

УДК 616.833.5-002-092.9:599.323.4

Моделювання запального та деструктивного процесу у периферичних нервах

Л. М. Бенгус, Н. В. Дєдх, М. В. Шимон

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН Україна», Харків

The article contains data of a morphological analysis by results of transplantation of an autologous vertebral pulp of white rats to the tibial branch of the sciatic nerve. It is shown that on the 15th day after the reproduction of this model the nervous trunk and perineural tissues of animals developed signs of a chronic inflammatory-destructive process. Destruction, vacuolization and fragmentation of the myelin sheath, destruction foci in nonmyelinated nerve fibres, nuclear heterochromatization and a low density of membrane organoids in the cytoplasm of Schwann's cells were revealed on the ultrastructural level.

В статье представлены данные морфологического анализа по результатам трансплантации аутологичного студенистого ядра белых крыс к большеберцовой ветви седалищного нерва. Показано, что на 15 сутки после воспроизведения данной модели в нервном стволе и периневральных тканях животных имели место признаки хронического воспалительно-деструктивного процесса. На ультраструктурном уровне отмечены деструкция, вакуолизация, фрагментация миелина, очаги деструкции в безмиелиновых нервных волокнах, гетерохроматизация ядра и низкая плотность мембранных органонидов в цитоплазме шванновских клеток.

Ключові слова: периферичний нерв, щури, трансплантація, драглисте ядро

Вступ

Актуальність проблеми дегенеративних захворювань хребта та гриж міжхребцевого диска з роками не тільки не зменшується, а навпаки, має тенденцію до зростання, оскільки вона є негативним проявом технічного прогресу, урбанізації та зміни еволюційно сформованого способу життя значної частини населення на фоні гіподинамії. Тому поглиблене вивчення етіопатогенезу дегенеративних захворювань хребта є важливим напрямком сучасної вертебології. Вирішення цієї проблеми неможливе без експериментального моделювання на тваринах [1, 2].

Відомо, що у процесі формування грижі міжхребцевого диска важливу роль відіграють не тільки механічні фактори [3–7], пов'язані з компресією нервових корінців, а й хімічні [7–9], які продукують клітини дегенеративного диска, головним чином, драглистого ядра, що є складовою частиною гриж диска.

У зв'язку з цим у своїй роботі ми прагнули моделювати та дослідити морфологічні зміни периферичних нервів щурів у разі їх безпосереднього контакту з драглистим ядром. Для цього було розроблено оригінальну модель, яка імітує вплив хімічних компонентів грижі міжхребцевого диска, а саме аутологічного драглистого ядра, на структуру нерва.

У попередній роботі [10] ми навели результати раннього впливу (3–7 доба) драглистого ядра на структуру сідничного нерва. Представлене дослідження стосується аналогічного впливу драглистого ядра на нерв на більш віддалений термін — 15 діб.

Мета роботи: дослідити гістологічну та ультраструктурну організацію великогомілкової гілки сідничного нерва щурів за умов трансплантації до нього аутологічного драглистого ядра.

Матеріал та методи

В експерименті на 10 тваринах моделювали ситуацію, яка подібна до такої у випадку пролапсу диска та випадінні драглистого ядра у хребтовий канал, що супроводжується його впливом на нервові ганглії. З цією метою аутологічне драглисте ядро вилучали із міжхребцевого диска хвостового

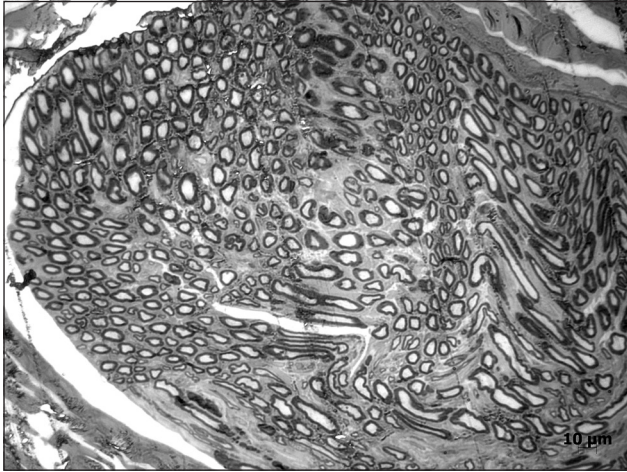


Рис. 1. Мікрофото ВГСН псевдоперованого щура. Численні нервові волокна з типовою мієліною оболонкою. Напівтонкі зрізи. Метилєновий синій та основний фуксин. Ок. 10, об. 40

відділу щура і трансплантували на великогомілкову гілку сідничного нерва (ВГСН).

Заднім доступом розтинали шкіру на рівні хребтового сегмента Сс IV–Сс V хвостового відділу хребта щура та вилучали драглисте ядро із міжхребцевого диска. Потім у проекції гомілки задньої правої лапи розрізали шкіру, тупим распатором розводили м'язи і відкривали ВГСН, драглисте ядро розміщували під нервом (у м'язовій тканині) без механічного напруження. Накривали ВГСН з драглистим ядром ділянкою фасції з м'язом. Рану місцево обробляли антибіотиком та ушивали.

Для додаткового контролю використано трьох псевдоперованих щурів, яким проводили всі зазначені вище маніпуляції, але без трансплантації драглистого ядра.

Щурів виводили з експерименту на 15 добу передозуванням хлороформу для наркозу згідно з нормативами по біоетиці [11]. Проводили дослідження структури ВГСН та периневральних тканин методами світлової та трансмісійної електронної мікроскопії. Для гістологічних досліджень видаляли ділянки м'яза з імплантованим під нерв драглистим ядром і фіксували їх у 10 % розчині нейтрального формаліну, декальцинували в 4 % азотній кислоті, зневоднювали у спиртах збільшуваної міцності та поміщали у целоїдин. Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, а також пікрофуксином за Ван-Гізон [12] і досліджували в світловому мікроскопі MICROS 50 С.

Для електронно-мікроскопічних досліджень видаляли фрагменти нервової тканини розміром 1 мм³, префіксували в параформальдегід-глутаральдегідному фіксаторі Карновського. Постфіксацію проводили в розчині з масовою часткою чотири-

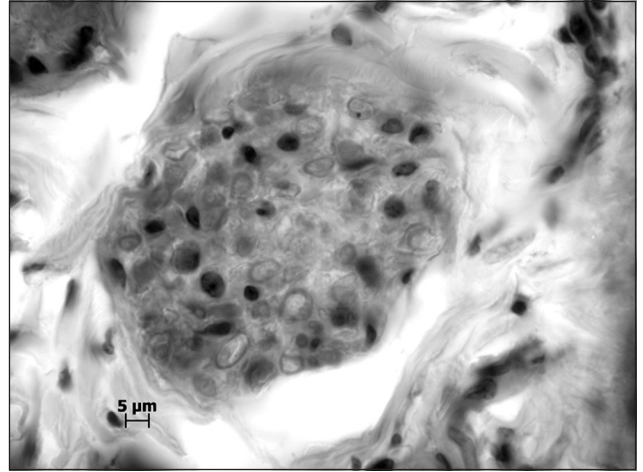


Рис. 2. Мікрофото. Інфільтрація ендоневрію клітинами запалення. Макрофаг з великим ядром, лімфоцити та фібробласти. Набряк та деструкція у ділянці периневрію. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 100

оксику осмію 1 %. Матеріал дегідратували в серії спиртів зростаючої міцності й ацетоні, поміщали в суміш епону та аралдиту [13]. Ультратонкі зрізи товщиною 40–50 нм контрастували уранілацетатом та цитратом свинцю за Reynolds [14]. Матеріал досліджували в трансмісійному електронному мікроскопі ЕМВ-100БР. Фотографували матеріал за допомогою цифрової фотокамери Canon EOS-300D.

Результати та їх обговорення

На 15-у добу дослідження у псевдоперованих тварин ВГСН зберігав характерну організацію. Поміж нервовими волокнами у ендоневрії виявляли вузькі прошарки сполучної тканини без ознак набряку та деструкції. У сполучній тканині периневрію та епіневрію ознак деструкції не виявлено (рис. 1). У складі нерву на аксіальних зрізах визначали численні мієлінові волокна круглястої та іноді овальної форми (рис. 1), які характеризувались рівномірним за товщиною мієліновим покриттям.

В ендоневрії ВГСН були виявлені кровоносні судини капілярного типу.

Гістологічний аналіз препаратів, виконаний на 15-у добу після трансплантації до великогомілкової гілки сідничного нерва автологічного драглистого ядра, показав, що у щурів був набряк у зоні периневрію (рис. 2), де спостерігалось розшарування колагенових волокон, облітерація кровоносних судин, порушення цілісності шару ендотелію, що відображувало деструктивні зміни в капілярах. У зоні пери- та ендоневрію фіксували підвищену щільність кровоносних судин, обумовлену перебігом запального процесу у цих тканинах.

У нервовому стовбурі визначали інфільтрацію ендоневрію клітинами запалення, які були пред-

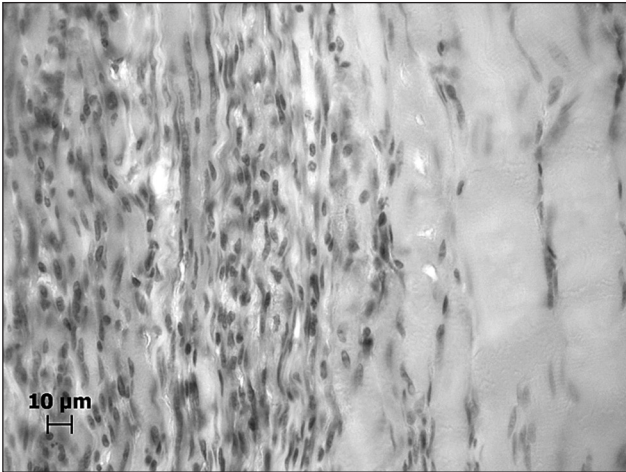


Рис. 3. Мікрофото. Ознаки хронічного запалення у прилеглий до нервового стовбура м'язовій тканині. Проліферація фібробластів. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 40.

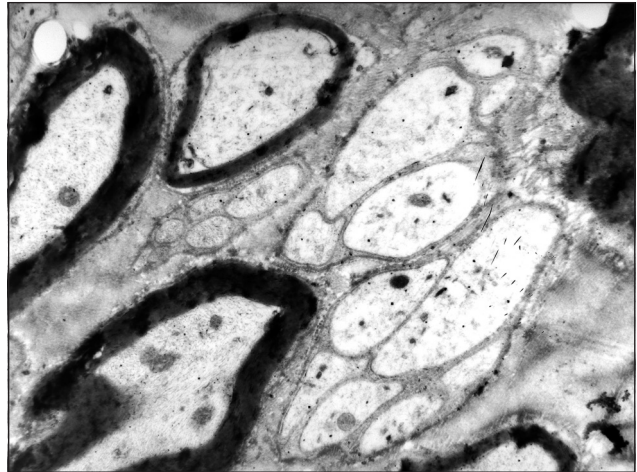


Рис. 4. Мікрофото. Мієлінові та безмієлінові нервові волокна. Варіабельність форми та діаметра нервових волокон, товщини мієлінового шару. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 16800

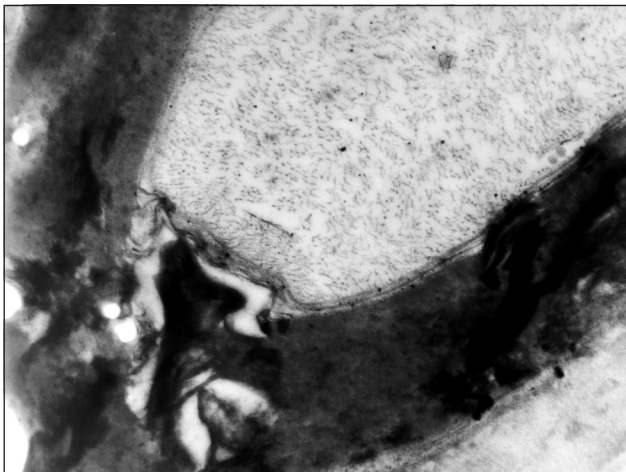


Рис. 5. Мікрофото. Осередок вираженої деструкції мієлінового нервового волокна. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 25200

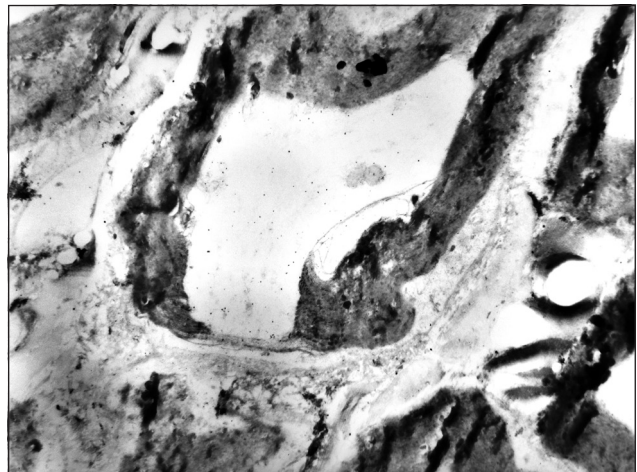


Рис. 6. Мікрофото. Нервове волокно з порушеною структурою мієлінової оболонки. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 8000

ставлені макрофагами з великим ядром, дрібними лімфоцитами та фібробластами (рис. 2).

У прилеглий до нерва м'язовій тканині спостерігали ознаки хронічного запалення, на фоні якого виявлено проліферацію фібробластів (рис. 3).

Волокна у нервовому стовбурі були різного діаметра: від великого до дрібного. Часто траплялися нервові волокна, які замість типової для норми округлої мали неправильну, іноді зигзагоподібну форму. Товщина мієлінового покриття також значно варіювала.

Електронно-мікроскопічний аналіз показав наявність у нервовому стовбурі мієлінових та безмієлінових нервових волокон (рис. 4).

Більшість нервових волокон характеризувалася різним проявом деструкції мієлінового шару. Визначали нервові волокна з розшаруванням мієлінового покриття, фрагментацією та вакуолізацією мієліну (рис. 5). На інших нервових волокнах спостерігали

ділянки втрати мієлінового шару (рис. 6), які межували із зонами вакуолізації мієліну.

У безмієлінових нервових волокнах також виявляли деструктивні зміни — осередки розрідження та повного лізису нейрофіламентів у цитоплазмі відростків нейронів (рис. 7).

Поблизу нервових волокон траплялися шванівські клітини. Окремі з них містили ядро з розрідженим еухроматином і цитоплазму з ознаками набряку та низькою щільністю мембранних органел. У цитоплазмі мієлінових волокон нерідко знаходилися продукти деструкції мієліну (рис. 8).

У деяких шванівських клітинах було ядро з високим вмістом гетерохроматину (рис. 9), що вказує на знаходження таких клітин на етапах апоптозу. Виразений набряк між волокнами зафіксовано в ендоневрії, де значну територію займали ділянки, заповнені набряковою рідиною (рис. 9). Зрідка поблизу нервових волокон спостерігали бюнгнеровські

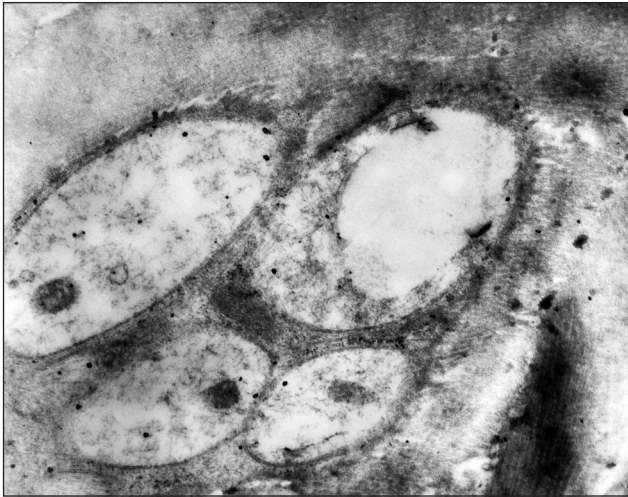


Рис. 7. Мікрофото. Деструкція безмієлінових нервових волокон. Осередки розрідження та лізису нейрофіламентів. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 22800

стрічки – проліферати шванівських клітин, що є відображенням локальних процесів репарації нерва [15, 16].

Результати нашого дослідження були подібні з іншими, які отримано за умов травматичного ушкодження периферичних нервів [17].

Таким чином, одержані в експериментальному дослідженні морфологічні результати щодо впливу на великогомілкову гілку сідничного нерва шурів аутологічного драглистого ядра за умов його трансплантації у ділянку розташування нерва довели, що контакт драглистого ядра з нервом зумовлює розвиток вираженого запального процесу та деструктивних змін не тільки у структурі нерва, а також у прилеглих до нього тканинах. Індукований цитокінами трансплантованого аутологічного драглистого ядра

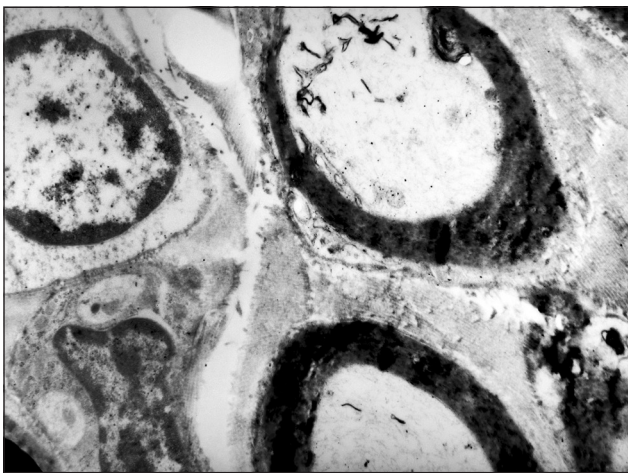


Рис. 8. Мікрофото. Безмієлінові нервові волокна біля шванівської клітини. Некробиоз іншої шванівської клітини. Деструкція та фрагментація мієліну. Продукти деструкції мієліну у нервовому волокні. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 10000

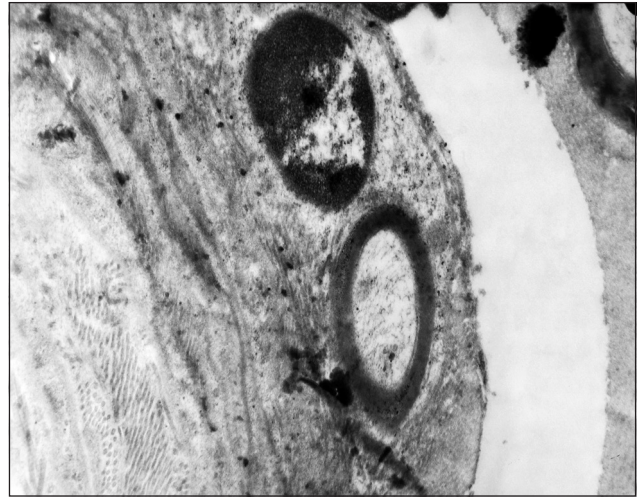


Рис. 9. Мікрофото. Деструктивна щілина та набряк у ділянці ендоневрію. Гетерохроматизація ядра шванівської клітини. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 10000

запально-деструктивний процес має тенденцію до хронізації, оскільки ознаки хронічного запалення та вираженої деструкції у нерві та периневральних тканинах спостерігали і через 15 діб після моделювання грижі диска.

Виконані експерименти можуть бути основою для використання розробленої моделі під час дослідження різних варіантів біологічної терапії, спрямованої на пригнічення біосинтезу фактора некрозу пухлин- α та інших прозапальних цитокінів у консервативному лікуванні гриж міжхребцевого диска.

Висновки

Трансплантація аутологічного драглистого ядра шурів до великогомілкової гілки сідничного нерва тварин призводить до розвитку у зоні впливу хронічного запально-деструктивного процесу.

Зафіксовано порушення форми, варіабельність діаметра мієлінових і безмієлінових нервових волокон та деструкцію мієлінового шару.

Деструктивні зміни у вигляді розрідження та лізису нейрофіламентів встановлені також у безмієлінових волокнах. Шванівські клітини мають ознаки деструкції, що проявляються високою гетерохроматизацією клітинного ядра.

Розроблена експериментальна модель може застосовуватися для розробки схем консервативного лікування гриж міжхребцевого диска.

Список літератури

1. Волков А. В. Экспериментальные модели дегенеративных заболеваний межпозвоночных дисков / А. В. Волков // Хирургия позвоночника. — 2007. — № 4. — С. 41–46.
2. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? / M. Alini, S. M. Eisenstein, K. Ito et al. // Eur.

- Spine J. — 2008. — Vol. 17. — P. 2–19.
3. Cavanaugh J. M. Neural mechanisms of lumbar pain / J. M. Cavanaugh // Spine. — 1995. — Vol. 16. — P. 1804–1809.
 4. Kulisch S. D. The tissue origin of low-back pain and sciatica: a report of pain response to tissue stimulation during operations on the lumbar spine using local anesthesia / S. D. Kulisch, C. L. Ulstrom, C. J. Michael // Orthop. Clin. North. Am. — 1991. — Vol. 22. — P. 181–187.
 5. Comparison of neuropathic pain induced by the application of normal and mechanically compressed nucleus pulposus to lumbar nerve roots in the rat / M. Kawakami, H. Hashizume, H. Nishi et al. // J. Orthop. Res. — 2003. — Vol. 21. — P. 535–539.
 6. Chronic inflammation and compression of the dorsal root contribute to sciatica induced by the intervertebral disc herniation in rats / S. X. Hou, J. G. Tang, H. S. Chen, J. Chen // Pain. — 2003. — Vol. 105. — P. 255–264.
 7. Экспериментальные аспекты моделирования грыжи межпозвоночного диска (аналитический обзор литературы) / В. А. Радченко, Н. В. Дедух, Л. М. Бенгус, М. В. Шимон // Боль, суставы, позвоночник. — 2011. — № 2. — С. 88–93.
 8. Olmarker K. Autologous nucleus pulposus induces neurophysiologic and histologic changes in porcine cauda equina nerve roots / K. Olmarker, B. Rydevik, C. Nordborg // Spine. — 1993. — Vol. 18. — P. 1425–1432.
 9. Mechanical and biochemical injury of spinal nerve roots: a morphological and neurophysiological study / M. Cornefjord, K. Olmarker, R. Rydevik, C. Nordborg // Eur. Spine J. — 1996. — Vol. 5. — P. 187–192.
 10. Дедух Н. В. Вплив драглистого ядра міжхребцевого диска на великогомілкову гілку сідничного нерва / Н. В. Дедух, С. В. Малишкіна, М. В. Шимон // — Український медичний альманах. — 2011. — Т. 14, № 4. — С. 42–45.
 11. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс] — Режим доступу: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?reg=994_137.
 12. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — 542 с.
 13. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. — М.: Мир, 1975. — 324 с.
 14. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // J. Cell Biol. — 1963. — Vol. 17. — P. 208–212.
 15. Боровский М. Л. Регенерация нерва и трофика / М. Л. Боровский. — М.: Изд-во Академии мед. наук, 1952. — 224 с.
 16. Морфологічні зміни сідничного нерва після його ушкодження шляхом електрокоагуляції (експериментальне дослідження) / О. І. Продан, Л. М. Бенгус, О. А. Сиренко, А. І. Попов // Науковий вісник Ужгородського університету. — 2007. — Вип. 32. — С. 149–152. — (Серія «Медицина»).
 17. Mumenthaler M. Laesionen peripher nerven und radikulare syndrome / M. Mumenthaler, H. Schliack, M. Stohr. — Auflage, Stuttgart: Thieme, 1998. — P. 261–368.

Стаття надійшла до редакції 13.06.2012