Хирургия позвоночника, спинного мозга и периферических нервов. — СПб.: Специальная литература, 1998. — 368 с.
3. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. — СПб.: Питер, 2001. — 752 с.
4. Григорович К.А. Хирургическое лечение повреждений нервов. — Л.: Медицина, 1981. — 302 с.
5. Гришин И.Г. Микрохирургия в травматологии и ортопедии: достижения, нерешенные вопросы и перспективы // *Анналы травматологии и ортопедии*. — 1993. — № 1. — С. 23—28.
6. Дольницкий О.В., Дольницкий Ю.О. Атлас микрохирургических операций на нервах: Практическое руководство. — Киев: Выща школа, 1991. — 182 с.
7. Коваленко В.Л., Шевцов В.И., Щудло М.М., Щудло Н.А. Реактивные свойства эпи- и периневрия и экспериментально-морфологическое обоснование техники шва нервов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2000. — Т. 130, № 8. — С. 211—215.
8. Чайковский Ю.Б. Регенерационная неврома // *Морфология*. — 1999. — Т. 15, № 1. — С. 55—67.
9. Щудло М.М. Целлоидинирование полутонких срезов большой площади для предупреждения образования складок при окраске // *Архив патологии*. — 1982. — Т. XLIV, № 11. — С. 66—67.
10. Щудло М.М. Реактивные свойства тканевых компонентов периферического гемато-неврального барьера и их роль в репаративной регенерации нервных стволов: дис. докт. мед. наук. — Курган, 1999. — 208 с.
11. Щудло М.М., Щудло Н.А., Сайфутдинов М.С., Сизова Т.В. Экспериментально-морфологическое обоснование возможности удлинения сшитого нервного ствола // *Травматология и ортопедия России*. — 1995. — № 5. — С. 56—60.
12. Braun R.M. Epineurial Nerve Suture // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. — 1983. — Vol. 163, № 3. — P. 50—56.

13. Eberhard D., Koller R., Rath R., Millesi H. Long Term Results of Peripheral Nerve Repair in Children: Abstr. 3<sup>rd</sup> Congr. Eur. Fed. Soc. Microsurg., Berlin, Apr. 17—19, 1996 // *Microsurgery*. — 1996. — Vol. 17, No 2. — P. 60—61.
14. Fiola M.R. Peripheral Nerve Morphometry for Daily Practice // *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 1985. — Vol. 7, No 4. — P. 299—304.
15. Lundborg G. Nerve Regeneration and Repair. A review // *Acta Orthop. Scand.* — 1987. — Vol. 58, No 2. — P. 145—169.
16. Lundborg G., Dahlin L., Danielsen N., Zhao Q. Trophism, Tropism and Specificity in Nerve Regeneration // *J. of Reconstructive Microsurgery*. — 1994. — Vol. 10, No 5. — P. 345—353.
17. de Medinaceli L., Khoury R.A., Merle M. Large Amounts of Polyglactic Acid in Contact with Divided Nerve Sheaths have no Adverse Effects on Regeneration // *J. of Reconstructive Microsurgery*. — 1995. — Vol. 11, No 1. — P. 43—49.
18. Orgel M.G. Experimental Studies with Clinical Applications to Peripheral Nerve Injury: A Review of the Past Decade // *Clin. Orthop.* — 1982. — Vol. 163, No 2. — P. 98—104.
19. Pallazi S., Vila-Torres J., Lorenzo J.C. Fibrin Glue is a Sealant and Not a Nerve Barrier // *J. of Reconstructive Microsurgery*. — 1995. — Vol. 11, No 2, March. — P. 135—139.
20. Schmitt F.O., Bear R.S. The Optical Properties of Vertebrate Nerve Axons Related to Fiber Size // *J. Cell Comp. Physiol.* — 1937. — Vol. 9, No 3. — P. 261—273.
21. Shen N., Zhu J. Experimental Study Using a Direct Current Electrical Field to Promote Peripheral Nerve Regeneration // *J. of Reconstructive Microsurgery*. — 1995. — Vol. 11, No 3. — P. 189—193.
22. Symposium "Peripheral Nerve Surgery Today", Part 2. Vienna, Austria. November 23—26, 1991. Part 2. Coaptation // *J. of Reconstr. Microsurg.* — 1994. — Vol. 10, No 2. — P. 125.
23. Yamano Y. Experimental Study of Interfascicular Grafts in the Peroneal Nerve of the Rabbit // *Arch. Orthop. Traumat. Surg.* — 1981. — Vol. 97. — P. 97—103.