

© Чайковский Ю.Б., Храпай Е.В., 2010

УДК 616.833-0.89.85-003.93:615.31:577.115.3

РАННЯЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНАЯ ФАРМАКОТЕРАПИЯ ТРАВМЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ю.Б. Чайковский, Е.В. Храпай

*Кафедра гистологии и эмбриологии (зав. – член-корр. НАМН Украины, проф. Ю.Б. Чайковский)
Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, г. Киев*

РАННЯ ВІДНОВНА ФАРМАКОТЕРАПІЯ ТРАВМИ ПЕРИФЕРІЙНОГО НЕРВА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Резюме. Вивчені особливості терапевтичного впливу Ліпіну з Корвітином та Ліпофлавану на ранніх етапах посттравматичного відновлення периферійного нерва в експерименті. Показано, що Корвітин з Ліпіном та Ліпофлаван підвищують процеси відновлення структурних елементів нерва, зокрема, посилюють регенерацію нервових волокон та їх мієлінізацію. Ліпофлаван виявляє ефективніший вплив, що виразилося в активації ангиогенезу в зоні травмування та зниженні утворення сполучнотканинних рубців.

Ключові слова: сідничний нерв, травма, Ліпін, Корвітин, Ліпофлаван.

Проблема регенерации периферических нервных стволов привлекает внимание многих исследователей в области биологии и медицины, так как более 60% пострадавших становятся инвалидами II-III групп [1, 2]. Ранее нами [3] изучены структурные нарушения, которые развиваются в периферическом нерве при его травмировании, описаны особенности фармакологической коррекции данных нарушений на отдельных этапах восстановления (12 нед.) с использованием лекарственных средств Липофлаван и комбинированного влияния Корвитина с Липином при местном введении. Показано, что терапия этими препаратами улучшает эффективность регенерации нервных волокон и кровеносных сосудов во всех отделах поврежденного нерва. Для более детального изучения этих процессов нами были проведены опыты сравнительного изучения влияния Липофлавана и Корвитина с Липином на ранних сроках посттравматического периода (3 и 6 нед.). Липин представляет собой фосфатидилхолин, а Корвитин – кверцетин, предотвращающий разрушение клеточных мембран. Липофлаван,

будучи липосомальной формой кверцетина, является более эффективной формой доставки лекарственного средства к терапевтическим мишеням.

Цель исследования. Изучить ранние терапевтические эффекты Липофлавана и Липина с Корвитинном на восстановление травмированного периферического нерва в эксперименте.

Материал и методы. Работа выполнена на 47 белых крысах (самках) массой 180-250 г. Опытные животные были разделены на 5 групп (табл. 1). Полную аксотомию седалищного нерва

Таблиця 1

**Распределение животных по группам
в зависимости от вводимого препарата
и периода восстановления**

Группа	Препарат	Период восстановления
1	Контроль (n=7)	-
2	Корвитин+Липин (n=10)	3 недели
3	Корвитин+Липин (n=10)	6 недель
4	Липофлаван (n=10)	3 недели
5	Липофлаван (n=10)	6 недель

ва воспроизводили в следующем порядке. Проводили оперативный доступ к правому седалищному нерву, последний мобилизовали и пересекали на уровне середины бедренной кости крысы. Проксимальный и дистальный концы нерва сшивали эпиневральным швом ниткой "Ethicon" (Шотландия) 10/0 на атравматической иголке, оставляя диастаз размером 1 мм. Проксимальный отдел нерва на расстоянии 3-5 мм от области травмирования размождали с помощью пинцета, рану зашивали. Препараты вводили параневрально в течение 10 дней после травмы: Липофлавон ("Биолек", Харьков) – 0,1 мг/кг, Липин ("Биолек", Харьков) – 0,1 мг/кг, Корвитин ("Борщаговский химико-фармацевтический завод", Киев) – 0,2 мг/кг. Спустя 3 и 6 нед. у животных производили забор материала для дальнейшего микроскопического исследования. Для гистологического исследования нер-

вы фиксировали в течение суток в 10% нейтральном формалине. Изготавливали срезы на криотоме и импрегнировали в азотнокислом серебре [4]. Для изучения фармакологического эффекта исследуемых препаратов использовали морфометрические показатели: плотность нервных волокон и угол их отклонения от оси травмированного нерва. Экспериментальные исследования на животных проводили с учетом требований Guide of the Care and Use of Laboratory Animals (1996).

Результаты исследования и их обсуждение. Влияние комбинированного действия Липина с Корвитином на посттравматическое восстановление нерва. Через 3 нед. после операции наблюдали полиморфный характер процессов регенерации структурных элементов поврежденного нерва. Во всех отделах установлено наличие нервных волокон, но их количест-

Таблица 2

Изменение плотности расположения нервных волокон в норме и при фармакокоррекции на ранних этапах восстановления

Модель фармакокоррекции	Проксимальный отдел	Зона травмы	Дистальный отдел
Контроль	10505,05±346,77		
Корвитин+Липин, 3 недели	9250,68±385,365a	8516,64±333,01	6024,43±200,67a
Корвитин+Липин, 6 недель	10132,59±385,38	9669,64±671,68	8188,8±184,71a
Липофлавон, 3 недели	10450,17±258,63b	8693,92±590,38	6948,04±460,74a,b
Липофлавон, 6 недель	9471,04±211,51a	9175,56±485,13	9071,29±287,04a,b

Примечания: а – достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$); b – достоверно по отношению к травме при лечении Липином с Корвитином ($p < 0,05$).

Таблица 3

Изменение угла отклонения нервных волокон от оси травмированного нерва

Модель фармакокоррекции	Проксимальный отдел	Зона травмы	Дистальный отдел
Контроль	23,77±1,64°		
Корвитин+Липин, 3 недели	28,55±1,40°a	30,98±1,33°	27,81±1,75°a
Корвитин+Липин, 6 недель	29,71±1,40°a	30,45±1,78°	30,75±1,46°a
Липофлавон, 3 недели	30,83±1,82°a	22,15±1,78°b	15,35±0,85°a,b
Липофлавон, 6 недель	25,25±1,80°a	23,82±1,86°b	27,14±1,63°b

Примечания: а – достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$); b – достоверно по отношению к травме при лечении Липином с Корвитином ($p < 0,05$).

во и особенности расположения в отдельных зонах существенно отличались. В проксимальном отделе характер распределения нервных волокон существенно не отличался от контрольных. Нервные волокна были гиперимпрегнированы, отмечено пролиферацию шванновских клеток и формирование новых аксонов. Плотность нервных волокон при травмировании нерва уменьшается, при этом увеличивается их угол отклонения от оси поврежденного нерва (табл. 2, 3). Нервные волокна вблизи эпинеуря часто имели ампулоподобные расширения аксонов, встречались спирали Перрончито. В зоне шва волокна были расположены на поверхности регенерационной невромы, формируя отдельные кластеры, огибая зону шва. У большинства животных в зоне шва формируется соединительнотканый рубец, в котором также присутствовали спирали Перрончито. В дистальном отделе нервные волокна имеют извилистый вид и ориентированы диффузно. Вокруг волокон отмечена активная пролиферация шванновских клеток и фибробластов. Встречались рекуррентные нервные волокна. Плотность нервных волокон при травмировании нерва существенно меньше. Угол отклонения нервных волокон от оси нерва также увеличился. Встречаются группы макрофагов и тканевых базофилов с множеством цитоплазматических гранул. Таким образом, на ранних этапах (3 нед.) после травмы Липин с Корвитином способствуют регенерации нервных волокон в дистальном отделе. Формирование соединительнотканых рубцов затрудняет эти процессы, о чем свидетельствует образование спиралей Перрончито и рекуррентных волокон. Также отмечены признаки развития воспалительного процесса.

Через 6 нед. после травмы наблюдали полиморфный характер процессов регенерации структурных элементов поврежденного нерва. В проксимальном отделе встречаются дополнительные группы нервных волокон, которые расположены, главным образом, на поверхности нерва. Новообразованные нервные волокна имеют тонкий и часто извилистый вид. Плотность их расположения восстанавливается до контрольных значений, но угол отклонения нервных волокон от оси нерва увеличен (табл. 2, 3). У большинства нервных волокон присутствует шванновская оболочка неравномерной толщины. Отмечена пролиферация фибробластов и образо-

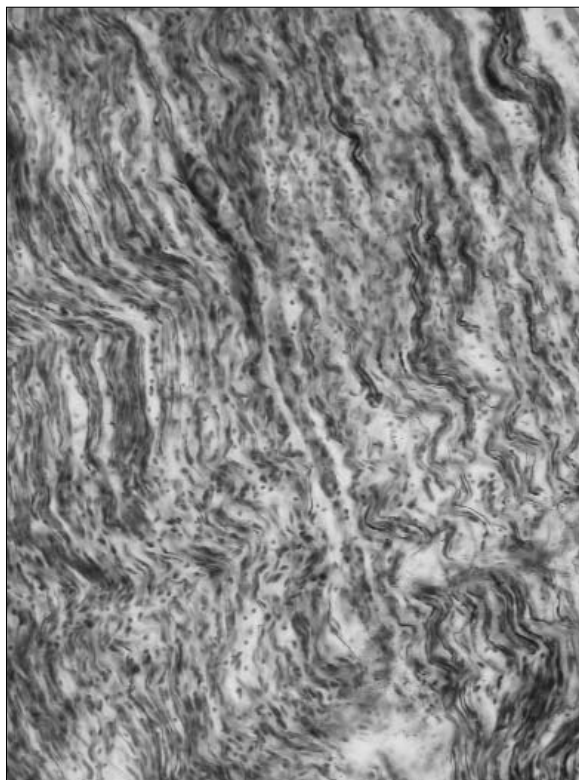


Рис. 1. Дистальный отдел травмированного нерва через 6 недель после операции (лечение Липином с Корвитином): диффузно ориентированные тяжи нервных волокон с активной пролиферацией шванновских клеток. Микропрепарат. Импрегнация серебром. Об. 40, ок. 10.

вание кровеносных сосудов разного диаметра. В зоне шва нервные волокна имеют разнонаправленную ориентацию. Это обусловлено тем, что на 6-й нед. в зоне шва сформировались группы рубцов, состоящие из соединительной ткани. Нервные волокна в таких зонах останавливаются в регенерации, о чем свидетельствует их гиперимпрегнация и формирование спиралей Перрончито с ампулоподобными расширениями аксонов. Вблизи эпинеуря отмечено множество кровеносных сосудов разного диаметра. Встречаются группы макрофагов. Дистальный отдел представлен несколькими тяжами нервных волокон, которые гипоимпрегнированы и ориентированы диффузно (рис. 1). Плотность волокон существенно возросла по сравнению с предыдущим периодом, при этом угол отклонения нервных волокон от оси нерва не изменился. Между ними по-прежнему продолжается пролиферация шванновских клеток. Встречаются единичные дегранулированные тканевые базофилы. Таким образом, на 6 нед. восста-

новительного периода продолжают регенерационные процессы в травмированном нерве. В проксимальном отделе завершается миелинизация новообразованных нервных волокон, а в дистальном волокна формируют отдельные крупные тяжи. При этом формирование соединительнотканых рубцов и воспалительные реакции продолжают.

Влияние Липофлавона на посттравматическое восстановление нерва. Под влиянием Липофлавона особенности морфологических изменений на 3 нед. после травмы имели иной характер. Макроскопически все отделы травмированного нерва четко различались. Нервные волокна также присутствовали во всех отделах нерва. В проксимальном отделе нервные волокна существенно не отличались от контрольных и характеризовались разной толщиной миелиновых оболочек. Нервные волокна были гиперимпрегнированы, вокруг них встречались активные шванновские клетки и колбы роста. Плотность их расположения не отличается от контрольных значений, но угол отклонения нервных волокон значительно увеличился (табл. 2, 3). Встречались группы кровеносных сосудов разного диаметра. Они часто формируют сплетения и анастомозы, множество сосудов прорастает в зоне травмы. Ампулоподобные расширения аксонов встречаются лишь у некоторых нервных волокон, расположенных вблизи эпинеуря. В зоне шва нервные волокна были расположены как на поверхности регенерационной невромы, так и в ее толще, пересекая ее насквозь. Нервные волокна расположены диффузно. Такой характер регенерации в области шва связан с тем, что количество соединительнотканых рубцов было меньшим, а их плотность была не столь плотной, как у предыдущих групп животных. В результате этого количество регенерировавших волокон в дистальном отделе больше, но они по-прежнему ориентированы диффузно. Плотность волокон достоверно увеличилась в сравнении с группой животных, получавших Липин с Корвитином. При этом характеристика отклонения нервных волокон имела другой характер. Угол волокон значительно снизился, что свидетельствует о беспрепятственном прорастании нервных волокон в дистальный нерв. Также отмечается активная пролиферация шванновских клеток. Встречаются группы макрофагов и тканевых базофи-

лов с цитоплазматическими гранулами. Таким образом, на ранних этапах (3 нед.) после травмы Липофлавон в большей мере способствовал регенерации нервных волокон в травмированном нерве. Причинами являются снижение образования соединительнотканых рубцов в зоне травмы и активный ангиогенез, что ускорило прорастание волокон сквозь зону травмы.

Через 6 нед. после травмы у животных, получавших Липофлавон, большинство нервных волокон в проксимальном отделе было миелинизированным. Встречались единичные колбы роста. Отмечено незначительное уменьшение плотности нервных волокон, но угол отклонения нервных волокон соответствовал контрольным значениям (табл. 2, 3). Пролиферация фибробластов и шванновских клеток отмечена лишь в отдельных зонах перехода проксимального отдела в зону шва, где нервные волокна формируют группы крупных кластеров, которые ориентированы в толще и на поверхности регенерационной невромы. Вблизи эпинеуря отмечено множество кровеносных сосудов раз-



Рис. 2. Дистальный отдел травмированного нерва через 6 недель после операции (лечение Липофлавоном): нервные волокна расположены более плотными группами; продольно ориентированные тяжи нервных волокон. Микропрепарат. Импрегнация серебром. Об. 40, ок. 10.

ного диаметра. Встречаются единичные макрофаги. Дистальный отдел представлен несколькими тяжами, в которых нервные волокна гипогиперимпрегнированы и ориентированы вдоль оси нерва (рис. 2). Между ними присутствуют шванновские клетки с меньшей активностью пролиферации. Плотность волокон достоверно увеличилась в сравнении с Корвитином и Липином, угол отклонения нервных волокон имел подобную тенденцию. Таким образом, на 6-й нед. восстановительного периода под действием Липофлавона продолжают развиваться процессы, описанные на ранних этапах восстановления. Нервные волокна в большей степени регенерируют в дистальный отдел нерва, они ориентированы вдоль сосудов, которые активно восстанавливаются после травмы. В дистальном отделе нервные волокна формируют отдельные крупные тяжи, которые ориентированы вдоль оси нерва. При этом существенного формирования соединительнотканых рубцов и развития воспалительных реакций не отмечается.

При сравнительном изучении влияния Липофлавона и комбинированного действия Корвитина с Липином были установлены некоторые различия. Под влиянием Липина с Корвитином в проксимальном отделе нервные волокна были плотно организованы и незначительно отклонялись от оси нерва. Нервные волокна регенерировали в дистальный отдел группами. В области шва отмечены зоны развития соединительнотканного рубца. В случае применения Липофлавона в проксимальном отделе нерва волокна располагались группами, между которыми встречались колбы роста. Регенерировавшие нервные волокна прорастают в дистальный отдел более активно, что связано со снижением формирования соединительнотканых рубцов в области шва нерва. Встречаются нервные волокна на разных стадиях миелинизирующего процесса. В дистальном отделе

встречаются группы активных шванновских клеток, вокруг которых расположены тонкие нервные волокна.

Таким образом, разработанный в Украине Липофлавон в большей мере, чем Липин с Корвитином, оказывает стимулирующее действие на активность регенерационных процессов. Это обусловлено тем, что Липофлавон, представленный липосомальной формой кверцетина, защищает нервные клетки от окислительного стресса, активизирует эндогенные антиоксидантные системы защиты, снижает развитие воспалительного процесса и повышает рост нейритов [5, 6]. Мы использовали Липофлавон, применяемый при многих заболеваниях, как более эффективную форму доставки лекарственного средства к терапевтическим мишеням при травматическом повреждении нервных волокон.

Выводы и перспективы научного поиска.

1. Позитивный эффект Липофлавона можно связывать с тем, что липосомальная форма, как продукт нанотехнологических разработок, имеет высокую тропность к клеточным мембранам.
2. Липосомальная форма препарата ускоряет прорастание и миелинизацию нервных волокон, что связано с антиоксидантными свойствами кверцетина.
3. Липосомальная форма кверцетина (Липофлавон) способствует эффективной доставке лекарственного средства к терапевтическим мишеням. Это стимулирует процессы регенерации нервных волокон и их восстановления, что может предотвратить развитие дегенеративных процессов на поздних этапах восстановления.
4. Использование Липина с Корвитином и Липофлавона может стать почвой для разработки новой методики терапии травматических повреждений периферической нервной системы. Липофлавон может быть рассмотрен как альтернативный препарат в лекарственной терапии острого периода травмы периферических нервов.

Литература

1. *Периферійний нерв (нейроно-судинно-десмальні взаємовідношення в нормі та патології)* / [Геращенко С.Б., Дельцова О.І., Коломійцев А.К., Чайковський Ю.Б.]. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2005. – 342 с.
2. *Повышение эффективности микрохирургических операций у больных с последствием травм срединного и локтевого нервов области предплечья* / [Цымбалюк В.И., Чайковский Ю.Б., Ломако Л.А., Фисенко Л.И.]. – К.: АТЗТ “Компания “РАДА”, 1998. – 118 с.
3. Храпай Е.В. Липофлавон повышает регенерацию нервных волокон в условиях экспериментальной модели травмы периферического нерва / Е.В.Храпай // *Инн. технол. у експер. мед. та біол.* – 2010.
4. Коломійцев А.К. Быстрый метод импрегнации азотнокислым серебром элементов периферической нервной системы, пригодный для парафиновых и целлоидиновых срезов / А.К.Коломійцев,

Ю.Б.Чайковский, Т.Л.Тереженко // *Арх. анат.* – 1981. – Т. 81, № 8. – С. 93-96. 5. Skaper S.D. *Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperation effects of ascorbic acid* / S.D.Skaper, M.Fabris, V.Ferrari [et al.] // *Free Radical Biol. and Med.* – 1997. – Vol. 22, № 4. – P. 669-678. 6. Wadsworth T.L. *Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha* / T.L.Wadsworth, T.L.McDonald, D.R.Koop // *Biochem. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 62, № 7. – P. 963-974.

РАННЯЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНАЯ ФАРМАКОТЕРАПИЯ ТРАВМЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Резюме. Изучены особенности терапевтического влияния Липина с Корвитином и Липофлавоном на ранних этапах посттравматического восстановления периферического нерва в эксперименте. Корвитин с Липином и Липофлавоном повышают процессы восстановления структурных элементов нерва, в частности, усиливают регенерацию нервных волокон и их миелинизацию. Липофлавоном оказывает более эффективное влияние, что выражалось в активации ангиогенеза в зоне травмирования и снижении образования соединительнотканых рубцов.

Ключевые слова: седалищный нерв, травма, Липин, Корвитин, Липофлавоном.

EARLY RESTORATIVE PHARMACOTHERAPY OF AN EXPERIMENTAL PERIPHERAL NERVE INJURY

Abstract. The authors have studied the specific characteristics of the therapeutic effect of Lipin with Corvitin and Lipoflavon at early stages of posttraumatic recovery of the peripheral nerve in an experiment. Corvitin with Lipin and Lipoflavon have been shown to enhance the processes of restoring the structural elements of the nerve, in particular, increase the regeneration of the nerve fibers and their myelination. Lipoflavon exerts a more effective influence that was reflected in an activation of an angiogenesis in the affected zone and a decrease of connective tissue cicatrization.

Key words: sciatic nerve, injury, Lipin, Corvitin, Lipoflavon.

O.O.Bohomolets' National Medical University (Kyiv)

Надійшла 14.08.2010 р.

Рецензент – д. мед. н. Л.Я.Федонюк (Чернівці)