

На правах рукописи

Серяков Виктор Иванович

**РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА ПОСЛЕ
МИКРОХИРУРГИЧЕСКОГО ШВА ПОД ВЛИЯНИЕМ D,L-КАРНИТИНА
(экспериментальное исследование)**

14.00.27 – хирургия

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2009

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (г. Томск)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Байтингер Владимир Францевич

доктор медицинских наук, профессор

Логвинов Сергей Валентинович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Анищенко Владимир Владимирович

доктор медицинских наук

Алябьев Федор Валерьевич

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации»

Защита диссертации состоится «16» декабря 2009 года в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.03 при Новосибирском государственном медицинском университете Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета Росздрава

Автореферат разослан «14» ноября 2009 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

М. Н. Чеканов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема лечения травматических повреждений периферических нервов не теряет своей актуальности до настоящего времени (Portincasa A., 2007). Травмы периферических нервов, по данным различных авторов, составляют 1,5 – 6 % в структуре всех травм верхних конечностей (Bontioti E. N., 2005; Wiberg M., Hazari A. et al., 2003). Инвалидность, связанная с последствиями травм периферических нервов, составляет 1,5 – 5,3 % всех случаев инвалидности пациентов с травмой верхних конечностей, а 30 % больных вынуждены сменить профиль трудовой деятельности (Ягджян Г. В. с соавт., 2000).

К сожалению, значительные достижения хирургической техники последних лет не сопровождаются аналогичными улучшениями результатов лечения при повреждениях периферических нервов (Hall S. M., 2001; Lunborg G., 2000). Функциональные результаты после первичного восстановления периферических нервов (от 35 до 50 % случаев) часто бывают неудовлетворительными (Allan C. H., 2000; Hall S. M., 2001; Ruijs A., Jaquet J. et al., 2005; Saur K., Bartos R. et al., 2004).

Улучшению процессов регенерации нервного ствола после выполнения первичного шва способствует не только внедрение микрохирургической техники, но также применение экзогенных веществ для оптимизации восстановительного лечения. Поэтому наряду с микрохирургической техникой важно использовать активные соединения, регулирующие каскад процессов, задействованных в дегенерации и регенерации нервной ткани (Widerberg A., 2002). В литературе накоплен большой экспериментальный материал по изучению влияния нейротрофических факторов и факторов роста на нервную систему (Hall S. M., 2001; Mc Kerracher L., 2001).

Нейротрофические факторы повышают жизнеспособность нейронов, избирательно действуют на клетки с определенной нейромедиаторной специфичностью, стимулируют ветвление аксонов и дендритов, синаптогенез (Гомазков О. А., 2005).

Среди нейротрофических факторов большой интерес представляет карнитин, глубокое клиническое изучение которого началось в 1986 году, когда была разработана и испытана в клинике инъекционная форма карнитина хлорида для внутривенного применения в виде 10-процентного раствора D,L-карнитина. Карнитин является важным нейротрофическим фактором,

обеспечивающим функциональную и структурную полноценность головного мозга и нервной системы в целом (Кузин В. М., 2003).

Сведений о регенерации периферических нервов после их травмы под влиянием D,L-карнитина в доступной нам литературе нет, что и обусловило цель и задачи настоящей работы.

Цель исследования. Улучшение регенерации периферического нерва у экспериментальных животных после первичного микрохирургического шва.

Задачи исследования:

1. Изучить морфологические и функциональные признаки регенерации периферического нерва кроликов после первичного микрохирургического эпиперинеурального шва.

2. Изучить процесс регенерации периферического нерва у экспериментальных животных после первичного микрохирургического эпиперинеурального шва под влиянием D,L-карнитина.

3. Изучить нейродистрофический процесс в реиннервированной конечности у кроликов после первичного микрохирургического эпиперинеурального шва под влиянием D,L-карнитина.

4. Провести сравнительный анализ воздействия D,L-карнитина и импульсного магнитного поля на процесс регенерации периферического нерва кроликов и реиннервации тканей после первичного микрохирургического эпиперинеурального шва.

Научная новизна. Впервые дана комплексная оценка регенерации поврежденного периферического нерва у кроликов после первичного микрохирургического эпиперинеурального шва под влиянием D,L-карнитина.

Изучены функциональные параметры нервно-мышечного аппарата реиннервированной конечности кроликов после первичного микрохирургического эпиперинеурального шва седалищного нерва. Получено, что введение D,L-карнитина в отличие от импульсного магнитного поля в большей степени стимулирует регенерацию осевых цилиндров, улучшает миелинизацию нервных волокон хирургически восстановленного периферического нерва, уменьшает перифокальный и интраневральный фиброз в области шва нерва.

Изучены морфологические реакции реиннервированной поперечнополосатой мышечной ткани и кожи кроликов после выполнения микрохирургического эпиперинеурального шва периферического нерва на фоне применения D,L-карнитина. Получено уменьшение выраженности

нейродистрофического процесса в реиннервированных мягких тканях в группе с воздействием D,L-карнитина.

Практическая значимость. Результаты экспериментального исследования позволяют обосновать возможность применения и дальнейшего изучения D,L-карнитина в клинике для улучшения процессов регенерации и реиннервации при травмах периферических нервов, уменьшения выраженности нейродистрофического процесса в реиннервированных тканях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Послеоперационная неврома у экспериментальных животных на фоне D,L-карнитина развивается с минимальным перифокальным и интраневральным фиброзом, увеличением числа прорастающих осевых цилиндров нервных волокон.

2. D,L-карнитин снижает выраженность нейротрофических нарушений у экспериментальных животных в области реиннервации, проявляющуюся сокращением площади нейротрофических язв, уменьшением атрофии и фиброза в мышечной ткани, увеличением амплитудно-скоростных параметров нервно-мышечного аппарата.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены на II Всероссийском съезде кистевых хирургов (г. Санкт-Петербург, 2008) и 9-м Конгрессе Европейской Федерации обществ микрохирургии (Финляндия, г. Турку, 2008).

Основные положения диссертации доложены на расширенном заседании кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии, хирургических болезней педиатрического факультета, гистологии, эмбриологии и цитологии Сибирского государственного медицинского университета, (г. Томск), Томского НИИ курортологии и физиотерапии, НИИ микрохирургии (г. Томск).

Внедрение. Результаты исследования используются в научно-исследовательском процессе НИИ микрохирургии (г. Томск), Томского НИИ курортологии и физиотерапии, учебном процессе на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе одна статья в ведущем научном рецензируемом журнале, рекомендованном ВАК для публикаций результатов кандидатских диссертаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах печатного текста, состоит из введения, 4 глав (обзора

литературы, материала и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов исследования), выводов и практических рекомендаций. Диссертация содержит 6 таблиц, 56 рисунков. Указатель литературы включает 225 литературных источника, из них 65 отечественных и 160 зарубежных авторов.

Личный вклад автора. Автор лично выполнял все оперативные вмешательства, принимал участие во всех методах исследования, выполнял статистическую обработку и анализ полученных данных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн экспериментального исследования. Эксперимент проводили на 36 кроликах-самцах породы «шиншилла» массой 2 – 3 кг с моделированием полного перерыва седалищного нерва на уровне средней трети бедра и последующим выполнением четырех эпиперинеуральных швов проленом 7/0 на атравматической игле с использованием бинокулярной лупы G3 «Carl Zeiss» (Германия) с 4-кратным увеличением и микрохирургического инструментария. После контроля гемостаза и санации раны 3-процентным раствором перекиси водорода рассеченные ткани послойно ушивали без дренирования.

Проведено открытое проспективное рандомизированное исследование. Рандомизацию проводили после операции методом «конвертов» на 3 группы: I группа (n = 12) контрольная, без воздействия после шва седалищного нерва; II группа (n = 12) с проведением лечения травмы периферического нерва импульсным магнитным полем (ИМП) в послеоперационном периоде; III группа (n = 12) с введением 10-процентного раствора карнитина хлорида в течение 10 суток после операции. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.) и положениями Федерального Закона «О защите животных от жестокого обращения», введенным в действие 1.01.1997 г. Обработка ран проводилась ежедневно бриллиантовым зеленым в течение 10 суток после операции.

Эвтаназия проводилась под эфирным наркозом методом воздушной эмболии с введением 10 мл воздуха в ушную вену. Забор материала для морфологического исследования (невромы, реиннервированные икроножные мышцы) производили через 30 суток после оперативного вмешательства.

Лечение ИМП проводили в послеоперационном периоде. Лечение начинали со следующих суток после операции. Параметры ИМП: частота 30 импульсов в минуту, индукция 0,5 – 1,08 Тл. Продолжительность процедур 10 минут ежедневно в течение 10 суток.

Введение D,L-карнитина начинали на следующие сутки после операции ежедневно 1 раз в сутки в течение 10 суток внутривенными инъекциями 10-процентным раствором карнитина хлорида в дозе 30 мг/кг, разведенным в изотоническом физиологическом растворе согласно инструкции по медицинскому применению препарата.

Препарат карнитина хлорида, действующим веществом которого является D,L-карнитин, одобрен Фармакологическим комитетом МЗ РФ 16 декабря 2002 года, утвержден Руководителем Департамента Государственного контроля лекарственных препаратов и медицинской техники МЗ РФ 30 июня 2003 года.

Методы экспериментального исследования. Оценку степени нейротрофических нарушений (площади поражения) оперированной конечности проводили до 30-х суток после операции в экспериментальных группах. Выполняли фотоснимки нейротрофических нарушений с помощью цифровой фотокамеры «SONY Cyber-shot DSC – P93» (Япония). Снимки сохраняли в формате JPEG. Расчет площади нейротрофических язв проводили с помощью компьютерной графической программы Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Inc., США).

Для оценки функционального состояния нервно-мышечного аппарата денервированной конечности применяли электронейромиографию (ЭНМГ). Метод стимуляционной миографии основан на определении биоэлектрической активности нервных и мышечных волокон. В нашем исследовании с помощью накожных электродов, расположенных в соответствии с расположением стимулирующего и отводящего электродов по Л. О. Бадалян, регистрировали электрическую активность икроножной мышцы, обусловленную электрической стимуляцией седалищного нерва. Кроликов фиксировали в положении лежа на животе, заднюю конечность выпрямляли и оставляли нефиксированной. Использовали 4-канальный электромиограф MG-440 фирмы «Медикор» (Венгрия), который позволяет анализировать параметры М-ответа, являющегося суммарным синхронизированным разрядом двигательных единиц икроножной мышцы в ответ на электрическое раздражение седалищного нерва.

Определяли параметры амплитуд вызванных потенциалов (М-ответ) и скорость проведения импульсов (СПИ).

Амплитуду М-ответа рассчитывали как расстояние от негативного до позитивного пика потенциала действия (мВ). Максимальная амплитуда М-ответа, получаемая при супрамаксимальной стимуляции седалищного нерва, отражает суммарный ответ двигательных единиц и, следовательно, их числа в исследуемой икроножной мышце. СПИ по эфферентным волокнам седалищного нерва кролика определяли как разность между длительностью латентных периодов М-ответов при электрическом раздражении двух точек нерва, находящихся на расстоянии друг от друга.

СПИ определяли делением расстояния между двумя точками стимуляции нерва (в мм) на время прохождения нервного импульса между этими точками (в мс), то есть на разность латентных периодов потенциалов действия, вызванных стимуляцией нервного ствола в этих точках. Латентный период определяли непосредственно на осциллографе прибора с помощью автоматического электронного счетчика, позволяющего измерить латентный период с точностью до 0,01 мс.

Скоростные параметры М-ответа, наиболее информативно отражающие функционально состояние нервно-мышечного аппарата, позволяют характеризовать течение дегенерационных и регенерационных процессов в травмированном нерве и степень тяжести денервационного синдрома.

ЭНМГ выполняли во всех экспериментальных группах до операции, через 15 и 30 суток после операции. Динамика параметров ЭНМГ в послеоперационном периоде позволила оценить влияние применяемых методов воздействия на скорость восстановительных процессов в нервно-мышечном аппарате реиннервированной конечности.

Для морфологической оценки состояния нервно-мышечного аппарата денервированной конечности исследовали неврому, по 1 см центрального и периферического отрезков седалищного нерва. Сразу же после умерщвления животных производили забор и фиксацию материала. Материал фиксировали в 12-процентном растворе нейтрального формалина по стандартной методике. В дальнейшем с помощью криостата готовили замороженные срезы толщиной 25 мкм. Состоятельность микрохирургического шва, состояние аксонов поврежденного седалищного нерва изучали с использованием метода импрегнации азотнокислым серебром по Бильшовскому-Грос в модификации А. И. Рыжова (1960), а состояние миелиновых оболочек нервных волокон

окраской суданом черным В по L. Lison на продольных срезах. Количественную оценку регенерации сшитых седалищных нервов проводили на поперечных срезах дистального участка невром, импрегнированных азотнокислым серебром по Бильшовскому-Грос в модификации А. И. Рыжова при увеличении 100. С помощью решетки Автандилова, вставленной в окуляр микроскопа, определяли удельную площадь осевых цилиндров относительно общей площади поперечного среза, выраженную в процентах. Для этого определяли соотношение количества точек на пересечении линий решетки с осевыми цилиндрами к общему числу точек, соответствующих всему поперечному срезу нерва. Поле зрения включало 256 точек решетки.

Морфологическое исследование реиннервированных скелетных мышц голени в экспериментальных группах выполняли через 30 суток после операции. Забор проводили сразу после умерщвления животных из средней части реиннервированной икроножной мышцы размером 1 см³ с последующей фиксацией в жидкости Карнуа, заливкой в парафин, окраской срезов гематоксилином и эозином для анализа изменений реиннервированной мышечной ткани. Для выявления гликогена использовали ШИК-реакцию по J. Mc Manus. Анализ морфологических препаратов проводили с использованием светового микроскопа «Motic B1» (Китай). Качественную оценку изменений мышечной ткани в экспериментальных группах проводили на продольных срезах. Количественную оценку реиннервированной мышечной ткани выполняли на поперечных срезах. Выполняли фотоснимки 10 полей зрения каждого препарата (объектив × 40) с помощью цифровой фотокамеры «SONY Cyber-shot DSC – P93» (Япония). Снимки сохраняли в формате JPEG. Подсчет проводили с помощью квадратной тестовой решетки с шагом 7 мм. Поле зрения включало 535 точек решетки. Определяли процентное содержание неизмененных миосимпластов относительно всех миосимпластов на поперечных срезах, соотношение компонентов соединительной ткани к мышечной. Оценивали удельную площадь миосимпластов, выраженную в процентах. Для этого вычисляли соотношение количества точек на пересечении линий решетки с исследуемой структурой к общему числу точек, соответствующих всему поперечному срезу. Разволокненные, фрагментированные, миосимпласты округлой формы относили к измененным миосимпластам.

Изучение ультраструктуры невромы седалищного нерва проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии. Ультратонкие срезы готовили по методике Б. Уикли (1975).

Для этого взятую ткань фиксировали в забуференном 0,1 М какодилатным буфером (рН 7,4) 2,5-процентном растворе глутарового альдегида в течение 2 часов при температуре 4 °С. Далее ткань дважды промывали какодилатным буфером (рН 7,4) по 10 – 15 минут, после чего постфиксировали в 1-процентном растворе четырехоксида осмия (на 0,1 М какодилатном буфере) в течение 2 часов с последующим двукратным отмыванием какодилатным буфером (по 10 – 15 минут). Затем материал дегидратировали в этиловых спиртах восходящей концентрации: в 50-процентном растворе спирта – 15 – 20 минут, в 70-процентном – оставляли на ночь, затем в 80-, 90-, 96-процентных – по 15 – 20 минут в каждом, в абсолютном спирте или ацетоне – по 20 – 30 минут дважды. Дегидратированные препараты заключали в смесь смол эпон-аралдит.

Ультратонкие срезы толщиной 60 – 100 нм готовили на ультратоме «Ultratome III» («LKB», Швеция). Полученные срезы наносили на сетки-подложки с формваровой пленкой-подложкой и контрастировали 2-процентным раствором уранилацетата на 50-процентном этаноле (10 – 20 минут при 37 °С) и цитратом свинца (от 3 до 10 минут при комнатной температуре) по Е. Рейнольдсу (1963). Полученные препараты просматривали в электронном микроскопе «JEM-100 CXII» («JEOL», Япония) с апертурной диафрагмой 25 – 30 мкм при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Статистическую обработку проводили с помощью компьютерного программного комплекса «Statistica 6.0» (Statsoft, Inc., США). Результаты подвергались статистической обработке с помощью непараметрической статистики. Распределение данных определяли критерием Шапиро-Уилка. При проведении сравнений независимых групп применяли критерий Манна-Уитни, точный критерий Фишера, а в ходе сравнений зависимых групп – критерий Вилкоксона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После полного перерыва седалищного нерва кроликов в экспериментальных группах с первичным выполнением микрохирургического эпипериневрального шва нам удалось оценить процессы регенерации нерва по

прямым (световая и электронная микроскопия невром) и косвенным параметрам (оценке показателей ЭНМГ седалищных нервов, трофических нарушений в области реиннервации, морфологических изменений реиннервированных икроножных мышц). При статистической обработке с критерием Шапиро-Уилка определили, что данные не подчиняются нормальным законам распределения, поэтому они представлены медианами с интерквартильным размахом Me [Q_{0,25}; Q_{0,75}].

Функциональные параметры нервно-мышечного аппарата после выполнения микрохирургического шва нерва. Средние значения амплитуд вызванных потенциалов и скорости проведения импульса до операции в исследуемых группах статистически не различались. После первичного восстановления седалищного нерва СПИ и амплитуды М-ответа во всех группах были снижены. Это обусловлено развитием валлеровской дегенерации и сокращением числа функционирующих двигательных единиц в икроножной мышце. К этому сроку произошли распад и фрагментация основной массы аксонов и миелиновых оболочек.

По данным стимуляционной ЭНМГ через 15 суток после микрохирургического вмешательства на периферическом нерве мы отмечали аксонально-демиелинизирующую нейропатию травмированного нерва во всех экспериментальных группах. Через 15 суток после операции выявили снижение амплитуды М-ответа до 2,7 % и СПИ до 37 % от исходных значений. В последующем наблюдали положительную динамику к 30-м суткам после операции. Это объясняется прорастанием безмиелиновых волокон и началом миелинизации новообразованных осевых цилиндров в этот период дистальнее эпиперинеурального шва. В контрольной группе амплитуда М-ответа к 30-м суткам после операции достигла 4,4 %, а СПИ – 51,2 % от исходных значений (табл. 1).

Таблица 1

Функциональные параметры нервно-мышечного аппарата реиннервированной конечности кролика после первичного микрохирургического шва седалищного нерва в контрольной группе

Параметры	М-ответ (мВ)			СПИ (м/с)		
	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}
До операции	0,85	1,13	1,5	30,3	37,92	40,5
15 суток после операции	0,025	0,03	0,05	11,8	14,03	15,7
30 суток после операции	0,05	0,05	0,125	17,24	19,42	21,43

После первичного восстановления седалищного нерва кроликов в группе с последующим локальным воздействием ИМП в послеоперационном периоде

к 15-м суткам снижались амплитуда М-ответа до 4,2 % и СПИ до 40 % от исходных значений с последующим улучшением к 30-м суткам после операции.

Функциональные параметры нервно-мышечного аппарата реиннервированной конечности через 15 суток статистически не различались от контрольной группы. Амплитуда М-ответа к 30-м суткам после операции была выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$) и достигала 14,7 %, а СПИ статистически не отличалась от группы контроля и составила 53,4 % от исходного уровня (табл. 2), что свидетельствует об улучшении регенерации осевых цилиндров и увеличении числа иннервируемых двигательных единиц в икроножной мышце при воздействии ИМП.

Таблица 2

Функциональные параметры нервно-мышечного аппарата реиннервированной конечности кролика после первичного микрохирургического шва седалищного нерва во II группе

Параметры	М-ответ (мВ)			СПИ (м/с)		
	Q0,25	Me	Q0,75	Q0,25	Me	Q0,75
До операции	0,75	0,95	1,5	35,85	39,34	41,67
15 суток после операции	0,025	0,04	0,05	12,9	15,68	16,81
30 суток после операции	0,1	0,14	0,15	19,42	21	25

Патогенетически улучшение амплитудного показателя нервно-мышечной передачи объясняется созданием индукционного тока непосредственно у мембран нервных волокон, обеспечивающим наилучшее возбуждение всех нервных волокон, расположенных как на поверхности, так и в глубине нервного ствола, чего не бывает при других видах стимуляции, а также усилением афферентной информации нейрона, нормализующим его функциональное состояние и создающим для регенерации аксона более благоприятные условия.

В группе с воздействием D,L-карнитина значения функциональных параметров уже через 15 суток были выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$), но статистически не отличались от группы с ИМП (рис. 1, 2). Амплитуда М-ответа снизилась до 4,4 %, а СПИ – до 44,5 % от исходных значений. На 3-е сутки амплитуда М-ответа составила 16,9 %, а СПИ 64,6 % соответственно от исходных значений. Эти показатели были значимо выше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$) и в группе ИМП ($p < 0,05$) (табл. 3), что свидетельствует о регенерации осевых цилиндров и уменьшении денервированных двигательных единиц в икроножной мышце при введении D,L-карнитина, а также об ускоренной миелинизации осевых цилиндров в раннем послеоперационном периоде.

**Функциональные параметры нервно-мышечного аппарата
реиннервированной конечности кролика после первичного
микрохирургического шва седалищного нерва в III группе**

Параметры	М-ответ (мВ)			СПИ (м/с)		
	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}
До операции	0,85	1,125	1,5	33,33	38,44	42,3
15 суток после операции	0,05	0,05	0,1	16,67	17,12	17,89
30 суток после операции	0,15	0,19	0,25	23	24,83	26,25

Применение ИМП приводит к увеличению амплитуды М-ответа через 30 суток после операции по сравнению с контрольной группой в 2,8 раза. Использование D,L-карнитина в послеоперационном периоде приводит через 30 суток к увеличению не только амплитуды М-ответа в 3,8 раза, но и СПИ в 1,28 раза, по сравнению с контрольной группой. D,L-карнитин, в отличие от ИМП, в большей степени стимулирует регенерацию осевых цилиндров, улучшает миелинизацию нервных волокон хирургически восстановленного периферического нерва. Положительная динамика амплитудно-скоростных показателей нервно-мышечного аппарата объясняется нейротрофическим действием L-изомера карнитина, входящего в D,L-карнитин и его эфиром ацетил-L-карнитином. D-карнитин не влияет на внутримитохондриальное окисление длинноцепочечных жирных кислот (Farinella Z., Fiumara A, Bianciardi P. et al., 1984).

Трофические нарушения реиннервированной области после микрохирургического шва нерва в экспериментальных группах. Трофические нарушения в мягких тканях оперированной конечности в контрольной группе выражались в появлении нейротрофических язв, деструкции и выпадении когтей, алопеции. Язвы возникали в 100 % случаев и появлялись уже через 6 – 11 суток после операции при снижении амплитудно-скоростных параметров нервно-мышечной передачи и дегенерации основной массы осевых цилиндров с миелиновыми оболочками в периферическом нерве, отсутствии афферентной импульсации и прерывании потока информации в ЦНС о трофических процессах на периферии. У 6 кроликов (50 %) язвы осложнялись периодическим кровотечением. К 30-м суткам отмечался регресс нейротрофических язв, проявляющийся эпителизацией краев язвы, формированием корки. Площадь нейротрофических язв в контрольной группе составила 4,3 [3,02; 9,1] см².

При гистологическом исследовании икроножных мышц в контрольной группе преобладали дегенеративные изменения скелетной мускулатуры,

проявляющиеся явлениями кариопикноза и кариолизиса, нарушением тинкториальных свойств саркоплазмы, утратой поперечной исчерченности большинства миосимпластов. В контрольной группе отсутствовал гликоген в икроножных мышцах на 30-е сутки после операции. Это объясняется изменением метаболических реакций в тканях вследствие деградации мембранных структур клетки, ведущим к нарушению процесса переноса субстратов и продуктов метаболизма (Кошкин В. В., 1984).

Содержание неизмененных миосимпластов было 42,05 % от всех волокон. Удельная площадь мышечной ткани составила 53,83 % от общей площади поперечных срезов. Соединительная ткань преобладала над мышечными волокнами, отношение соединительной ткани к мышечной равно 0,58.

При денервации причиной атрофии мышц и биохимических изменений являлось длительное нарушение функционального состояния мышечной ткани, бездеятельность мышц. Патогенетические механизмы связаны с резким ослаблением проприоцептивной импульсации, понижением тонуса моторных нейронов, ослаблением моторных стимулов, запускающих и регулирующих работу мышечных волокон и одновременно трофических стимулов, которые несут с собой моторные волокна (Абдулкина Н. Г., Левицкий Е. Ф., Кочегуров В. А. и др., 2007).

Трофические нарушения в мягких тканях оперированной конечности в группе с воздействием ИМП выражались только в появлении нейротрофических язв. Язвы возникали в пяточной области в 100 % случаев и появлялись через 7 – 12 суток после операции. Площадь нейротрофических язв составила 1,27 [0,96; 1,44] см², что статистически значимо меньше, чем в I группе ($p < 0,001$). Осложнений нейротрофических язв в группе с воздействием ИМП мы не наблюдали. К 30-м суткам также отмечался регресс нейротрофических язв, проявляющийся эпителизацией и уменьшением площади язв. В миосимпластах икроножных мышц на 30-е сутки после операции низкое содержание гликогена. При количественном анализе морфологических изменений мышечной ткани во II группе определили, что содержание неизмененных миосимпластов в 1,9 раза больше, чем в контрольной группе, и составило 79,53 % от всех миосимпластов (табл. 4).

Таблица 4

Содержание неизмененных миосимпластов в реиннервированной икроножной мышце кролика через 30 суток после операции (в %)

Группы	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Уровень значимости
Контроль (n = 8)	19,68	42,05	56,97	P ₂ P ₃
ИМП (n = 8)	74,1	79,53	84,92	P ₁ P ₃
D,L-карнитин (n = 8)	85,78	90,34	94,11	P ₁ P ₂

Примечания:

1. P₁ - статистическая значимость различий с контрольной группой (p < 0,001);
2. P₂ - значимость различий с группой ИМП (p < 0,001);
3. P₃ - значимость различий с группой D,L-карнитина (p < 0,001).

Удельная площадь миосимпластов составила 62 % от общей площади поперечных срезов (табл. 5).

Таблица 5

Удельная площадь миосимпластов в реиннервированной икроножной мышце кролика через 30 суток после операции (в %)

Группы	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Уровень значимости
Контроль (n = 8)	45,51	53,83	64,77	P ₂ P ₃
ИМП (n = 8)	55,05	61,96	70,19	P ₁
D,L-карнитин (n = 8)	55,89	62,8	69,63	P ₁

Примечания:

1. P₁ - статистическая значимость различий с контрольной группой (p < 0,001);
2. P₂ - значимость различий с группой ИМП (p < 0,001);
3. P₃ - значимость различий с группой D,L-карнитина (p < 0,001).

Разрастание соединительной ткани умеренное, отношение соединительной ткани к мышечной в 2 раза меньше, чем в контрольной группе и равно 0,3 (табл. 6).

Таблица 6

Соотношение соединительной ткани к мышечной в реиннервированной икроножной мышце кролика через 30 суток после операции

Группы	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Уровень значимости
Контроль (n = 8)	0,34	0,58	0,74	P ₂ P ₃
ИМП (n = 8)	0,22	0,3	0,37	P ₁ P ₃
D,L-карнитин (n = 8)	0,07	0,12	0,17	P ₁ P ₂

Примечания:

1. P₁ - статистическая значимость различий с контрольной группой (p < 0,001);
2. P₂ - значимость различий с группой ИМП (p < 0,001);
3. P₃ - значимость различий с группой D,L-карнитина (p < 0,001).

Положительную динамику нейродистрофического процесса в реиннервированных тканях можно объяснить следующим: статистически значимым увеличением числа иннервируемых двигательных единиц в нервно-

мышечном аппарате; изменением заряда клетки, приводящим к изменению дисперсности коллоидов и проницаемости клеточных мембран с уменьшением отека пораженных тканей (Ушаков А. А., Щиголев Ю. С., Антонов А. Б. и др., 1990); совпадением импульсов тока с частотным максимумом импульсации вегетативных В-волокон, что определяет возможность трофических влияний импульсных магнитных полей на сосуды и органы. С увеличением возбудимости нервно-мышечного аппарата ИМП вызывает усиление локального кровотока, улучшение микроциркуляции, улучшение венозного оттока, изменение реологических свойств крови, повышение показателей парциального давления кислорода в крови. Это приводит к уменьшению отека пораженных тканей, удалению из очага воспаления продуктов аутолиза (Абдулкина Н. Г., Левицкий Е. Ф., Кочегуров В. А. и др., 2007).

Трофические нарушения в мягких тканях оперированной конечности в группе с воздействием D,L-карнитина выражались только появлением нейротрофических язв пяточной области. Язвы образовались у 5 кроликов из 12 (41,7 %), что статистически значимо реже, чем в I и II группах ($p = 0,0023$). Язвы появлялись через 14–18 суток после операции. Площадь нейротрофических язв составила 0,56 [0,4; 0,59] см². Это в 7,7 раза меньше по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0016$) и в 2,3 раза меньше, чем в группе с ИМП ($p = 0,0027$). В этой группе сохранился гликоген в единичных миосимпластах икроножной мышцы на 30-е сутки после операции. Количественный анализ структурных изменений икроножных мышц оперированной конечности в группе с применением D,L-карнитина показал, что содержание неизмененных миосимпластов в 2,2 раза больше, чем в контрольной группе (табл. 4). Удельная площадь миосимпластов на 17 % больше, чем в контрольной группе (табл. 5). В группе с D,L-карнитином выявили наименьшее разрастание соединительной ткани со значимым различием с I и II группами (табл. 6).

Снижение выраженности нейродистрофического процесса объясняется улучшением репаративных процессов в периферическом нерве, улучшением функциональных параметров при ЭНМГ, улучшением состояния постганглионарных симпатических волокон и центральной вегетативной регуляции, так как D,L-карнитин оказывает многостороннее положительное действие на функциональное состояние разных отделов мозга, в том числе лабильных вегетативных структур. Это обусловлено его разнонаправленным

нормализующим влиянием на энергетический метаболизм, способностью усиливать репаративные процессы, стимулировать функционально неактивные нейроны (Кузин В. М., Колесникова Т. И., 1999).

Морфогенез послеоперационной невромы после микрохирургического шва нерва в экспериментальных группах. В контрольной группе через 30 суток после операции у кроликов отмечали выраженный перифокальный фиброзный процесс в области шва нерва с вовлечением седалищного нерва, окружающих мышц бедра и их фасций, затрудняющий выделение невромы. Фиброз появляется в результате нарушения как макро-, так и микроциркуляции тканей поврежденной конечности, возникает тканевая гипоксия и развивается спаечный процесс вокруг поврежденных нервных стволов (Крупаткин А. И., 2003), а также кровоизлияния в поврежденных участках ствола при нарушении интраневральной сосудистой сети приводят к значительным фиброзным изменениям, а разрастание эндоневрального коллагена сопровождается нарушением гистогематического барьера кровь – нерв (Стрелис Л. П., Левицкий Е. Ф., Абдулкина Н. Г. и др., 2001).

Изменения в проксимальном к месту перерезки участке нерва характеризовались неравномерно выраженными реактивными и деструктивными изменениями. Осевые цилиндры гипо- и гиперимпрегнированы, с неровными контурами, истонченные участки чередуются с варикозно утолщенными. Нервные волокна имеют разную толщину, некоторые значительно истончены на всем протяжении, что соответствует протекающим в них атрофическим процессам. На концах аксонов, расположенных в непосредственной близости от места перерезки, нередко видны резко импрегнированные булавовидные утолщения отдельных осевых цилиндров, которые отражают протекающие в нервных волокнах реактивные изменения, а также свидетельствуют о начавшихся процессах регенерации. Наряду с указанным, довольно значительная часть аксонов подвержена деструктивным изменениям, которые проявлялись фрагментацией и глыбчатым распадом импрегнированных нервных волокон. В области послеоперационного шва нерва отмечали значительное разрастание интраневральной соединительной ткани с формированием послеоперационной невромы. При импрегнации азотнокислым серебром на фоне рубца визуализируются разнонаправленные единичные нервные волокна.

В аксонах дистального участка невромы седалищного нерва преобладали деструктивные изменения. Эти изменения характеризовались классическими

признаками валлеровского перерождения, включающего в себя дегенерацию осевых цилиндров и миелиновых оболочек. Изменения в осевых цилиндрах выражались в распаде аксонов на отдельные фрагменты и мелкие зерна, которые избыточно воспринимают соли серебра. Миелиновые оболочки нервных волокон в дистальной части невротомы подвергаются дегенерации и последующей резорбции шванновскими клетками или макрофагами. При окрашивании препаратов невротом суданом черным В отмечали выраженную демиелинизацию, проявляющуюся деструкцией и фрагментацией миелина.

Ультраструктурные изменения в невротоме через 30 суток после операции в контрольной группе, по сравнению с неоперированным седалищным нервом, характеризовались выраженным отеком шванновских клеток с вакуолизацией в цитоплазме. В ядрах шванновских клеток гомогенное распределение хроматина, выражены ядрышки.

В соединительной ткани, окружающей нервные волокна, большое количество коллагеновых фибрилл неупорядоченной структуры. Фибробласты активно функционирующие, в них много органелл, гипертрофирован эндоплазматический ретикулум. Для этой группы характерен повышенный синтез коллагена, отек в межклеточном пространстве. В осевых цилиндрах вакуолизация, участки дегенерации нейроплазмы.

Через 30 суток после шва нерва отмечали расслоение оставшихся миелиновых оболочек, фагоцитоз миелина, появление миелиновых телец в периаксональных пространствах, свидетельствующие о замедлении процессов валлеровского перерождения, одновременно с начинающимися процессами миелинизации регенерирующих осевых цилиндров, что доказывается появлением тонких миелиновых оболочек вокруг осевых цилиндров.

При количественной оценке поперечных срезов невротом в контрольной группе на 30-е сутки после операции удельная площадь осевых цилиндров составила 46,53 [39,51; 52,27] % от общей площади. Количественная оценка прорастания осевых цилиндров через послеоперационную невротому в контрольной группе дало объяснение причинам улучшения амплитудно-скоростных параметров нервно-мышечной передачи и регрессу нейротрофических язв к 30-м суткам после операции.

При изучении участков восстановленных седалищных нервов в группе с воздействием в послеоперационном периоде ИМП отмечали общие морфологические изменения с контрольной группой, однако присутствовали и отличия. В продольных срезах проксимальных участков восстановленных

нервов, импрегнированных азотнокислым серебром, обнаруживали реактивные изменения нервных волокон в виде гиперимпрегнации, повышенной извитости осевых цилиндров. Небольшая часть нервных волокон истончена вследствие атрофии.

Область послеоперационной невромы характеризуется большим количеством вновь образованных тонких нервных волокон, чем в контрольной группе. Направление их роста носит беспорядочный характер, практически у каждого осевого цилиндра имеются варикозные утолщения, что свидетельствует о выраженных реактивных процессах, протекающих в нервах в области невромы.

Ультраструктурные изменения в невромах на 30-е сутки после операции в группе с воздействием ИМП характеризовались умеренным отеком шванновских клеток и межклеточного пространства области невромы. В фибробластах много гипертрофированных органелл, они активно функционирующие. Синтез коллагена фибробластами умеренный. В осевых цилиндрах встречаются отдельные участки дегенерации нейроплазмы.

В невроме происходит активная утилизация оставшегося миелина, миелиновых телец и остатков осевых цилиндров одновременно с появлением миелинизации регенерирующих нервных волокон.

При исследовании дистального фрагмента седалищного нерва визуализировалось большее, чем в контрольной группе количество регенерирующих осевых цилиндров, которые проросли послеоперационный участок и характеризовались ранее описанными реактивными изменениями. Количественный анализ поперечных срезов невром в группе с воздействием ИМП показал, что на 30-е сутки после операции удельная площадь осевых цилиндров составила 53,53 [44,36; 57,94] % от общей площади поперечных срезов. Это на 7 % больше, чем в контрольной группе ($p = 0,025$). Анализ морфологических изменений в восстановленном седалищном нерве подтверждает выводы, сделанные при сравнительной оценке амплитудно-скоростных параметров нервно-мышечной передачи, нейродистрофических реакций в реиннервированной области.

Морфологические изменения в группе с D,L-карнитином, выявленные в проксимальных участках шва седалищных нервов, импрегнированных азотнокислым серебром, носили умеренно выраженный реактивный характер. В области послеоперационной невромы обращало на себя внимание значительное количество регенерирующих осевых цилиндров.

Осевые цилиндры направлены беспорядочно, хорошо воспринимают соли серебра, незначительная часть из них реактивно изменена. При окраске области эпипериневрального шва суданом черным В отмечали выраженное скопление суданофильных включений, что вероятно свидетельствует о начавшейся миелинизации вновь образованных осевых цилиндров. Дистальные отрезки седалищных нервов также характеризовались умеренными реактивными изменениями.

На электронограммах в невромах на 30-е сутки после операции в группе с воздействием D,L-карнитина выявили незначительный отек межклеточного пространства, коллаген с упорядоченным строением. В капиллярах эндоневрия наблюдали отек, набухание эндотелиальных клеток, в них повышенное содержание митохондрий, вакуолей.

В шванновских клетках митохондрии не изменены, гипертрофированы цистерны эндоплазматического ретикулума. Процесс миелинообразования осевого цилиндра не нарушен, нейроплазма содержит много вакуолей. В осевых цилиндрах упорядоченное строение нейрофибрилл. Макрофаги мигрируют в невром, захватывают фрагменты миелиновых оболочек. На фоне активной утилизации остатков миелина одновременно происходит интенсивная миелинизация множества регенерирующих осевых цилиндров.

Количественный анализ поперечных срезов невром в III группе на 30-е сутки после операции показал, что удельная площадь осевых цилиндров представлена 56,95 [48,9; 65,18] % от общей площади поперечных срезов. Это на 10 % больше контрольной группы ($p = 0,0014$). Имеется тенденция к увеличению удельной площади, по сравнению с группой ИМП, однако, разница статистически не значима ($p = 0,17$).

Во время регенерации потребность нейронов в энергии возрастает при увеличении транспорта свободных жирных кислот в митохондрии и поддержке аэробного гликолиза (Bremer J., 1990), регенерация усиливается из-за увеличения метаболизма высоко энергетического субстрата, питающего биосинтез и системы аксонального транспорта. Ацетил-L-карнитин увеличивает связывающую способность нейрональных нейротрофических факторов и их ответов, что может быть также важным при условии стимулирующего эффекта нейротрофических факторов на регенерацию периферического нерва (Terenghi G., 1999).

Резюмируя вышеизложенные данные и сравнивая между собой экспериментальные группы, можно заключить, что реактивные изменения

нервных волокон носили неспецифический характер и отличались в разных группах степенью выраженности и скоростью развития репаративных процессов.

Процессы репарации в контрольной группе протекали замедленно, при этом выраженность реактивных изменений в области невромы была значительной, характеризовалась резкой гиперимпрегнацией, перифокальным и интраневральным разрастанием соединительной ткани, что в свою очередь препятствует прорастанию аксонов в дистальную часть нерва. При воздействии на область оперативного вмешательства ИМП отмечали уменьшение степени выраженности реактивных изменений, ускорение утилизации миелина, а также появление начальной миелинизации регенерирующих мягкотных нервных волокон. Применение D,L-карнитина после экспериментального микрохирургического эпипериневрального шва способствует меньшей выраженности реактивных процессов, уменьшению коллагенообразования, более быстрому прорастанию и миелинизации осевых цилиндров, что свидетельствует о его нейротрофическом действии.

Таким образом, воздействие в раннем послеоперационном периоде физиотерапевтическим фактором (ИМП) или нейротрофическим фактором (D,L-карнитином) с разными точками приложения на патогенетические звенья развития денервационного синдрома при первичном микрохирургическом шве седалищного нерва установлены признаки стимуляции регенерации нерва через 30 суток после операции.

У периферических нервов лабораторных животных относительно мало соединительной ткани, нервные волокна с эндонервием занимают большую площадь среза (60 – 70 %), пучковое строение нервов животных значительно проще. Число пучков невелико и почти нет внутривольного сплетения. Это одна из причин того, что у животных после шва нерва создаются более благоприятные условия для регенерации нервных волокон, чем у человека (Берснев В. П., Давыдов Е. А., Кондаков Е. Н., 1998). Поэтому необходимо проанализировать в дальнейших клинических исследованиях эффективность стимуляции регенерации периферических нервов D,L-карнитином и другими клинически надежными нейротрофическими факторами, а также их сочетанием с основными физиотерапевтическими методами воздействия в раннем послеоперационном периоде для уменьшения интенсивности формирования и плотности интра- и периневральной соединительной ткани, уменьшения степени нейродистрофического процесса в реиннервированных тканях.

ВЫВОДЫ

1. После первичного микрохирургического эпипериневрального шва седалищного нерва у кроликов в течение 30 суток развивается комплекс морфо-функциональных реакций в нервно-мышечном аппарате и поверхностных тканях задней конечности: формирование нейротрофических язв в 100 % случаев, дегенеративные и атрофические изменения в икроножных мышцах, снижение амплитудных и скоростных параметров нервно-мышечного аппарата, выраженный перифокальный и интраневральный фиброз в области шва нерва.

2. D,L-карнитин уменьшает перифокальный и интраневральный фиброз в области шва нерва, способствуя прорастанию осевых цилиндров нервных волокон в дистальную часть нерва.

3. Через 30 суток после первичного микрохирургического эпипериневрального шва нерва у кроликов на фоне D,L-карнитина происходит регресс нейродистрофического процесса в мышечной ткани и коже реиннервированной конечности.

4. D,L-карнитин по сравнению с импульсным магнитным полем является более эффективным фактором воздействия на репаративные процессы в седалищном нерве и тканях реиннервированной конечности после первичного микрохирургического эпипериневрального шва.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для комплексной оценки процессов регенерации и реиннервации тканей после первичного микрохирургического шва смешанного периферического нерва можно применять экспериментальную модель полного перерыва седалищного нерва кролика на уровне средней трети бедра с выполнением 4 эпипериневральных швов нитью 7/0 под увеличением без иммобилизации задней конечности.

2. Для оценки процессов регенерации седалищного нерва и реиннервации тканей задней конечности у кролика возможно выполнение электронейромиографии (анализ амплитудно-скоростных параметров седалищного нерва и реиннервированной икроножной мышцы), определение площади нейротрофических язв в послеоперационном периоде без умерщвления экспериментальных животных.

3. При полном перерыве смешанных периферических нервов для улучшения процессов регенерации и уменьшения выраженности

нейродистрофического процесса в реиннервированных тканях после первичного микрохирургического эпиперинеурального шва нерва в раннем послеоперационном периоде можно рекомендовать для клинического исследования внутривенное введение пациентам D,L-карнитина в дозе 30 мг/кг в течение первых 10 суток после операции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Серяков В. И. Влияние D,L-карнитина на регенерацию периферического нерва при его полном перерыве / В. И. Серяков // Травматология и ортопедия России. – 2008. – № 4. – С. 15-20.
2. Роль ксенотрансплантации стволовых клеток в регенерации периферических нервов / В. И. Серяков, А. Н. Галашов, Ю. В. Горелова, Н. Г. Абдулкина, Е. Ф. Левицкий // Травматология и ортопедия России. – 2005. – № 3. – С. 91-92.
3. Регенерация периферических нервов конечностей под воздействием D,L-карнитина (экспериментальное исследование) / В. И. Серяков, Ю. В. Горелова, А. Н. Галашов, Л. Р. Мустафина, А. В. Потапов, Н. Г. Абдулкина, В. Ф. Байтингер, С. В. Логвинов // Травматология и ортопедия России. – 2008. – приложение № 2. – С. 76-77.
4. Влияние D,L-карнитина на регенерацию травмированного периферического нерва / В. Ф. Байтингер, С. В. Логвинов, В. И. Серяков, Л. Р. Мустафина, А. В. Потапов // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2008. – № 2. – С. 23-28.
5. Электромиографические признаки стимуляции регенерации периферического нерва D,L-карнитином / В. Ф. Байтингер, В. И. Серяков, Ю. В. Горелова, А. Н. Галашов // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2008. – № 4. – С. 27-29.
6. Axonal regeneration stimulated by D,L-carnitine: an experimental study on rabbits / V. Seryakov, V. Baitinger, A. Galashov, L. Moustafina, A. Potapov, Y. Gorelova, N. Abdoulkina, E. Levitsky // Book of Abstracts «9-th Congress of the European Federation of Societies for Microsurgery, Turku Finland, 12-14 June, 2008. – Turku, 2008. – P. 47.
7. Baitinger V. F. Electroneuromiographic signs of peripheral nerve regeneration stimulated by D,L-carnitine: an experimental study on rabbits / V. F. Baitinger, V. I. Seryakov // 5th Congr. Of the World Society for Reconstructive Microsurgery, 25-27 June, 2009, Okinawa, Japan [Электронный ресурс]. – Okinawa, 2009. – P-6. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).