

О.В.Храпай

Національний медичний
університет імені
О.О.Богомольця
(Київ)

Ключові слова: сідничий нерв, травма, ліпофлавіон, схеми введення.

Надійшла: 02.09.2010

Прийнята: 22.09.2010

УДК 616.833-0.89.85-003.93:615.31:577.115.3

ВПЛИВ ЛІПОФЛАВОНУ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ТРАВМОВАНОГО СІДНИЧОГО НЕРВА ПРИ РІЗНИХ СХЕМАХ ВВЕДЕННЯ

Резюме. Проблема регенерації нервових волокон привертає до себе увагу багатьох дослідників, так як ушкодження периферійних нервів викликає інвалідність, особливо в молодому віці. З цією метою були досліджені порушення різних морфологічних структур периферійного нерва при повній невротомії в експерименті на щурах та їх фармакологічна корекція ліпофлавоном при різних схемах введення препарату. Для цього використовували методи світової мікроскопії та морфометрії. Ліпофлавіон – препарат, що представлений ліпосомальною формою кверцетину. Ліпофлавіон (0,1 мг/кг, Біолек, Харків) вводили впродовж десяти днів при трьох схемах введення (в ранній період, пізній та сумісному поєднанні цих періодів). Покращення регенерації нервових волокон в пошкодженому нерві за 12 тижневий період спостерігали при введенні препарату на ранніх етапах відновлення та при сумісному поєднанні на ранньому та пізньому періодах. Морфологічні зміни, які спостерігали при цих двох схемах суттєво не відрізнялись між собою. Тому вважаємо доцільним застосовувати ліпофлавіон на ранніх етапах посттравматичного періоду.

Морфологія. – 2010. – Т. IV, № 3. – С. 67-71.

© О.В.Храпай, 2010

Khrapay O.V. Influence of lipoflavon on regeneration of traumatized sciatic nerve at different schemes of injection.

Summary. The problem of regeneration of nerve fibers attracts attention of many researchers, because the damage of peripheral nerves results in disability, particularly in young age. For this purpose, breaches of different morphological structures of peripheral nerve under complete neurotomy in experiment on rats and their pharmacological correction by lipoflavon at different schemes of injection were investigated. We used methods of light microscopy and morphometry. Lipoflavon is a medicine, which is presented by the liposomal form of quercetin. Rats were injected with lipoflavon (0,1 mg/kg, Biolek, Kharkov) during ten days. Improvement of regeneration of nerve fibers of damaged nerve was observed after 12 weeks at injection of the medicine on the early stages of recovery and at combination of early and late periods. Morphological changes, which were observed under these two schemes, did not differ substantially with each other. So we considered the expediency of lipoflavon use on the early stage of posttraumatic period.

Keywords: sciatic nerve, trauma, lipoflavon, scheme of injection.

Вступ

Порушення функцій органів внаслідок травмування периферійних нервів, проблема хірургічного лікування і відновлення функцій пошкоджених периферійних нервів залишаються надзвичайно важливими. Соціальна актуальність цієї проблеми полягає в тому що, по-перше, вона стосується осіб працездатного віку, а по-друге, низька ефективність їх лікування супроводжується подальшою інвалідністю (60%) (Цымбалюк В.И. и соавт., 1998; Геращенко С.Б. та співавт., 2008; Шеремета Л.М., 2008). Одним із перспективних лікарських засобів, що може застосовуватись з метою ефективного лікування травматичних ушкоджень нервової системи є ліпофлавіон. Ліпофлавіон ("Біолек", Харків) є ліпосомальною формою флавоноїду кверцетину і характеризується антиоксидантними та протизапальними властивостями і високим рівнем безпеки, що забезпечує розчинність та біодоступність комплексу

при травмі периферійного нерва (Савченкова Л.В. и соавт., 2006а; Савченкова Л.В. и соавт., 2006б).

Мета

Дослідження процесів регенерації нервових волокон в травмованому сідничному нерві та фармакологічна корекція ліпофлавоном цих процесів стали метою наших досліджень.

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження були проведені на білих щурах (n=41) самках вагою 220-250 г. Тварини були розподілені на 6 груп (табл. 1).

Оперативні втручання на тваринах проводили в умовах загальної анестезії, використовуючи тіопентал натрію в дозі 60 мг/кг. Експериментальне моделювання невротомії сідничного нерва здійснювали в такий спосіб: виконували оперативний доступ із задньої поверхні стегна, відокремлювали і мобілізували лівий сідничний нерв. Потім нерв перетинали на рівні його серед-

ньої третини. Проксимальний відділ нерва на відстані 3-5мм попередньо розчавлювали корнцангом впродовж 2 секунд. Епіневральними швами з'єднували проксимальний і дистальний кінці сідничого нерва, залишаючи діастаз при-

лизно 1,7-2 мм. Нейрорафію проводили із використанням стерильних ниток 10/0 на атравматичній голці за допомогою монофіламентних ниток (проленових або етилонових) фірми "Ethicon" (Шотландія). Рану зашивали наглухо.

Таблиця 1

Розподіл експериментальних груп тварин

№	Група	Кількість тварин	Схема введення (дні)
1	Інтактні	7	
2	Псевдооперовані	6	
3	Травма	7	
4	Травма+ліпофлавон	9	1-10
5	Травма+ліпофлавон	5	32-42
6	Травма+ліпофлавон	7	1-10+32-42

Ліпофлавон тваринам вводили параневрально в дозі 0,1 мг/кг впродовж 10 днів в області нижньої третини стегна. Після 12 тижнів отримали матеріал для гістологічного дослідження (проксимальний і дистальний кінці ушкодженого нерва та ділянку зшивання). Для проведення гістологічного дослідження матеріал фіксували у 10%-му розчині нейтрального формаліну. Зрізи товщиною 15 μ m імпрегнували азотнокислим сріблом (Коломийцев А.К. и соавт., 1981).

Морфометричні дослідження проводили за допомогою напівавтоматичного пристрою для обробки графічних зображень (UTHSCSA ImageTool, Version 2.0 (alpha 3) для Microsoft Windows 95, Windows NT) та мікроскопу Olympus BX 51 (Японія).

Для оцінювання ступеню ефективності регенерації нервових волокон застосовували наступні показники: кількість (щільність) нервових волокон в одиниці об'єму нерва (тест-зоні розміром 1 μ m³), кут відхилення нервових волокон від вісі нерва (⁰).

При статистичному аналізі морфометричних даних обчислювали середні значення величин, середнє квадратичне відхилення. Порівняння отриманих результатів проводили за допомогою t-критерію Стюдента.

Результати та їх обговорення

Через 12 тижнів після операції у всіх тварин третьої групи відзначено процеси регенерації нерва. Макроскопічно проксимальний і дистальний відділи та ділянка травми нерва чітко розрізняються. Проксимальний відрізок нерва подібний до нерва інтактних тварин, тоді як в зоні травмування спостерігаються значне розростання сполучної тканини. На відміну від інтактного дистальний відрізок травматично ушкодженого нерва утворений декількома гілочками нервових стовбурів. В усіх досліджуваних відділах травмованого нерва було встановлено наявність нервових волокон, проте їх кількість, перерозподіл та локалізація суттєво відрізнялись.

В проксимальному відділі ушкодженого нерва відзначено наявність нервових волокон, які оточені щільним епіневрієм. В стінці епіневрію відмічено збільшення кількості фібробластів. Нервові волокна в цьому відділі нерва формували окремі пучки значних розмірів. Між кластерами нервових волокон зустрічали групи фібробластів та шванівських клітин. Встановлено достовірне зменшення щільності нервових волокон та збільшення їх кута відхилення від вісі нерва (табл. 1, 2). У деяких тварин третьої групи спостерігали зони фіброзу зі збільшенням васкуляризації та скупченням фібробластів.

В ділянці травми сполучна тканина та регенеруючі нервові волокна утворюють завитки, в яких пучки нервових волокон проходять вздовж зони травми, оминаючи шов. В цілому ця область характеризується розростанням сполучнотканинних елементів та судин. На периферії таких ділянок виявляються один або декілька крупних пучків нервових волокон. В них волокна орієнтовані досить щільно, проходять вздовж осі нерва, проте мають звивисту форму і відхиляються від напрямку нерву в більшій мірі ніж в проксимальному відділі. Зустрічали спіралі Перрончіто та рекурентні нервові волокна.

Нервові волокна в дистальному відділі мали звивисту форму і були орієнтовані поздовжньо, поперечно і, значно рідше, рекурентно відносно вісі нерва. В центральній зоні дистального відділу нерва пучки нервових волокон були розташовані не щільно. В багатьох ділянках між такими пучками волокон зустрічали групи фібробластів та скупчення шванівських клітин. Вони формують структури, схожі до бюнгнерівських стрічок, які спостерігали в ділянці травмування. Спостерігали спіралі Перрончіто, що свідчить про порушення регенерації нервових волокон. Таким чином, у тварин третьої групи, яким не вводили ліпофлавон, в досліджуваних відділах нерва спостерігали значні порушення структури сідничого нерва в порівнянні із інтактними та псевдоо-

перованими тваринами (групи 1 і 2).

З метою проведення порівняльного аналізу впливу ліпофлавоу на ефективність відновлення нерва після його травматичного ушкодження препарат вводили дослідним тваринам на різних періодах регенерації. Було обрано три схеми введення ліпофлавоу: на ранньому етапі (перші 10 днів після операції, група 4), на пізньому етапі (з 32 по 42 день, група 5) та при сумісному введенні впродовж перших 10 днів і повторно з 32 по 42, охоплюючи одночасно ранній та пізній періоди регенерації (група 6).

При вивченні впливу ліпофлавоу на пізньому етапі відновлення (з 32 по 42 день, група 5) було відмічено збільшення кількості фібробластів в ділянці шва, в проксимальному відділі в ділянці розчавлення та в дистальному відділі. В ділянці шва зустрічали щільні рубці із сполучної тканини, розвивається фіброз. Нервові волокна регенерували в ділянку травматичного ушкодження нерва в складі декількох пучків, між якими були наявні групи шванівських клітин. Поблизу епіневрію проростали пучки нервових волокон, які супроводжували судини великого діаметру, при цьому в епіневрії вросли окремі групи нервових волокон та судини. Епіневрій був потовщений, особливо в зоні травмування. Скупчення шванівських клітин в ділянці шва були розташовані між групами фібробластів. Зустрічали групи спіралей Перрончіто, що також свідчить про затримання регенерації нервових волокон. Таким чином, застосування ліпофлавоу на віддалених етапах відновлювального процесу (з 32 по 42 дні після травми, група 5) супроводжується розвитком фіброзу, формуванням окремих сполучнотканинних рубців та спіралей Перрончіто. Значна кількість нервових волокон відхилялась від основної вісі нерва, зустрічали рекурентні волокна. Така морфологічна картина травмованого сідничного нерва суттєво не відрізняється від стану нерва нелікованих тварин, що засвідчує про неефективність застосування ліпофлавоу на віддалених етапах відновлення.

При введенні ліпофлавоу на ранніх етапах регенерації (перші 10 днів після травмування, група 4) було відмічено істотні морфологічні зміни в будові ушкодженого нерва. Збільшувалась кількість пучків нервових волокон, що регенерували в ділянку травми. Ступінь вираження фіброзу в цій зоні був дещо меншим, про що свідчить зменшення кількості та розмірів сполучнотканинних рубців. Зустрічали лише окремі спіралі Перрончіто, в той час як при віддаленому введенні препарату вони розташовувались групами. Такі морфологічні відмінності свідчать про зменшення розвитку сполучної тканини в ділянці розчавлення та перерізу сідничного нерва. Також спостерігали відновлення кровоносних судин в зазначених відділах ушкодження. Нервові волокна в ділянку шва регенерували декількома клас-

терами, перфоруючи цю зону та проростаючи в дистальний відділ. Щільність розташування нервових волокон була більшою в порівнянні з нелікованими тваринами. Кут відхилення волокон в проксимальному відділі не відрізнявся від контрольних значень. В дистальному відділі кількість пучків нервових волокон була більшою в порівнянні із нелікованими тваринами і при введенні ліпофлавоу у віддалений період (табл. 1, 2).

Результати досліджень попередніх двох схем введення ліпофлавоу стали основою для третьої серії вивчення комбінованого впливу ліпофлавоу на ранніх (перші 10 днів) та відділених етапах (перші 10 та з 32 по 42 дні) відновлювального процесу (група 6). Було встановлено, що в проксимальному відділі ушкодженого нерва нервові волокна проходять суцільним тяжем і мають характерний звивистий вигляд і направлені вздовж сідничного нерва. Крім того спостерігали додаткові групи волокон меншого розміру, які супроводжували головні пучки регенеруючих волокон. У деяких тварин, як і у випадку травматичного відновлення при введенні ліпофлавоу лише на ранньому етапі, нервові волокна утворювали декілька додаткових пучків. В ділянці травмування також спостерігали зменшення розвитку фіброзу. Відмічено збільшення щільності кровоносних судин. Таким чином, при введенні ліпофлавоу на ранніх етапах відновлення та повторному на пізніх ступінях регенерації нервових волокон істотно збільшується в порівнянні з нелікованими тваринами та при застосуванні препарату на пізньому періоді регенерації (в порівнянні з групою 5).

На основі морфологічної характеристики регенерації нерва було проведено морфометричне дослідження ступеню регенерації нервових волокон в нерві після ушкодження та введення ліпофлавоу на ранньому етапі відновлення (перших 10 днів, група 4). Було встановлено достовірне збільшення щільності регенерованих нервових волокон в усіх досліджуваних відділах травмованого нерва (табл. 1). Показано, що більшість нервових волокон орієнтовані в напрямку нерва головним чином в проксимальному відділі та ділянці травми (табл. 2). В дистальному відділі нервові волокна відхиляються від основної вісі нерва, що пов'язано із посттравматичними змінами в цьому відділі нерва.

Таким чином, введення препарату на ранньому етапі є більш ефективним, ніж його застосування на пізньому, оскільки саме в цей період присутні головні терапевтичні мішені кверцетину (вільні радикали, що утворюються при ушкодженні та ішемії).

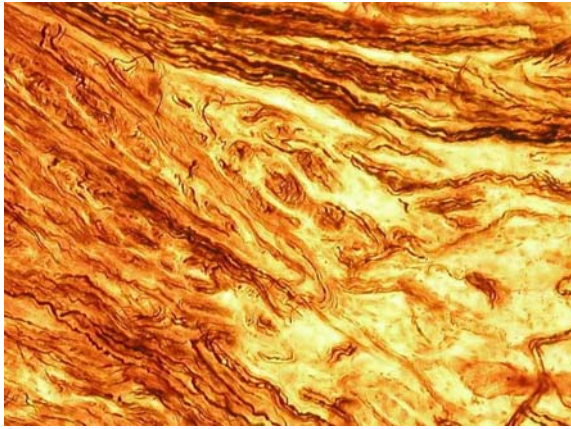


Рис. 1. Травма без лікування (група 3). Дистальний відділ. Пучки нервових волокон мають різний напрям регенерації, розташовані не рівномірно. Групи фіброblastів та шванівських клітин. 12 тижнів після травмування. Імпрегнація сріблом. $\times 400$.

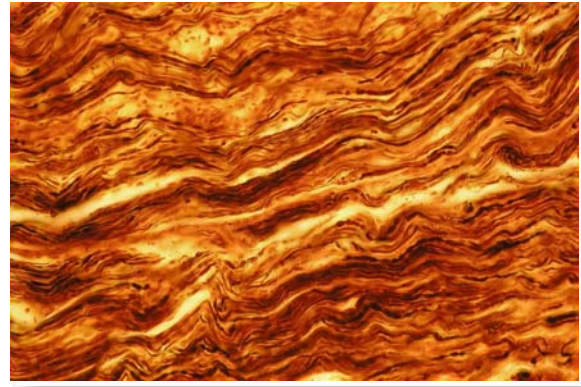


Рис. 2. Ліпофлавон (перші 10 днів, група 4). Дистальний відділ. Нервові волокна в нерві розташовані кластерами, мають звивистий вигляд. 12 тижнів після травмування. Імпрегнація сріблом. $\times 400$.

Таблиця 2

Зміни щільності розташування нервових волокон в нерві при травмі та впливі ліпофлаону (шт)

Група	Проксимальний відділ	Ділянка травми	Дистальний відділ
Інтактні, група 1	10505,05 \pm 346,77		
Псевдооперовані, група 2	10339,87 \pm 247,05		
Травма, група 3	6699,795 \pm 247,681a	6305,68 \pm 347,69	4728,705 \pm 237,041a
Ліпофлавон, група 4	10891,08 \pm 445,33b,	10352,12 \pm 628,11	10532,71 \pm 338,37b

a – достовірно по відношенню до контролю ($p < 0,05$);

b – достовірно по відношенню до травми без лікування ($p < 0,05$).

Таблиця 3

Кут відхилення регенованих нервових волокон по відношенню до вісі нерва ($^{\circ}$)

Група	Проксимальний відділ	Ділянка травми	Дистальний відділ
Інтактні, група 1	23,77 \pm 1,64 ⁰		
Псевдооперовані, група 2	25,56 \pm 1,55 ⁰		
Травма, група 3	31,65 \pm 1,98 ⁰ a	30,67 \pm 1,55 ⁰	34,37 \pm 2,10 ⁰ a
Ліпофлавон, група 4	25,62 \pm 1,60 ⁰ b	26,05 \pm 1,73 ⁰ b	33,37 \pm 2,07 ⁰ a

a – достовірно по відношенню до контролю ($p < 0,05$);

b – достовірно по відношенню до травми без лікування ($p < 0,05$).

Такий високий ступінь ефективності можна пояснити активацією процесів ангиогенезу та зменшенням розвитку сполучнотканинного рубця в ділянці розчавлення та перерізу нерва. На відміну від нелікованих тварин (групи 3), у яких в зоні травмування утворився щільний рубець, під впливом ліпофлаону (у груп 5 та 6) регеновані нервові волокна перфорують наскрізь нещільну сполучну тканину регенераційної невромі, а також регенерують поблизу епіневрієм. Посилення відновлення кровоносної системи травмованого нерва при введенні ліпофлаону в ранній період позитивно вплинуло на процеси його регенерації та відновлення. Всі ці аспекти впливу ліпофлаону забезпечують відновлення структурно-морфологічної організації нерва після

його травмування.

Це обумовлено антиоксидантними властивостями кверцетин, який входить до складу препарату. Навіть при короткотривалому введенні (10 днів, група 4) ліпофлавон мав виражений ефект на ранніх етапах відновлення, в той час як на віддалених (група 5) був неефективним.

Висновки

1. Травмування сідничного нерва супроводжується порушеннями структурної організації нерва, що виражається в порушенні кровопостачання, утворенні сполучнотканинного рубця та незадовільній регенерації нервових волокон.

2. Ліпофлавон стимулює регенерацію нервових волокон в усіх відділах травмованого нерва. Відбувається зменшення розвитку фіброзу в ді-

лянках травматичного ушкодження, що сприяє регенерації нервових волокон крізь зону шва в дистальний відділ нерва.

3. Введення ліпофлаону є ефективним на ранніх етапах посттравматичного періоду. Введення препарату на пізньому етапі не мало суттєвого впливу на регенеративні процеси в травмованому нерві. Сумісне застосування ліпофлаону на ранньому та пізньому етапах не сприяло

більшій регенерації нерва. Тому застосування ліпофлаону є доцільним лише на ранніх етапах, оскільки в цей період утворюються оксиданти, які нейтралізує препарат.

Перспективи подальших розробок полягають в ультраструктурному дослідженні процесів регенерації нервових волокон в травмованому сідничному нерві та за умов фармакологічної корекції.

Літературні джерела

Коломийцев А. К. Быстрый метод импрегнции азотнокислым серебром элементов периферической нервной системы, пригодный для парафиновых и целлоидиновых срезов / А. К. Коломийцев, Ю. Б. Чайковский, Т. Л. Терещенко // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1981. – Т. 81, № 8. – С. 93-96.

Периферійний нерв (нейрон-судинно-десмальні взаємовідношення в нормі та патології) / С. Б. Геращенко, О. І. Дельцова, А. К. Коломийцев, Ю. Б. Чайковський. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2005. – 342 с.

Повышение эффективности микрохирургических операций у больных с последствием травм срединного и локтевого нервов области предплечья / В. И. Цымбалюк, Ю. Б. Чайковский, Л. А. Ломако, Л. И. Фисенко. – К. : АТЗТ “Ком-

пания “РАДА”, 1998. – 118 с.

Савченкова Л. В. Некоторые стороны механизма терапевтического действия липофлаона с ацелизином при экспериментальной сердечной недостаточности / Л. В. Савченкова, М. В. Оглоблина, Т. В. Афонина // Український медичний альманах. – 2006. – № 4. – С. 154-155.

Савченкова Л. В. Фармакологія і перспективи клінічного застосування біофлавоноїдів / Л. В. Савченкова, І. П. Белоусова, Т. В. Афонина // Український медичний альманах. – 2006. – № 1. – С. 227-232.

Шеремета Л. М. Гепатопротекторна дія ліпосомальних препаратів за умов експериментального парацетамолового гепатиту / Л. М. Шеремета // Галиц. лікар. вісн. – 2008. – Т. 15, № 2. – С. 77-79.

Храпай Е.В. Влияние липофлаона на регенерацию травмированного седалищного нерва при разных схемах введения.

Резюме. Проблема регенерации нервных волокон привлекает к себе внимание многих исследователей, так как повреждение периферических нервов приводит к инвалидности, особенно в молодом возрасте. С этой целью были изучены нарушения различных морфологических структур периферического нерва при полной невротомии в эксперименте на крысах и их фармакологическая коррекция липофлаоном при разных схемах введения препарата. Для этого были использованы методы световой микроскопии и морфометрии. Липофлаон – препарат, который представлен липосомальной формой кверцетина. Липофлаон (0,1 мг/кг, Биолек, Харьков) вводили в течение десяти дней (в ранний период, поздний и в сочетании этих периодов). Улучшение регенерации нервных волокон в поврежденном нерве за 12 недельный период наблюдали при введении препарата на ранних этапах восстановления и при сочетании раннего и позднего периодов. Морфологические изменения, которые наблюдали при этих двух схемах, существенно не отличались между собой. Поэтому считаем целесообразным применять липофлаон на ранних этапах посттравматического периода.

Ключевые слова: седалищный нерв, травма, липофлаон, схемы введения.