

УДК 615 – 032: 616.8 – 009

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВИТАМИНОВ В9 И Е НА ПОСТТРАВМАТИЧЕСКУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ НЕРВА**Щудло Н.А., Щудло М.М.***ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, Курган, e-mail: nshchudlo@mail.ru*

С целью оценки влияния перорального приёма фолиевой кислоты и токоферола ацетата на посттравматическую регенерацию периферического нерва у 20 восьмимесячных крыс линии Wistar мужского пола выполнены полная перерезка и микрохирургический шов седалищного нерва. В опытной группе (n = 10) животные получали витамины в течение первого месяца после операции, остальные (n = 10) составили контрольную группу. Сравнительно оценены нейротрофические расстройства, седалищный функциональный индекс, гистоморфометрические показатели дистального отрезка нерва. Частота нейротрофических расстройств была достоверно больше в контрольной группе (5 из 10 против 0 из 10). Через месяц после операции численная плотность эндоневральных сосудов и миелинизированных нервных волокон в опыте больше, чем в контроле (в 4 и 2 раза соответственно). Через 4 месяца по среднему диаметру регенерирующих миелинизированных волокон и средняя толщина их миелиновых оболочек были также больше в опыте – на 10% и 28% соответственно. Индексы размаха пальцев достоверно лучше в опыте. Вывод о клинически значимом нейрорегенеративном и антиульцерогенном эффекте терапии.

Ключевые слова: нерв, регенерация, фолиевая кислота, α-токоферол**EXPERIMENTAL RESEARCH OF THE INFLUENCE OF VITAMINS B9 AND E ON POSTTRAUMATIC NERVE REGENERATION****Shchudlo N.A., Shchudlo M.M.***FSBI Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» (RISC RTO) of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: nshchudlo@mail.ru*

Full sciatic nerve transection and immediate microsurgical repair were performed in 20 eight month male Wistar rats with the aim of assessment the effects of per os folic acid and tocoferol acetate supplement on peripheral nerve regeneration. Animals in experimental group (n = 10) received vitamins supplements during the first postoperative month, the others without therapy constituted control group (n = 10). Neurotrophic disturbances, sciatic functional indexes and histomorphometric parameters of regenerated sciatic nerve distal stump were compared. The incidence rate of heel skin erosions and ulcers was bigger in control group (five from 10 against 0 in experimental group). In one month after operation the endoneurial vessels and myelinated regenerated nerve fibers numerical densities were bigger in experimental group (4 and 2 times respectively). In four months the average regenerated nerve fibres diameters and myelin sheaths width in this group also surpassed the control – at 10% and 28% respectively. Toe spread indexes were significantly better in experimental group. Conclusion about clinically useful neuroregenerative and anti-ulcerogenic effects of the therapy.

Keywords: nerve, regeneration, folic acid, α-tocopherol

Целесообразность и эффективность назначения поливитаминных препаратов в лечении травм периферических нервов нередко подвергается сомнению из-за возможного эффекта плацебо, а также вероятности взаимной нейтрализации витаминов, что является основанием для проведения прицельных экспериментальных исследований. Установлено выраженное эпигенетическое стимулирующее действие витамина В9 (фолиевой кислоты) на регенерацию спинного мозга [5] и двигательных нервов [8]. При токсической нейропатии регенеративные эффекты В9 потенцировались витамином Е [4]. Эффекты их сочетанного применения на посттравматическую нейрорегенерацию не изучены.

Цель исследования – экспериментальное выявление возможного влияния витаминов В9 и Е на посттравматическую регенерацию седалищного нерва крыс.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили 23 крысы линии Wistar мужского пола восьмимесячного возраста; средний вес – 340 г. Животных содержали в двухэтажных проволочных клетках с гладким дном и подстилкой из сосновых стружек в контролируемых гигиенических условиях при свободном доступе к воде и стандартному для лабораторных крыс корму. 20 крыс после пересечения и эпи-периневрального микрохирургического шва седалищного нерва рандомически распределены поровну между опытной и контрольной группами. Животные опытной группы со второго дня после операции в течение одного месяца получали фолиевую кислоту с питьевой водой (4 mg/100 g) и α-токоферол-ацетат с кормом (50 mg/100 g). 3 крысы составили интактную группу для сравнительного гистоморфометрического анализа.

Хирургическое вмешательство Крыс оперировали в асептических условиях под общей анестезией, которая достигалась внутримышечным введением гидрохлорида ксилазина (0,8 mg/100 g) и тилетамина/золазепама (0,4 mg/100 g). Правый седалищный нерв обнажали через латеральный кожно-мышечный до-

ступ, аккуратно пересекали прямыми микроножницами на 1 см дистальнее седалищной вырезки и под операционным микроскопом (OPMI-6, Germany) инструментами Aescular и нитями нейлон 10-0 (Ethilon, Ethicon Ltd., UK) сшивали по обоснованной ранее [1] стандартной методике: проводили один межфасцикулярный шов для сопоставления основных пучков нервных волокон и сосудов внутреннего эпинеурия, затем накладывали 6-7 герметизирующих эпинеуральных швов с захватом подлежащего перинеурия.

Экспериментальные наблюдения – мониторинг общего состояния (двигательная активность, аппетит, питьевое поведение) и патологических изменений оперированной конечности (слабость, атаксия, признаки трофических расстройств, нейропатическое поведение, нарушения позиционирования стопы).

Функциональная оценка Модифицированный вариант седалищного функционального индекса по van Neerven S.G. et al. [10] – дефицит размаха пальцев – оценивали по трём параметрам: медиальный размах пальцев (между первым и вторым пальцами), интермедиарный размах (между вторым и четвёртым пальцами) и латеральный размах (между четвёртым и пятым пальцами) оперированной и контрлатеральной конечностей. Параметры измеряли с помощью миллиметровой шкалы и вычисляли отношение значений оперированной и контрлатеральной конечностей.

Морфологическая оценка Животные эвтаназированы через 1 и 4 месяца после операции. Образцы нервов после альдегидно-осмиевой фиксации и проводки заключены в эпоксидные смолы, полутонкие срезы получены с трёх уровней: седалищного нерва – на 5 мм проксимальнее и дистальнее шва, а также большеберцового нерва – на уровне средней трети голени. Срезы толщиной 0.5-1.0 мкм изготовлены с помощью стеклянных ножей на ультрамикротоме «Nova» LKB (Швеция), смонтированы на стеклах, окрашены толуидиновым синим и по Уикли метиленовым синим-основным фуксином. Их просматривали и получали цифровые изображения на фотомикроскопе «Opton» (Германия), соединённом с аппаратно-программным комплексом «DiaMorph» (Россия, Москва) при

инструментальном увеличении 1250х. Серия из 25 изображений эндоневрия каждого нерва использована для морфометрического анализа. Оценивали численные плотности эндоневральных кровеносных сосудов (NAmv), ядер эндоневральных клеток (NAnc), миелинизированных регенерирующих (NAmf) и дегенерирующих (NAmf-deg) нервных волокон. Выборку из 400 миелинизированных волокон с каждого нерва формировали для измерения диаметров волокон (Dmf), их аксонов (Dax) и толщины миелиновых оболочек (Lm). Статистическая обработка выполнена в компьютерной программе Attestat версия 9.3.1 (разработчик И.П.Гайдышев, сертификат о регистрации в Роспатенте No. 2002611109) с использованием критериев Барнарда, Манна-Уитни и Пагуровой.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспериментальное наблюдение Все крысы выжили после операции и были активны до конца эксперимента. Частота эрозий кожи и язв пяточной области была достоверно больше в контрольной группе (5 из 10 против 0 из 10 – $p < 0,05$). Нарушения позиционирования стопы – тоническая подошвенная флексия пальцев с опорой на дорзальную поверхность пальцев либо на латеральный край стопы – наблюдались у трёх крыс из 10 в контроле и одной из 10 в опыте ($p > 0,05$). Эти животные были исключены из тестов по определению размаха пальцев.

Функциональная оценка Через месяц после операции разница между опытом и контролем по седалищному функциональному индексу неотчётлива. К концу опыта индексы медиального и латерального размаха пальцев (рис. 1) достоверно больше в опытной группе ($p < 0,05$).

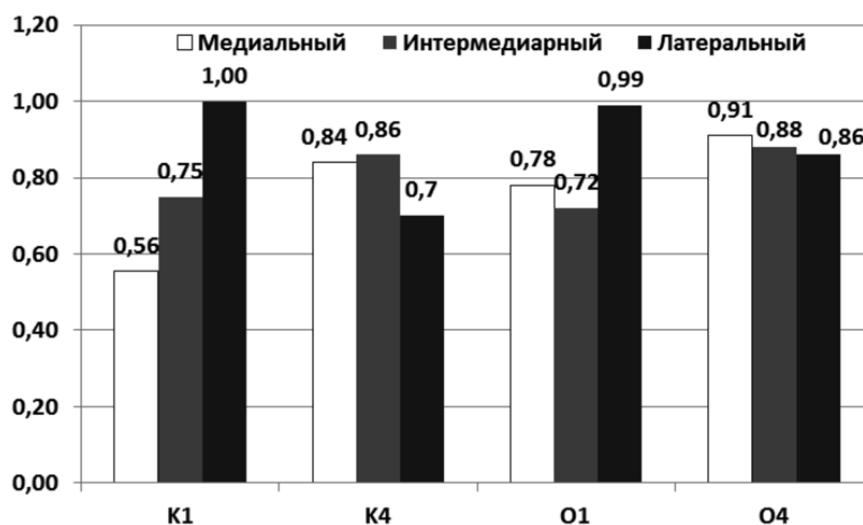
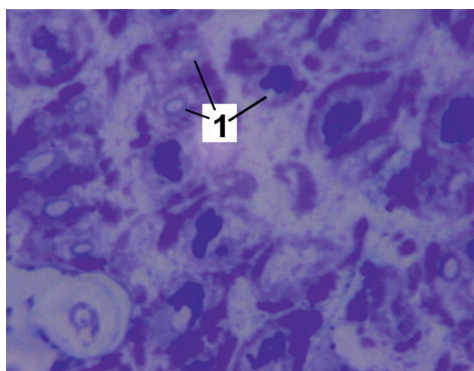


Рис. 1. Изменения индекса размаха пальцев оперированной конечности через 1 месяц и 4 месяца после операции у животных контрольной (K1, K4) и опытной (O1 и O4) групп

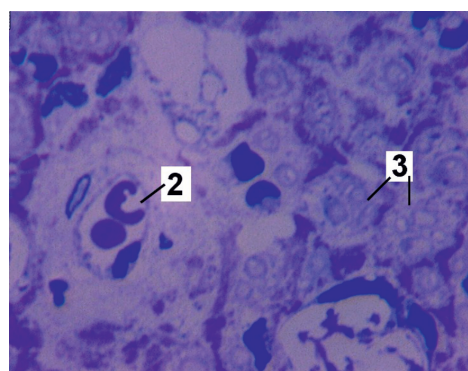
Гистологические исследования Через месяц после операции регенерирующие волокна выявлены в эндоневрии дистального отрезка седалищного нерва (рис. 2, а, б) и в большеберцовом нерве – на 50-70 мм дистальнее уровня швов. В эндоневрии сохранялись локусы резидуального отёка, некоторые эндоневральные трубки содержали детрит нервных волокон – результат неполной уборки продуктов первичной либо вторичной валлеровской дегенерации. Через четыре месяца после операции эндоневрий приобрёл обычный вид (рис. 3, а, б), в обеих группах повысилась степень дифференцировки безмиелиновых и миелинизированных волокон.

Морфометрические исследования Через месяц после операции в опытной группе численная плотность эндоневральных сосу-

дов и миелинизированных нервных волокон достоверно больше, чем в контроле (в 4,07 и 2,08 раза соответственно), но меньше численная плотность дегенерирующих волокон (в 1,63 раза). Различия между опытом и контролем по размерным параметрам регенерирующих миелинизированных волокон недостоверны. По сравнению с интактным нервом дистальный отрезок регенерирующего седалищного нерва в контрольной группе имеет меньшую численность эндоневральных сосудов (в 1,27 раза), а в опыте этот параметр увеличен в 2,94 раза. Различно соотношение численной плотности регенерирующих миелинизированных волокон с интактным нервом: в контроле параметр в 2,04 раз меньше, чем в интактном нерве, в опыте сопоставим с ним.



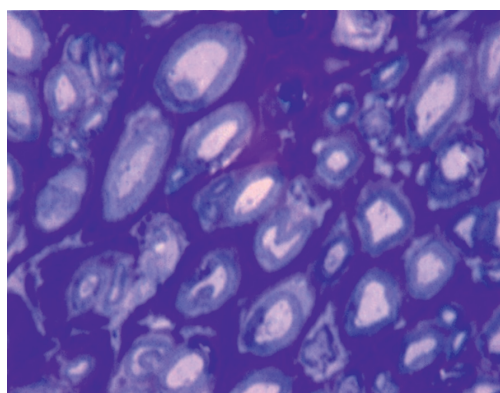
а



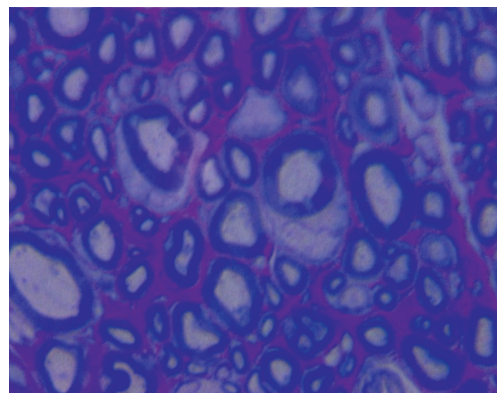
б

Рис. 2. Фрагменты полутонких срезов дистального отрезка регенерирующего нерва через 1 месяц после операции: а – контроль, б – опыт. 1 – регенерирующие миелинизированные волокна, 2 – эндоневральный кровеносный сосуд, 3 – эндоневральные трубки, невротизированные пучками миелинизирующихся регенерирующих аксонов (явления спраутинга).

Окраска по Уикли. Увеличение 1250х



а



б

Рис. 3. Фрагменты полутонких срезов дистального отрезка регенерирующего нерва через 4 месяца после операции: а – контроль, б – опыт. Окраска по Уикли. Увеличение 1250х

Морфометрические параметры интактного и регенерирующего седалищного нерва крыс

Группа	Среднее арифметическое (стандартное отклонение)						
	NAmv (мм ²)	NAnc (мм ²)	NAmf (мм ²)	NAmf-Deg (мм ²)	Dmf (мкм)	Lmyel (мкм)	Dax (мкм)
Интактные	83 (18)	1862 (1807)	19379 (7766)	138 (135)	6,20 (2,58)	1,29 (0,64)	3,61 (1,54)
1 месяц после операции							
Контроль	60 (14)	13857 (3739)	9500 (3057)	4786 (2082)	2,12 (0,46)	0,40 (0,09)	1,33 (0,38)
Опыт	244 (149) **	12500 (5867)	19714 (6944) ***	2929 (1639) *	2,01 (0,58)	0,45 (0,15)	1,11 (0,38)
4 месяца после операции							
Контроль	171 (50)	11667 (2646)	36273 (9613)	778 (103)	3,71 (1,50)	0,72 (0,26)	2,28 (1,14)
Опыт	160 (72)	11273 (3036)	40363 (6845)	727 (208)	4,10 (1,65) *	0,92 (0,37) ***	2,25 (1,13)

Отличия опыта от контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Через четыре месяца численная плотность эндоневральных сосудов в опытной группе снизилась по сравнению с предыдущим сроком, средний диаметр регенерирующих миелинизированных волокон и толщина их миелиновых оболочек достоверно (в 1,1 и 1,28 раз) превысили показатели контроля. По сравнению с интактным нервом в контроле и в опыте существенно увеличены численная плотность эндоневральных сосудов (в 2,06 и в 1,93 раза соответственно) и миелинизированных нервных волокон (в 1,87 раза и 2,08 раза соответственно). Средние морфометрические параметры миелинизированных волокон в опыте и контроле не достигли значений интактного нерва, однако по вариативности их диаметров опытная группа была сопоставима с интактным нервом.

Использованная в данном исследовании витаминотерапия на ранней стадии регенерации усиливает эндоневральную гиперваскуляризацию, повышает численную плотность миелинизированных аксонов и снижает численную плотность вторично дегенерировавших нервных волокон, что свидетельствует об улучшении условий для отрастания регенерационных спрутов и выживания аксонов. Через четыре месяца после операции происходит редукция гиперваскуляризации эндоневрия и улучшаются показатели миелинизации. за счёт ускорения процесса валлеровской дегенерации, усиления эндоневральной васкуляризации, спраутинга и миелинизации регенерирующих нервных волокон. По данным J.C. Mira [9], после полной перерезки и шва седалищного нерва крыс средние диаме-

тры регенерирующих миелинизированных волокон никогда не превышают 50-55% нормы. В нашей контрольной группе они составляли 59,8% от показателя интактного нерва; а в опытной группе – 66,1%. Увеличение этих значений важно прежде всего с учётом установленной корреляции среднего диаметра регенерирующих миелинизированных волокон со скоростью проведения по нерву [7], а также и клиническими данными [6]. В опытной группе к концу эксперимента вариативность диаметров нервных волокон приблизилась к соответствующему показателю интактного нерва – аналогичные изменения происходят в процессе онтогенеза и приводят к информационным показателям (энтропии, организации и избыточности), характеризующих нерв как канал связи [3].

Снижение тяжести денервационно-реиннервационного синдрома и лучшие показатели функционального восстановления реиннервированной конечности в наших экспериментах с применением фолиевой кислоты и α -токоферола ацетата позволяют предположить, что полученные результаты могут быть использованы в клинических испытаниях аналогичной витаминотерапии при разных видах повреждений нервов, прежде всего – при нарушениях чувствительности кожи стопы и в комплексном лечении нейрогенных трофических язв пяточной области.

Заключение

Витамины B9 и E при пероральном назначении обладают нейрорегенеративным и антиульцерогенным эффектом.

Список литературы

1. 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.
2. Щудло Н.А., Филимонова Г.Н., Панасенко С.В., Виноградова О.А. Численно-размерный состав мышечных волокон передней большеберцовой мышцы при регенерации пересеченного седалищного нерва собак в условиях нейтрального и дистракционного остеосинтеза // Гений ортопедии, 2007. № 3. С. 22-26.
3. Варсегова Т.Н. Возрастная динамика морфометрических показателей большеберцового нерва собак // Морфология. 2012. Т. 142. № 6. С. 036-040.
4. Aluclu M.U., Tuncer M.C., Guzel A., Aluclu M.A., Akkus M. The Effects of Valproic Acid on Sciatic Nerve of Fetal Rats and Protective Effects of Folic Acid and Vitamin E // Int. J. Morphol., 2009. V.27, № 2. P. 285-294.
5. Fouda A.A.E.H. Effect of folic acid administration on in vivo motor nerves regeneration // J. of American Science, 2011. V.7, № 12. P. 11-19.
6. Hassan K.M. Histomorphometric Analysis of Nerve Biopsies in the Two-Stage Cross-Face Free Muscle Transfer for Facial Reanimation with Correlation to the Functional Outcome // J. Plast. Reconstr. Surg., 2013. V.37, № 1. P. 131-138.
7. Ikeda M., Oka Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration // Brain Behav., 2012. V. 2, № 4. P. 382-390.
8. Iskandar B.J., Rizk E., Meier B., Hariharan N., Bottiligieri T., Richard H., Finnell R.H., Jarrard D.F., Banerjee R.V., Pate Skene J.H., Nelson A., Patel N., Gherasim C., Simon K., Cook T.D., Kirk J., Hogan K.J. Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation // J. Clin. Invest., 2010. V.120, № 5. P. 1603-1616.
9. Mira J.C. Quantitative studies on the regeneration of myelinated nerve fibers. II. Variations of the number and size of regenerating nerve fibers after localized crushing or total section // Arch. Anat. Microsc. Morphol., 1976. V. 65, № 4. P. 255-846.
10. van Neerven S.G., Bozkurt A., O'Dey D.M., Schefel J., Boecker A.H., Stromps J.P., Dunda S., Brook G.A., Pal-lua N. Retrograde tracing and toe spreading after experimental autologous nerve transplantation and crush injury of the sciatic nerve: a descriptive methodological study. //J. Brachial Plex. Peripher. Nerve Inj., 2012. V.7, № 1. A.5.