

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України»

*Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису*

ПЕТРІВ ТАРАС ІГОРОВИЧ

УДК 616-089.843:591.881:616.833-001.93-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ
ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НЕРВОВОГО
ГРЕБЕНЯ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА ПРИ
ЙОГО ТРАВМАТИЧНОМУ УРАЖЕННІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

14.01.05 — нейрохірургія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Т.І. Петрів

Науковий керівник:

Цимбалюк Віталій Іванович

доктор медичних наук, професор,

член-кореспондент НАН України,

академік НАМН України

Київ — 2019

АНОТАЦІЯ

Петрів Т.І. Вплив трансплантації стовбурових клітин нервового гребеня на регенерацію периферичного нерва при його травматичному ураженні в експерименті. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальності 14.01.05 — нейрохірургія. ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», Київ, 2019 р.

У дисертації на підставі проведеного комплексного дослідження представлено теоретичне узагальнення та новий підхід до подолання дефектів периферичних нервів великого розміру, шляхом застосування стовбурових клітин нервового гребеня. Дослідження виконано на 55 білих безпородних щурах-самцях (250 ± 25 г, 5–6 міс), утримуваних у стандартних умовах віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України». Тварини були розділені на 4 групи, 3 з яких, у свою чергу, розділялася на 2 підгрупи (з часовими проміжками спостереження 4 тижні та 8 тижнів). 4 група тварин (псевдооперовані) використовувалися для отримання контрольних показників функціонального індексу сідничного нерва. 3 тварини були відібрані для визначення функціональної активності стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня (СКНГ) в складі тканинно-інженерного матрикса. СКНГ виділялися методом експлантатів за М. Sieber-Blum та співавторів у модифікації Р.Г. Васильєва з валика бруньки волосяного фолікула вібрис безпорідних дорослих щурів самців ($n=3$) віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» на базі ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України».

Тканинно-інженерний матрикс для пластики дефекту периферичного нерва великого розміру виготовляли СКНГ за двоетапною технікою. На першому етапі проводили імплантацію 200 тисяч СКНГ на внутрішню поверхню колагенового матрикса довжиною 1,2 см. Для цього закривали

один кінець матрикса фібриновим згустком, вносили суспензію клітин у поживному середовищі, та закривали другий кінець трубки аналогічним чином. Для рівномірного розподілу клітин матрикс поміщали у роллерну установку CellNest Roller D2 (SINO-BIOTOP, Китай), яка знаходилась у мультигазовому інкубаторі та культивували на протязі 24 годин із швидкістю 20 обертів за хвилину. На другому етапі на наступну добу поміщали ще 800 тисяч СКНГ у порожнину матрикса шляхом полімеризації фібринового гелю, що був виготовлений із крові щурів. У якості моделі травми периферичного нерва використано пластику нерва тканинно-інженерним матриксом на основі стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня.

Хірургічні втручання виконували під загальним знеболенням (внутрішньоочеревинне введення суміші розчинів ксилазину гідрохлориду 15 мг/кг та кетаміну гідрохлориду 70 мг/кг маси тіла). Тварину фіксували на операційному столику черевцем донизу. Дотримуючись правил асептики та антисептики, після обробки операційного поля, виконували лінійний розріз шкіри по латеральній поверхні стегна у проекції сідничного нерва (СН) зліва. За допомогою інструментів (затискач типу “москіт”, пінцет хірургічний) тупо виділяли та мобілізували лівий СН. На відстані ($20 \pm 1,5$) мм від точки виходу СН з порожнини малого таза за допомогою леза висікали фрагмент довжиною (10 ± 2) мм. У тварин групи 1 висічений фрагмент повертали на 180° і фіксували кінець-в-кінець шляхом епіневральної нейрорафії сертифікованою атравматичною голкою з монофіламентною поліамідною ниткою № 10/0 з використанням операційного мікроскопа (збільшення $\times 12$). У тварин групи 2 здійснювали пластику зони діастазу СН з використанням колагенового матриксу заповненого фібриновим гелем, шляхом епіневральної фіксації. У тварин групи 3 діастаз між кінцями СН усували аналогічним чином, проте, у колагеновий матрикс попередньо імплантували алогенні СКНГ у кількості 1×10^6 клітин. У тварин групи 4 після мобілізації СН невротомію не виконували. Після ретельного гемостазу в усіх групах тварин пошарове зашивання післяопераційної рани проводилося за

допомогою атравматичної голки із сертифікованою монофіламентною поліамідною ниткою 4/0. З метою попередження інфекційних ускладнень у задню шийну ділянку підшкірно вводили розчин бензилпеніциліну у дозі 1 млн. ОД на 1 кг маси тіла. З метою протизапальної і протинабрякової терапії інтраперитонеально вводили розчин дексаметазону у дозі 6 мг/кг маси тіла. Після хірургічного втручання контрольні і дослідні тварини отримували однакове харчування згідно норм віварію. Усі відновні мікрохірургічні втручання виконано відразу після травми у зоні дефекту периферичного нерва.

Проведено функціональні (“тест з біговою доріжкою” (“Walking track test”)), електрофізіологічні, культуральні, імуногістохімічні, гістологічні і статистичні дослідження. Функціональний індекс сідничного нерва (sciatic functional index, SFI) розраховували в усіх групах тварин протягом 8 тижнів щотижнево. ЕНМГ виконували у тварин усіх експериментальних груп через 4 та 8 тижнів після операції. Через 4 тижні після операції 7 тварин з групи 1 (аутонейропластика), 7 тварин з групи 2 (імплантація тканинно-інженерного матрикса без стовбурових клітин) та 8 тварин з групи 3 (імплантація тканинно-інженерного матрикса із вмістом стовбурових клітин нервового гребеня) виводили з експерименту. Через 8 тижнів після операції виводили з експерименту 7 тварин групи 1, 8 тварин групи 2 і 8 тварин групи 3. Виведення вищевказаних тварин з експерименту відбувалося після проведення прямої стимулюючої електронейроміографії. Для гістологічного та імуногістохімічного дослідження використовувалися: у групі 1 ділянка аутотрансплантату довжиною 10 мм, ділянки нерва проксимальніше і дистальніше мікрохірургічного шва (довжиною по 3 мм). У тварин 2 і 3 груп: тканинно-інженерний матрикс (довжиною 10 мм), ділянки нерва проксимальніше і дистальніше мікрохірургічного шва (довжиною по 3 мм).

Для світлооптичної мікроскопії біологічний матеріал фіксували протягом доби в 10% розчині нейтрального формаліну, промивали зразки, зневоднювали у серії спиртів, заключали їх у парафін та отримували зрізи

товщиною 10 мкм на мікротомі. Потім зрізи депарафінізували у ксилолі та імпрегнували азотнокислим сріблом згідно методу Більшовського-Гросс. Депарафіновані і промиті у дистильованій воді зрізи також фарбували у розчині люксолеового міцного синього 2 години при температурі + 56–60°C. Промивали зрізи у 96% і 70% спиртах і дистильовані воді. Диференціювали пофарбовані зрізи у 0,1% розчині тетраборату натрію, контролюючи процес під мікроскопом. Після закінчення диференціації зрізів їх прополіскували у 5% розчині оцтової кислоти. Потім зрізи фарбували крезоловим фіолетовим міцним, 5 хвилин, промивали у дистильованій воді та зневоднювали у 96% спирті, просвітлювали у ксилолі і покривали середовищем для фіксації.

Мікроскопію проводили на мікроскопі Axio Observer A1, оснащеному цифровою камерою AxioCam ERc 5s і ліцензійним програмним забезпеченням ZEN 2012.

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного пакету STATISTICA 10.0 на персональному комп'ютері. Достовірність різниці даних правої та лівої задньої кінцівки у межах кожної групи оцінювали за Уїлкоксоном (Wilcoxon Matched Pairs Test), гомолатеральних кінцівок у межах кожної групи на різних термінах спостереження, а також між різними групами на однакових термінах спостереження — за допомогою U-тесту Мана-Уїтні (Mann-Whitney U-test). У всіх випадках припущення щодо статистичної значущості отриманого результату вважали вірним, якщо ймовірність нульової гіпотези була меншою ніж 0,05 ($p < 0,05$).

За даними функціонального тесту у групах 1 і 3 спостерігали динаміку SFI, яка характеризувалася двофазністю. Перша фаза включала практично лінійне зростання показника від значення у — 70 на 1 тижні спостереження до — 35 станом на кінець 4 тижня спостереження. У групі 1 статистично значуще щотижневе збільшення показника SFI реєстрували протягом 2–5 тижня ($p < 0,03$), у групі 3 — протягом 2–4 тижня. Друга фаза тривала протягом 6–7 та 5–7 тижня у групі 1 та 3 відповідно і характеризувалася

відсутністю змін показника. Третю фазу приросту SFI спостерігали протягом 8 тижня: збільшення показника групи 3 протягом цього періоду виявилось статистично значущим ($p=0,01$), Характерною для 2 групи була відсутність фази приросту показника протягом 2 тижня спостереження. У подальшому, протягом 3–4 тижня виявляли статистично значущий приріст показника ($p<0,01$), стабілізацію (протягом 5–6 тижня), приріст показника протягом 7 тижня ($p=0,036$), порівняно зі значенням станом на 5 тижень спостереження. Отже, як і у групах 1 та 3, у випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса без СКНГ (група 2), приріст SFI відбувається двоетапно, його тривалість, а також тривалість проміжної фази плато вкорочена, результативність менша. Отримані дані свідчать, що менший кінцевий результат відновного процесу у цій групі обумовлений відсутністю позитивної динаміки протягом 2 тижня спостереження. Протягом усього періоду спостереження між значеннями SFI груп 1 та 3 вірогідних відмінностей не виявлено ($p>0,05$). Статистично значущі відмінності ($p<0,05$) між показниками групи 1 та 2, а також групи 2 та 3 на користь груп 1 та 3 відповідно виявляли починаючи з 14 доби й до кінця експерименту. Гірші результати функціонального відновлення у групі 2, свідчить про стимулюючий вплив стовбурових клітин на відновлення периферичного нерва в експерименті.

За даними ЕНМГ, показники Амв та ЛПмв у групі 3 максимально наближені до показників у групі 1. Електрофізіологічні показники у групі 2 були нижчими. Наприкінці 4 тижня спостереження у групі 1 Амв оперованої кінцівки (ОК) була статистично значущо ($p=0,018$) менша, ніж інтактної кінцівки (ІК) — відповідно ($3,3\pm0,5$) та ($16,5\pm2,3$) мВ і складала 27,9% від норми. У групах 2 і 3 відзначали статистично значуще ($p=0,018$) переважання Амв ІК: в групі 2 — ($16,5\pm2,3$) і ($0,9\pm0,2$) мВ; в групі 3 — ($14,7\pm2,2$) та ($2,3\pm0,2$) мВ; $p=0,018$), що складало 14,2% і 18,3% від норми. Наприкінці 8 тижня спостереження у групі 1 Амв оперованої кінцівки (ОК) була статистично значущо ($p=0,017$) менша, ніж інтактної кінцівки (ІК) —

відповідно ($4,1 \pm 0,7$) та ($20,3 \pm 3,0$) мВ і складала 34,3% від норми. У групах 2 і 3 відзначали статистично значуще переважання Амв ІК: в групі 2 — ($14,8 \pm 1,8$) і ($1,4 \pm 0,3$) мВ ($p=0,001$); в групі 3 — ($14,8 \pm 1,8$) та ($2,9 \pm 0,4$) мВ ($p=0,018$), що складало 19,7% і 24,9% від норми. Станом на 8 тижень спостереження відмічали достовірну перевагу величини Амв ОК кінцівки тварин групи 1 ($4,1 \pm 0,7$ мВ) лише над показником групи 2 ($1,4 \pm 0,3$ мВ; $p=0,007$). Статистично значуща різниця виявлена і між значеннями показника групи 2 і 3 ($2,9 \pm 0,4$; $p=0,018$) на користь останньої. Значення Амв ОК кінцівки груп 1, 2 і 3 достовірно поступались значенню групи 4 ($22,4 \pm 2,2$ мВ; $p=0,006$, $p=0,004$, $p=0,004$, відповідно). Різниці значень аналогічного показника інтактних кінцівок виявлено не було. ЛПмв ОК у групі 2 ($4,09 \pm 1,97$ мс) достовірно поступалося значенню групи 1 ($1,26 \pm 0,16$ мс; $p=0,009$), групи 3 ($1,86 \pm 0,26$ мс; $p=0,002$) і групи 4 ($1,22 \pm 0,6$ мс; $p=0,002$). Різниця між ЛПмв у 1 та 3 групах, 2 та 3 групах статистично достовірна на користь групи 1 та 3 відповідно ($p=0,002$; $p=0,004$). Наприкінці 8 тижня спостереження ЛПмв у ОК тварин групи 2 ($2,5 \pm 0,6$ мс) відрізнявся від групи 1 ($1,1 \pm 0,2$ мс; $p=0,012$). Статистично значущу різницю виявляли також при порівнянні ЛПмв у групах 2 і 4 (на користь групи 2 — $2,5 \pm 0,6$ мс, $p=0,045$).

Через 4 тижні у тканинно-інженерному матриксі виявлялася експресія фактора p75, на відміну від 8 тижня, що говорить про здатність стовбурових клітин нервового гребеня набувати “шванівського” фенотипу до кінця цього періоду. Експресія β -III-тубуліну, S100b та MBP на 4 та на 8 тижнях опосередковано свідчить про проростання нервових волокон та їх мієлінізацію. Гістоархітектоніка тканинно-інженерного матрикса за товщиною нервових волокон ($0,0043 \pm 0,002$ мм на 4 тижні і $0,007 \pm 0,0001$ мм на 8 тижні) та щільністю розташування аксонів ($3338,6 \pm 302,7$ на 1мм^2 на 4 тижні і $3140,66 \pm 357$ на 1мм^2 на 8 тижні) статистично значуще не відрізняється від ділянки нерва, відновленого шляхом аутонейропластики (товщина нервових волокон $0,029 \pm 0,0004$ мм на 4 тижні та $0,006 \pm 0,0004$ на 8

тижні, щільність розташування аксонів $3566,8 \pm 598$ на 1мм^2 на 4 тижні і $3389 \pm 387,9$ на 1мм^2 на 8 тижні, $p \leq 0,05$).

Дослідження розширює наукові уявлення щодо впливу стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня на регенерацію периферичного нерва. Можливе клінічне впровадження апробованого у дослідженні методу відновлення периферичного нерва за умов його дефекту великого розміру, у перспективі, може покращити результати лікування пацієнтів із травмами периферичних нервів та їх наслідками.

Ключові слова: травма, периферичний нерв, стовбурові клітини, фенотип нервового гребеня, тканинна інженерія, експеримент.

SUMMARY

Petriv T.I. Effect of the neural crest stem cells transplantation on regeneration of the peripheral nerve after its traumatic injury in the experiment. — Qualifying scientific work copyrighted as a manuscript.

Summary for a candidate degree in medical sciences in specialty 14.01.05 — neurosurgery. State Institution “Romodanov Neurosurgery Institute, National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv, 2019.

In the dissertation on the basis of the complex research work the theoretical foundation and a new approach to the resolving of a scientific problem of large peripheral nerve gaps restoration by application of neural crest stem cells is presented. The study was carried out on 55 white outbred male rats (250 ± 25 g, 5–6 months), keep under standard condition in vivarium of State Institution "Romodanov Neurosurgery Institute NAMS of Ukraine". Animals were divided into 4 groups, 3 of which, in turn, were divided into 2 subgroups (with time intervals of observation 4 weeks and 8 weeks). The 4th group of animals (sham operated) was used to obtain the control footprints for the functional index of the sciatic nerve. Three animals were selected to determine the vital activity of the neural crest stem cells (NCSC) as part of the tissue engineering scaffold. The NCSCs were isolated by the explants method by Sieber-Blum et al. in the modification of Vasyliiev RG from the bulge region of the vibrissae hair follicle of adult male rats ($n=3$) of vivarium of the SI "Romodanov Neurosurgery Institute NAMS of Ukraine" on the basis of the Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the NAMS of Ukraine.

The tissue-engineering scaffold (TES) for the nerve gap restoration was made by a two-stage technique. At the first stage, 200,000 NCSCs were seeded on the inner surface of the collagen tube 1,2 cm in length. For this, one end of the tube was sealed, a cell suspension in the condition medium was loaded, and the other end closed. For uniform distribution of cells, the scaffold was placed in a roller

unit of CellNest Roller D2 (SINO-BIOTOP, China) that was in a multi-gas incubator and cultivated for 24 hours at a speed of 20 rotations per minute. At the second stage, the next day, another 800,000 NCSC were loaded in the scaffold cavity by polymerizing of fibrin gel, which was made from the blood of rats. We used model of rat peripheral nerve gap restoration as a model of peripheral nerve injury.

Surgical interventions were performed under general anesthesia (intraperitoneal administration of a mixture of solutions of xylazine hydrochloride 15 mg/kg body weight and ketamine hydrochloride 70 mg/kg body weight. The animal was fixed on the operating table. Following the rules of asepsis and antiseptics, after processing the operating field, a linear cut of the skin was performed on the lateral surface of the thigh in the projection of the left side of the sciatic nerve (SN). With the help of the surgical instruments, left SN was exposed and mobilized. At a distance ($20 \pm 1,5$) mm from the exit point of the SN from the pelvis, nerve was cut with a blade and a gap 10 ± 2 mm length was performed. In animals of group 1, the gap was rotated to 180° and fixed to the nerve ends by an epineural sutures with an atraumatic needle with a monofilament polyamide 10/0 using an operating microscope (under magnification $\times 12$).

In group 2 animals, SN gap restoration were performed using a collagen tube filled with fibrin gel by means of epineural fixation. In group 3 animals, nerve gap restoration was performed in a similar manner, however, the collagen tube was seeded by allogeneic NCSC in amount of 1×10^6 cells. In animals of group 4 after the mobilization of SN nerve transection was not performed. After the hemostasis in all groups of animals, the postoperative wound closure was carried out using an atraumatic needle with a 4,0 monofilament polyamide.

In order to prevent infectious complications, solution of benzilpenicilin 1 million U/kg body weight was subcutaneously injected in the posterior cervical region. For the purpose of anti-inflammatory therapy solution of dexamethasone at a dose of 6 mg/kg body weight was injected intraperitoneally. After surgical intervention, control and experimental animals received the same nutrition ad

libidum, according to the rules of vivarium. All restorative microsurgical interventions are performed immediately after injury in the peripheral nerve gap area.

We performed functional ("Walking track test" with sciatic functional index (SFI) evaluation), electrophysiological (EMG), immunohistochemical, histological and statistical evaluations.

Sciatic functional index (SFI) was calculated in all groups of animals for 8 weeks weekly. EMG was performed in all experimental animals on 4 and 8 weeks after surgery. 4 weeks after the operation, 7 animals from group 1 (autograft), 7 animals from group 2 (implantation of TES without NCSC) and 8 animals from group 3 (implantation of TES containing NCSC) were withdrawal from experiment 8 weeks after the operation, 7 animals of group 1, 8 animals of group 2 and 8 animals of group 3 were withdrawn from the experiment. The withdrawal of animals from the experiment occurred after direct stimulating EMG. For histological and immunohistochemical evaluations were used: in group 1, the site of an autograft with a length of 10 mm and the areas of the nerve proximal and distal to microsurgical sutures (3 mm in length). In animals of 2 and 3 groups: a TES (10 mm in length) and the nerve area proximal and distal to the microsurgical sutures (3 mm in length).

For light microscopy, the samples were fixed overnight in a 10% neutral formalin solution, washed, dehydrated in a series of alcohols, enclosed them with paraffin and performed sections of 10 μ m in thickness on a microtome. The sections were then deparaffinized in xylol and impregnated with nitrous oxide silver according to the Bilshovsky method. The deparaffined and washed in distilled water sections were also stained in a solution of luxole strong blue for 2 hours at a temperature of + 56-60 ° C. The sections were washed in 96% and 70% of alcohols and distilled water. Differentiated painted slices in a 0,1% solution of sodium tetraborate, controlling the process under a microscope. After the differentiation of sections, they were rinsed in 5% acetic acid solution. The sections were then dyed with krezol violet strong, 5 minutes, washed in distilled

water and dewatered in 96% alcohol, clarified in xylene and covered with a medium for fixation.

Microscopy was performed on an Axio Observer A1 microscope equipped with AxioCam ERc 5s digital camera and ZEN 2012 software. Statistical processing of digital data was carried out using the STATISTICA 10.0 software package on a personal computer. The reliability of the difference between right and left hindlimbs within each group was evaluated by Wilcoxon Matched Pairs Test, homolateral limbs within each group at different observation periods, and between different groups at the same observation time using the Mann-Whitney U-test. In all cases, assumptions regarding the statistical significance of the result were considered correct if the probability of zero hypothesis was less than 0,05 ($p < 0,05$). According to the functional test in groups 1 and 3, we observed the biphasic dynamics of SFI. The first phase included practically linear growth of the SFI from — 70 per 1 week of observation to — 35 at the end of the 4 weeks of observation. In group 1 statistically significant weekly increase of the SFI was registered within 2–5 weeks ($p < 0,03$), in group 3 — within 2–4 weeks. The second phase lasted for 6–7 and 5–7 weeks in groups 1 and 3, respectively, and was characterized by absent of changes in the SFI. The third phase was observed during 8 weeks: an increase in the 3 group during this period was statistically significant ($p = 0,01$).

Typically for the 2 group was the absence of a phase of SFI improvement during the 2 weeks of observation. Subsequently, within 3–4 weeks, a significant SFI improvement ($p < 0,01$), stabilization (within 5–6 weeks), an increase of SFI during 7 weeks ($p = 0,036$), compared with the value as of the 5th week of observation. Consequently, as in groups 1 and 3, in the case of implantation TES without NCSC (group 2), the growth of SFI is two-stage, its duration, as well as the length of the intermediate phase of the plateau is shortened, the effectiveness is less. The obtained data indicate that the lower result of the recovery process in this group is due to the lack of positive dynamics during the 2 weeks of observation.

During the entire period of observation between SFI values for groups 1 and 3, no probable differences were detected ($p>0,05$). Statistically significant differences ($p<0,05$) between groups 1 and 2, as well as groups 2 and 3 in favor of groups 1 and 3, respectively, were detected from the 14 day until the end of the experiment. The worse results of functional recovery in group 2 indicate the stimulatory effect of NCSC on the regeneration of the peripheral nerve and muscle-joint apparatus in the experiment. According to EMG, the compound muscle action potential (CMAP) and latency potential (LP) in group 3 are as close as possible to those in group 1. The electrophysiological parameters in group 2 were worse. At the end of the 4 weeks of observation in the group 1, CMAP of experimental limb (EL) was statistically significant ($p=0,018$) less than in intact limb (IL) — respectively ($3,3\pm0,5$) and ($16,5\pm2,3$) mV and amounted to 27,9% of the normal. In groups 2 and 3 statistically significant ($p=0,018$) predominance CMAP IL was noted: in group 2 — ($16,5\pm2,3$) and ($0,9\pm0,2$) mV; in the group 3 — ($14,7\pm2,2$) and ($2,3\pm0,2$) mV; $p=0,018$), which was 14,2% and 18,3% of the normal. At the end of the 8 week of observation in the group, 1 CMAP in EL was statistically significant ($p=0,017$) less than the IL — respectively ($4,1\pm0,7$) and ($20,3\pm3,0$) mV and amounted to 34,3% of the normal. In groups 2 and 3 statistically significant predominance of CMAP IL was noted: in group 2 — ($14,8\pm1,8$) and ($1,4\pm0,3$) mV ($p=0,001$); in the group 3 — ($14,8\pm1,8$) and ($2,9\pm0,4$) mV ($p=0,018$), which was 19,7% and 24,9% of the normal. As of the 8 week of observation, the reliable advantage of the value of CMAP in animals of group 1 ($4,1\pm0,7$ mv) was noted only above the group 2 ($1,4\pm0,3$ mv; $p=0,007$). The reliable difference is observed between the values of group 2 and 3 ($2,9\pm0,4$; $p=0,018$) in favor of the latter. The value of CMAP in groups 1, 2 and 3 were reliably passed the value of group 4 ($22,4\pm2,2$ mv; $p=0,006$, $p=0,004$, $p=0,004$, respectively). There was no difference of intact limbs SFI. LP of EL in group 2 ($4,09\pm1,97$ ms) was reliably given the value of group 1 ($1,26\pm0,16$ ms; $p=0,009$), group 3 ($1,86\pm0,26$ ms; $p=0,002$) and group 4 ($1,22\pm0,6$ ms; $p=0,002$). The difference between the LP in 1 and 3 groups, 2 and 3 groups statistically reliable in favor of

group 1 and 3 respectively ($p=0,002$; $p=0,004$). At the end of the 8 week of observations the LP of EL in group 2 ($2,5\pm0,6$ ms) differed from group 1 ($1,1\pm0,2$ ms; $p=0,012$). Statistically significant difference also showed when comparing the LP in groups 2 and 4 (in favor of a group of 2 — $2,5\pm0,6$ ms, $p=0,045$).

After 4 weeks in the TES containing NCSC, there was an expression of the factor p75, in contrast to 8 weeks, which suggests the differentiation of NCSC to the mature Schwann cells to the end of this period. The expression β -III-tubulin, S100b and MBP on 4 and 8 weeks, talks about the germination of nervous fibers and their myelination. Histoarchitectonics of TES for the thickness of neurofibrils ($0,0043\pm0,002$ mm for 4 weeks and $0,007\pm0,0001$ mm for 8 weeks) and axon density ($3338,6\pm302,7$ at 1 mm^2 for 4 weeks and $3140,66\pm357$ to 1 mm^2 for 8 weeks) statistically not differs from the nerve's area, restored by autografting (thickness of neurofibrils $0,029\pm0,0004$ mm for 4 weeks and $0,006\pm0,0004$ for 8 weeks, axon density $3566,8\pm598$ at 1 mm^2 for 4 weeks and $3389\pm387,9$ at 1 mm^2 for 8 weeks, $p\leq0,05$).

Clinical introduction of TES containing NCSC for large peripheral nerves gaps restoration will help to improve the treatment results of patients with peripheral nerves injuries and their consequences.

Key words: injury, peripheral nerve, stem cells, neural crest phenotype, tissue engineering, experiment.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Цимбалюк ВІ, Молотковець ВЮ, Медведєв ВВ, Лузан БМ, Петрів ТІ. Ефективність зварного з'єднання ушкодженого периферичного нерва щура за даними оцінки функціонального індексу сідничного нерва. Український неврологічний журнал. 2017; 2: 63-8.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, розробці дизайну дослідження, модифікації пристрою для проведення функціонального тесту, участь у проведенні функціонального тесту та аналізі отриманих цифрових даних, написанні основного тексту статті)

2. Tsymbaliuk VI, Petriv TI, Molotkovets VY, Vasyliiev RG, Tatarchuk MM, Burkush II. Development of walking track device for functional recovery analysis after experimental sciatic nerve injury. Світ медицини та біології. 2017; 3: 157-160.

(Особистий внесок здобувача полягає у розробці дизайну дослідження, виконанні оперативних втручань, самостійному проведенні функціонального тесту та аналізі отриманих цифрових даних, написанні основного тексту та підготовці статті до друку).

3. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ, Васильєв Р.Г. Ефективність пластики дефекту периферичного нерва з використанням тканинно-інженерних провідників різних типів за даними електронеуроміографії: експериментальне дослідження. Український нейрохірургічний журнал. 2017; 4: 60-6.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, розробці дизайну дослідження, проведенні оперативних втручань, участі у проведенні електронеуроміографічного дослідження та аналізі отриманих цифрових даних, узагальненні результатів, написанні основного тексту та підготовці статті до друку).

4. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Васильєв РГ, Медведєв ВВ, Молотковець ВЮ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ. Відновлення функції сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину в експерименті. Міжнародний неврологічний журнал. 2018; 1 (95): 12-18.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, визначенні функціонального індексу сідничного нерва, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку)

5. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ЮВ, Кліменко ПП, Васильєв РГ, Татарчук ММ. Ранні результати відновлення морфологічної структури сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину в експерименті. Травма. 2018; 2 (19): 5-12.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, участі у проведенні морфологічних методів досліджень узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку)

6. Цимбалюк ВІ, Молотковець ВЮ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Лузан БМ, винахідники; Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця, патентовласник. Спосіб визначення функціонального індексу сідничного нерва у щурів. Патент України №118156, МПК: G09B 23/28. Заявка № u201701183; 2017 лип 25.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту)

7. Цимбалюк ВІ, Молотковець ВЮ., Петрів ТІ., Медведєв ВВ, Лузан БМ. винахідники; Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця, патентовласник. Пристрій для проведення тесту “ходьби по доріжці”. Патент України №118157, МПК: G09B 23/28. Заявка № u201701184; 2017 лип 25.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту)

8. Цимбалюк ВІ, Лісяний МІ, Петрів ТІ. Оцінка регенерації сідничного нерва під впливом адгезивної фракції жирової тканини функціональним методом у експерименті. В матеріали науково-практичної конференції “Інновації у нейрохірургії” в рамках IV Міжнародного медичного конгресу “Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров’я України” Тези доповідей; 2015 квіт 16; Київ. Київ: Задруга; 2015. С. 7.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, виконанні експерименту, узагальненні результатів, підготовці тез до друку)

9. Цимбалюк ВІ, Лісяний МІ, Петрів ТІ, Молотковець ВЮ, Станецька ДМ, Козакевич РБ, Камінський АА. Оптимізація методики проведення тесту Walking track для вивчення функціонального відновлення сідничного нерва у експерименті. В: Матеріали конференції «Нові тенденції в нейрохірургії» з лекційним курсом ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» в рамках 24-ї міжнародної виставки «Охорона здоров’я». Тези доповідей; 2015 вер 30; Київ. Київ: Українська Асоціація Нейрохірургів; 2015. С. 29.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, виконанні експерименту, узагальненні результатів, підготовці тез до друку)

10. Kozakevych RB, Petriv TI, Medvediev VV, Rybachuk OA, Vasyliiev RG, Zienkiewicz-Strzalka M. Development of chitosan/gelatin-based scaffolds for nerve tissue engineering. In: Materials of the Neurology and rehabilitation international symposium "Peripheral nerve reconstruction after severe injures"; 2016 may 19-21; Kyiv. Kyiv: National Bogomoletz Medical University; 2016. С. 19-20.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, узагальненні результатів, написанні та підготовці тез до друку)

11. Kozakevych RB, Bolbukh YuM, Tertykh VA, Petriv TI, Medvediev VV, Rybachuk OA, et al. Development of chitosan/carbon nanotubes composites for neural tissue engineering. In: Proceedings of Ukrainian conference with

international participation "Chemistry, Physics and Technology of Surface", Workshop "Nanostructured biocompatible / bioactive materials"; 2016 may 17-18; Kyiv. Kyiv: Chuiko Institute of Surface Chemistry of NAS Ukraine; 2016. P. 172.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, узагальненні результатів, підготовці тез до друку)

12. Petriv TI, Vasyliiev RG, Kozakevych RB, Tsymbaliuk VI. Cytocompatibility of neural crest-derived multipotent stem cells and chitosan-based matrices for peripheral nerve tissue engineering. In: Ukrainian Neurosurgery Conference "Traumatic injuries of the central and peripheral nervous system"; 2016 sep 15-16; Kamianets-Podilskyi, Ukraine. Kyiv: Ukrainian Neurosurgical Assosiation; 2016. P.87.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, узагальненні результатів, підготовці тез до друку)

13. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Васильєв РГ, Медведєв ВВ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ. Вплив мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на регенерацію периферичного нерва при його травматичному ушкодженні в експерименті за даними ЕНМГ. В: Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю "Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині"; 2017 лист 9-10; Київ. Київ: НАМН України, ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України"; 2017. Клітинна та органна трансплантологія, 2017; 5(2), С. 244.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, виконанні експерименту, узагальненні результатів, підготовці тез до друку)

ЗМІСТ

Стор.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	21
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ДЛЯ ВІДНОВЛЕННЯ УШКОДЖЕНИХ ПЕРИФЕРИЧНИХ НЕРВІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	28
1.1. Сучасні уявлення про процеси регенерації периферичних нервів	30
1.2. Принципи хірургічної тактики при ушкодженнях периферичних нервів	32
1.3. Використання синтетичних матриксів для відновлення ушкоджених периферичних нервів	36
1.4. Принципи тканинної інженерії для відновлення периферичних нервів	36
1.5. Джерела і види стовбурових клітин для відновлення периферичних нервів	36
1.6. Перспективи використання стовбурових клітин нервового гребеня для регенерації периферичних нервів	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	49
2.1. Методика культивування стовбурових клітин нервового гребеня	49
2.2. Методика виготовлення тканинно-інженерного матрикса на основі стовбурових клітин нервового гребеня та колагенової трубки	50
2.3. Методика проведення хірургічного втручання	52
2.4. Методика проведення функціонального тесту відновлення сідничного нерва	56
2.5. Методика проведення електрофізіологічного дослідження	57
2.6. Методика проведення морфологічного та імуногістохімічного досліджень	60

2.6.1. Виготовлення гістологічних препаратів	60
2.6.2. Мікроскопічні методи дослідження	61
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВІДНОВЛЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА ПІД ВПЛИВОМ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ ЗА ДАНИМИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ТЕСТУ	62
РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ВІДНОВЛЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА ПІД ВПЛИВОМ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ ЗА ДАНИМИ ЕЛЕКТОНЕЙРОМІОГРАФІЇ	74
РОЗДІЛ 5. РЕЗУЛЬТАТИ ВІДНОВЛЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА ПІД ВПЛИВОМ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ ЗА ДАНИМИ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО МЕТОДУ ДОСЛІДЖЕННЯ	90
РОЗДІЛ 6. РЕЗУЛЬТАТИ ВІДНОВЛЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА ПІД ВПЛИВОМ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ ЗА ДАНИМИ ГІСТОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	98
6.1. Результати гістологічного дослідження тканинно-інженерних матриксів із вмістом стовбурових клітин нервового гребеня методом імпрегнації азотнокислим сріблом	98
6.2. Результати гістологічного дослідження тканинно-інженерних матриксів із вмістом стовбурових клітин нервового гребеня методом забарвлення люксолевим синім	106
ЗАКЛЮЧЕННЯ	109
ВИСНОВКИ	114
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	115
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	116
ДОДАТОК А	137
ДОДАТОК Б	141
ДОДАТОК В	143

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Амв	—	амплітуда М-відповіді
АНП	—	аутонейропластика
ЕНМГ	—	електронейроміографія
ЕСК	—	ембріональні стовбурові клітини
ЛПмв	—	латентний період М-відповіді
МСК	—	мезенхімальні стовбурові клітини
МСКЖТ	—	мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини
МСК-КМ	—	мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку
НГ	—	нервовий гребінь
ПН	—	периферичний нерв
СКНГ	—	стовбурові клітини нервового гребеня
СН	—	сідничний нерв
BDNF	—	фактор росту, що продукується мозком (brain derived neurotrophic factor)
CNTF	—	циліарний нейротрофічний фактор (ciliary neurotrophic factor)
FGF	—	фактор росту фібробластів (fibroblast growth factor)
GDNF	—	фактор росту, що продукується гліоцитами (glial derived neurotrophic factor)
GFAP	—	кислий гліальний протеїн фібрил (glial fibrillary acid protein)
GFP	—	білок зеленої флюоресценції
ITS	—	проміжна ширина стопи (intermediate toe spread)
NGF	—	фактор росту нерва (nerve growth factor)
PL	—	довжина відбитку стопи (print length)
SFI	—	функціональний індекс сідничного нерва (sciatic functional index)
TS	—	ширина стопи (toe spread)
VEGF	—	фактор росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor)

ВСТУП

Актуальність теми. Травми опорно-рухового апарату, що супроводжуються ушкодженням периферичних нервів, можуть приводити до часткової чи повної втрати функції кінцівок. Кількість таких пацієнтів з кожним роком зростає у зв'язку зі збільшенням кількості техногенних травм та складних поєднаних ушкоджень опорно-рухового апарату [1, 2]. Основними причинами ушкодження периферичних нервів є транспортний та побутовий травматизм, а також вогнепальні поранення. У 26,5% всіх відкритих травм кінцівок є поєднане ушкодження нервів, кісток, судин та сухожилків, що значно утруднює лікування пацієнтів та приводить до інвалідності та зниження якості їх життя. Ушкодження периферичних нервів відзначають у 77% спостережень — при травмі верхньої кінцівки, у 23% — нижньої [3].

В Україні кожного року травму периферичних нервів отримують 2,5–3 тис. потерпілих, з них у 60–75% встановлюють інвалідність [4]. У структурі травм опорно-рухового апарату ушкодження периферичних нервів становить від 1,5 до 6%, з них 90% — верхньої кінцівки. Під час військових дій цей показник складає 12%, і спостерігається у 2,8–5% пацієнтів із політравмою середній вік таких пацієнтів складає 18–44 роки, що вказує на значну соціально-економічну значущість проблеми [4 - 6]. Незважаючи на бурхливий розвиток мікрохірургічних технологій, операції з приводу ушкоджень периферичних нервів, які є в арсеналі нейрохірургів на сьогоднішній день (невроліз, аутонейропластика, невротизація), досягнути бажаних результатів відновлення периферичних нервів, особливо за умов дефектів великого розміру, не вдається [7]. Саме тому триває пошук методів відновлення периферичних нервів при дефектах великого розміру за допомогою біополімерів та стовбурових клітин, факторів росту.

Стовбурові клітини нервового гребеня дають початок нейронам та глії чутливих вузлів, гангліям вегетативної нервової системи, шванівським клітинам периферичних нервів [8]. Тому використання стовбурових клітин

нервового гребеня у відновному лікуванні ушкоджених периферичних нервів є раціональним [9, 10].

Оптимальними для клінічного застосування є стовбурові клітини, які можна виділити у постнатальному періоді життя з мінімальною інвазивністю і застосувати аутологічно [8-10].

Існування стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня(СКНГ), які присутні у постнатальному періоді життя, встановлено відносно недавно [11].

Одним із доступних джерел СКНГ є волосяний фолікул. Він складається із концентрично розташованих циліндрів, структур що містять клітини, які продукують високоспеціалізовані протеїни. СКНГ розташовані у валику бруньки волосяного фолікула у точці прикріплення м'язу, що піднімає волосину. Група вчених під керівництвом M. Sieber-Blum у 2004 році довели, що стовбурові клітини, які знаходяться у валику бруньки волосяного фолікула, мають фенотип СКНГ [9, 11].

Дослідження *in vitro* морфофункціональних властивостей показали, що СКНГ мають високий проліферативний потенціал, експресують антигени, характерні для клітин нервового гребеня (Sox10, p75/CD271), нейральних стовбурових клітин (Sox2 та nestin), мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин (CD44, CD73, CD90 та інші) [8 - 11].

Виділені із волосяних фолікулів гризунів та людини СКНГ, залежно від умов культивування експресували β -III-тубулін, протеїн S100 β , основний білок мієліну (myelin basic protein, MBP), гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP), що дозволяло зробити припущення про їх нейральний чи гліальний фенотип [9, 10].

Таким чином, дослідження впливу СКНГ на регенерацію периферичного нерва є актуальним, особливо за умов його дефекту великого розміру, і має як фундаментальне, так і прикладне значення з перспективою подальшого можливого клінічного застосування.

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідної роботи ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» «Дослідити ефективність інноваційних методів відновлення функції спинного мозку та периферичних нервів з використанням тканинної нейроінженерії та електрохірургічних технологій в експерименті», № держреєстрації 0117U004270 (2017–2019 рр.).

Мета дослідження — оцінка впливу стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня на регенерацію периферичного нерва за умов його травматичного ураження в експерименті.

Завдання дослідження:

1. Визначити вплив імплантації тканинно-інженерного матрикса із вмістом стовбурових клітин з фенотипом нервового гребеня, за умов подолання дефекту периферичного нерва великого розміру, на відновлення нервово-м'язового апарату.

2. Прослідкувати динаміку функціональної активності стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня у тканинно-інженерному матриксі за умов подолання дефекту периферичного нерва великого розміру.

3. Визначити здатність стовбурових клітин з фенотипом нервового гребеня, імплантованих у складі тканинно-інженерного матрикса, брати участь у процесах мієлінізації нервових волокон.

4. Дослідити здатність стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня набувати ознак “шванівського” фенотипу в складі імплантованого тканинно-інженерного матрикса при подоланні дефекту периферичного нерва великого розміру.

5. Дослідити процес відновлення структури нерва, шляхом пластики його дефекту великого розміру тканинно-інженерним матриксом.

Об'єкт дослідження — травма периферичного нерва.

Предмет дослідження — регенерація периферичного нерва за умов впливу стовбурових клітин нервового гребеня в експерименті.

Методи дослідження: 1) *експериментальний* — моделювання великого дефекту сідничного нерва (СН) у щура та пластика його тканинно-інженерним матриксом із вмістом стовбурових клітин нервового гребеня; 2) *функціональний* — визначення ступеня функціонального відновлення периферичного нерва з метою об'єктивізації якісної сторони регенерації периферичного нерва за допомогою «тесту з біговою доріжкою» (Walking Track Analysis) на основі показника «функціонального індексу сідничного нерва» — SFI (sciatic functional index); 3) *культуральний* — виділення, культивування, встановлення життєздатності, імунофенотипування стовбурових клітин нервового гребеня *in vitro*; 4) *електрофізіологічний* — (стимуляційна комп'ютерна електронейроміографія (ЕНМГ)) з метою об'єктивної оцінки кількісної сторони регенерації периферичного нерва — опосередковане відображення кількості аксонів, що регенерували за електрофізіологічними показниками; 5) *морфологічний* — світлова, фазово-контрастна, флуоресцентна мікроскопія; 6) *статистичний* — визначення статистично значущих відмінностей між групами.

Наукова новизна отриманих результатів. Розширено наукові уявлення щодо впливу СКНГ на регенерацію периферичного нерва за даними функціональних та електрофізіологічних методів дослідження.

Показано, що СКНГ можуть зберігати функціональну активність у тканинно-інженерному матриксі на основі експресії фактора p75 та білка зеленої флуоресценції, набувати фенотипу шванівських клітин на основі експресії білка S100 і β -3-тубуліну.

Стовбурові клітини (похідні) нервового гребеня, імплантовані у складі тканинно-інженерного матрикса забезпечують максимальне відновлення структурно-функціональних стромально-мезенхімальних співвідношень та прискорення мієлінізації відновлених нервових волокон, про що свідчить експресія основного білка мієліну у тканинно-інженерних матриксах.

Практичне значення отриманих результатів. Експериментально обґрунтовано тканинно-інженерний підхід до подолання дефектів

периферичних нервів великого розміру з використанням стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня, що є підґрунтям для його подальшого можливого впровадження в клінічну практику.

Запропоновано пристрій для проведення тесту “ходьби по доріжці” який впроваджений у роботу лабораторії експериментальної нейрохірургії ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» (патент України на корисну модель №118157 від 25.07.2017 р.).

Оптимізована методика отримання відбитків стоп щурів для розрахунку функціонального індексу СН пропонується для відслідковування динаміки функціонального відновлення СН у експерименті (патент України на корисну модель №118156 від 25.07.2017 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є особистим науковим дослідженням автора. Спільно з науковим керівником роботи д-р.мед.наук, професором, член-кореспондентом НАН України, академіком НАМН України Цимбалюком В.І. визначено мету, завдання роботи, проаналізовано результати дослідження. Автором самостійно проведено аналіз літератури, виконано патентний пошук, модифіковано пристрій для визначення функціонального індексу СН, проведені експериментальні дослідження: пластику дефектів периферичних нервів великого розміру тканинно-інженерними матриксами, операцію аутонейропластики. Здобувач брав безпосередню участь у створенні тканинно-інженерних матриксів, обробці матеріалу при проведенні патоморфологічних, культуральних, електронеуроміографічних досліджень, аналізі та статистичному опрацюванні цифрового матеріалу, самостійно проводив функціональний “тест з біговою доріжкою”. Дисертантом проаналізовано та узагальнено результати, сформульовано висновки, обґрунтовані теоретичні та практичні положення роботи. Усі розділи дисертації написано та оформлено автором особисто.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення дисертації і результати досліджень доповідались та обговорювались на:

науково-практичній конференції «Інновації у нейрохірургії» в рамках IV Міжнародному медичному конгресі «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України» (Київ, 2015); конференції «Нові тенденції в нейрохірургії» (Київ, 2015); Neurology and Rehabilitation international symposium «Peripheral nerve reconstruction after severe injuries» (Kiev, 2016); Proceedings of Ukrainian conference with international participation «Chemistry, Physics and Technology of Surface», Workshop "Nanostructured biocompatible / bioactive materials" (Kiev, 2016); Ukrainian Neurosurgery Conference «Traumatic injuries of the central and peripheral nervous system» (Kamianets-Podilskyi, 2016); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» (Київ, 2017).

Апробація дисертаційної роботи відбулась на сумісному засіданні вченої ради ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», кафедри нейрохірургії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України та кафедри нейрохірургії НМАПО ім. П.Л. Шупика МОЗ України від 15 червня 2018 р., протокол № 15/2.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 13 наукових друкованих праць, з яких 5 статей у фахових періодичних виданнях, рекомендованих МОН України та цитуються у міжнародних наукометричних базах, 6 тез доповідей на конгресах, з'їздах, конференціях, отримано 2 патенти України на корисну модель.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, 5 розділів власних досліджень, заключення, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, додатку. Робота викладена на 146 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 56 рисунками, містить 13 таблиць. Список використаних літературних джерел містить 155 посилань, з них 18 — кирилицею, 137 — латиницею.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ДЛЯ ВІДНОВЛЕННЯ УШКОДЖЕНИХ ПЕРИФЕРИЧНИХ НЕРВІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Сучасні уявлення про процеси регенерації периферичних нервів

Якщо травмуючий фактор спричиняє повне порушення цілісності ПН, це закономірно викликає процес, який відомий під назвою валлерівська дегенерація. Це явище описане у 1850 р. фізіологом Augustus Waller і було назване на його честь [8].

Стадійний розвиток морфологічних змін ПН після такої травми залежить від типу нервового волокна та дистанції від місця пошкодження [9].

Згідно досліджень J.V.Griffin та співавторів у експерименті латентний час перед початком валлерівської дегенерації для тонких мієлінізованих волокон складав 25 годин, а для товстих 45 годин. Швидкість прогресування процесу в дистальному напрямку складав для тонких мієлінізованих волокон 250 мм в день, а для товстих 46 мм в день [10].

Відразу після пошкодження аксонів відбувається розпад мієлінової оболонки, і окремі фрагменти її набувають форми овоїдів [8, 11]. Спершу такі фрагменти з'являються у перехопленнях Ранв'є, а в подальшому захоплюють всю мієлінову оболонку. Частина нейронів піддається апоптозу у відповідь на пошкодження їхніх аксонів на периферії і кількість регенеруючих аксонів стає меншою. Тіла нейронів набрякають, що пов'язано із підвищеними метаболічними потребами внаслідок активації репаративних процесів [9]. Подальший розпад мієлінової оболонки відбувається за участю шванівських клітин, які можуть змінювати свій фенотип відповідно до потреб мікрооточення: мієлінізувати нервові волокна чи викликати хемотаксис

макрофагів у вогнище пошкодження та стимулювати фагоцитоз, що має у таких випадках санаційні властивості. Під час фагоцитозу залишків мієлінової оболонки факрофаги виділяють значну кількість цитокінів та нейроактивних факторів для того, щоб підготувати субстрат для запуску репарації аксонів [8, 9].

Поряд із санаційними процесами запускаються регенеративні процеси, які включають проліферацію шванівських клітин. Перші їх мітози можна виявити вже через 2–4 дні після травми, і в-залежності від типу нервових волокон їх кількість може збільшуватися у 8 разів. Цей процес досягає максимуму через 20–30 днів. Шванівські клітини утворюють повздовжньо орієнтовані колонії клітин які називаються “стрічки Бюнгнера” [9, 11, 12]. Змінюється також стан і сполучнотканинних оболонок нерва. Ендоневрій спочатку набрякає, а після перериву аксона і розпаду мієлінової оболонки знову зморщується. За відсутності можливості направленого росту аксонів збільшується вміст колагену в регенеруючому нерві, прогресує атрофія шванівських клітин та “стрічок Бюнгнера”. Одночасно із процесами дегенерації, які мають дистальну спрямованість по відношенню до місця травми, відбувається і ретроградна дегенерація, у напрямку до тіла нейрона [8, 9, 12].

Після процесу ретроградної дегенерації, регенерація нервових волокон починається із аксонів проксимального відрізка, де протягом кількох днів утворюється потовщення, яке називається “колбою росту” із якого виростає кілька колатеральних відростків аксона. Ключовим є питання досягнення “стрічками Бюнгнера” дистального відрізка, які є направляючими для росту аксонів. Чим ближче до тіла нейрона відбулася травма, тим швидкість регенерації аксонів вища, і вона значно сповільнюється при збільшенні дистанції від місця пошкодження до тіла нейрона [13, 14].

Надзвичайно важливим чинником є те, що навіть після ретроградної дегенерації аксонів велика частина нейронів не дегенерують, і більшість із них залишаються збереженими. Вагому роль у цьому процесі відіграють численні нейротрофічні фактори, що поділяються на 3 групи: нейротрофіни

(NGF, BDNF, NT3, NT4), нейротрофічні фактори, що продукуються гліальними клітинами (GDNF) та нейротрофічні цитокіни або нейрокини (CNTF) [15]. Серед них фактор росту нерва (NGF) на сьогоднішній день є найбільш вивченим і сприяє проліферації та диференціації нейронів [16].

Нейротрофічний фактор, який продукується мозком (BDNF) відіграє важливу роль у індукції відповіді тіла нейрона на пошкодження його аксона і впливає на процеси збільшення діаметру нервових волокон. При додаванні BDNF до культури стовбурових клітин, вони починають диференціюватися по нейральній лінії [17]. Тромбоцитарний фактор росту (PDGF) при синергічній дії з нейротрофінами (NT-3, NT-4/5) сприяє виживанню та диференціюванню шваннівських клітин [18], інсуліноподібний фактор росту (IGF-1) сприяє регенерації моторних та сенсорних нейронів, стимулює спраутинг аксонів при високій його концентрації у денервованому м'язі [19]. Крім того, доведена важлива роль у виживанні та диференціюванні нейронів циліарного нейротрофічного фактора (CNTF), який належить до нейротрофічних цитокінів або нейрокинів [20, 21].

Фактор росту, що продукується гліальними клітинами (GDNF) сприяє відновленню переважно моторних нейронів. Підвищення його концентрації спостерігали у експериментальних тварин з моторними невропатіями. Також, на моделі перетину СН у щура та пластики його трубчатим протезом із додаванням ламініну та GDNF, виявлено позитивний ефект на ріст аксонів та ступінь їх мієлінізації через 6 тижнів від початку експерименту [22].

Для повноцінної регенерації нерва, необхідне адекватне кровопостачання, що забезпечується паралельною васкуляризацією регенеруючого нерва. Фактор росту ендотелію судин (VEGF) стимулює проростання капілярів, завдяки чому прискорюється регенерація аксонів та міграція шваннівських клітин. В умовах гіпоксії VEGF діє як нейропротективний агент [23, 24].

1.2. Принципи хірургічної тактики при ушкодженнях периферичних нервів

На сьогоднішній день для відновлення цілісності і провідності ПН при їх травматичному ушкодженні використовуються різноманітні методики: шов нерва кінець-у-кінець, аутонейропластика (АНП), невротизація, шов нерва кінець-у-бік, використовуються спеціально оброблені алотрансплантати та штучні матрикси [25].

Шов ушкодженого нерва кінець-у-кінець є методом вибору при відсутності дефекту ПН великого розміру. Для оптимального протікання процесів регенерації в ушкодженому нерві, його проксимальний та дистальний кінці повинні бути зближені без натягу і зшиті за допомогою мікрохірургічної техніки без їх додаткової травматизації.

На думку S.J. Velkas та співавторів, цей метод оперативного втручання може принести позитивний результат, коли діастаз між кінцями нерва, що зшиваються є не більшим ніж 5 мм. Якщо ж діастаз більший 5 мм, а кінці нерва все-таки можна зблизити і зшити, то натяг нерва, який виникає при цьому, буде суттєво погіршувати процеси регенерації [26].

АНП застосовується при дефекті нерва великого розміру. Розмір дефекту вважають великим, коли шов кінець-у-кінець та спонтанна регенерація нерва є неможливою. На думку більшості авторів, це розмір дефекту нерва 3 см і більше) [27, 28, 29].

Операцією вибору у пацієнтів з великими дефектами нервів протягом близько 50-ти останніх років залишається “золотий стандарт” — аутонейропластика [30, 31]. Вперше АНП в експерименті на собаках виконали J.Philipeaux та A.Vulpian у 1870 році. У клініці першу операцію АНП виконав E.Albert у 1876 році, проте вона виявилась невдалою. Спочатку нейрохірурги використовували цілі нервові стовбури, що погано реваскуляризувалися і приживалися. У 1947 році S.Seddon використав для АНП кілька “вставок” із нерва, меншого діаметру, що приживалися краще.

H.Millesi першим почав застосовувати принципи мікрохірургії при АНП і показав, що при використанні такої методики, можна отримати кращий результат, ніж при епіневральному шві “кінець-у-кінець” під натягом [32].

Проте АНП має ряд недоліків. Для отримання аутоотрансплантата використовують в-основному чутливі нерви і найпоширенішим в якості донора є *p.suralis*. Використання чутливих нервів у якості аутоотрансплантата для пластики дефектів рухових нервів спричиняє морфологічну невідповідність природнього мікрооточення, діаметру аксонів, що затримує проліферацію шванівських клітин та їх здатність мієлінізувати нервові волокна [29, 30, 33].

Крім цього небажаними є додаткова операція (для забору трансплантата), функціональний дефіцит у автономній зоні нерва донора, утворення двох зон нейрорафії, виникнення невром та рубців, що утруднює проростання аксонів [34].

1.3. Використання синтетичних матриксів для відновлення ушкоджених периферичних нервів

Алотрансплантація — це методика, що передбачає використання в якості трансплантата нерв, забраний від іншої особи в межах одного виду, і ксенотрансплантація — пластика дефекту нервом, забраним від особи іншого виду. Ці методики не знайшли широкого застосування у клініці. Алотрансплантація та ксенотрансплантація вимагають застосування тривалої імуносупресивної терапії, є високий ризик контамінації та вторинного інфікування [35, 36]. Наступним кроком була розробка ацелюлярного трансплантата нерва, який отримували шляхом поєднання ферментативних, фізичних та хімічних методів для того, щоб виключити його імуногенність та зберегти екстрацелюлярний компонент, створюючи фактично природний матрикс для направленого росту аксонів. Недоліками такого підходу є пошкодження білків, неуклеїнових кислот, лізис клітин трансплантата під

впливом хімічних реагентів та фізичних методів впливу, що є вкрай небажаним. До того ж ферменти та хімічні реагенти повинні бути повністю еліміновані із трансплантата, щоб при його використанні не спричиняти пошкодження навколишніх тканин донора, що теж практично неможливо. Не зважаючи на це, у кількох дослідженнях була показана можливість пластики дефекту ПН завдовжки 1–2 см ацелюлярним трансплантатом у щурів [34, 37]. Також було показано, що аксони не завжди проростають з проксимального кінця нерва у дистальний без додаткового застосування факторів, що сприяють цьому, як, наприклад, хондрітиназа [38]. Результати дослідження, метою якого було порівняння результатів пластики дефекту нерва ацелюлярним аллотрансплантатом і матриксом на основі колагену у експерименті, показали, що різниця у регенерації нерва через 12 тижнів практично відсутня [23]. Оброблений хімічними детергентами та хондрітиназою ацелюлярний аллотрансплантат використовувався для пластики дефекту лицевого нерва [39] та дефекту чутливих нервів руки довжиною 3 см у клініці [40].

У кінці XIX ст. з'явилася ще одна методика оперативних втручань при дефектах ПН великого розміру. Це тубаж, суть якого полягає у тому, що кінці ушкодженого нерва з'єднуються порожнистою трубкою, матриксом, із природніх чи штучно синтезованих матеріалів, і аксони із проксимального кінця ростуть у напрямку дистального кінця [41].

Т. Gluck у 1880 році запропонував з'єднати кінці ушкодженого нерва декальцинованою кісткою. О. Bungner у 1891 році використовував для тубажу сегмент артерії. Т. Chiu наприкінці 80-х років провів серію експериментів, у яких показав ефективність пластики нерва аутовеною [32].

Багато біоматеріалів випробовувалося у експериментах [42], найбільш обнадійливі результати були досягнуті за допомогою полігліколевої кислоти (ПГК). Була показана здатність полігліколевих трубок покращувати регенерацію ПН при його критичних дефектах, як у експерименті [43], так і у клініці [44].

С. Krarup зі співавторами опублікували результати успішної пластики дефекту серединного нерва завбільшки 5 см у приматів за допомогою колагенової трубки [45]. Трохи раніше F.J. Rodriguez зі співавторами зробили висновок, що комбінована пластика з використанням шваннівських клітин, матригелю і полілактаткапролактонових трубок є достойною альтернативою традиційній АНП [46]. На сьогоднішній день розроблено кілька синтетичних порожнистих матриксів для тубажу нервів (табл. 1.3.1). Вони є альтернативою АНП у клініці, але їх застосування обмежується дефектами розміром 3 см [44].

Синтетичні порожнисті матрикси сприяють зменшенню інфільтрації зони шва міофібробластами та утворенню рубців і невром, гальмують колатеральний спраутинг, створюють сприятливе мікрооточення шляхом сприяння накопиченню нейротрофічних факторів.

Таблиця 1.3.1

Види матриксів для регенерації ПН [26]

Біоматеріал	Діаметр (d), довжина (L)	Час біодеградації
ацелюлярний алотрансплантат трунного нерва	d=1–5 мм L=1,5–7 см	невідомо
полівініл алкоголь	d=2–10 мм L=6,35 см	не біодеградує
полігліколева кислота	d=2,3–8 мм L=2–4 см	6–12 місяців
колаген І типу	d=1,5–7 мм L=2–3 см	36–48 місяців
колаген І типу	d=2–6 мм L=2,5 см	4–8 місяців
колаген І типу	d=2–6 мм L=2,5 см	4–8 місяців
підслизова оболонка тонкого кишечника свиней	d=1,5–7 мм L=4 см	невідомо
полі (лактид- капролактон)	d=1,5–10 мм L=3 см	16 місяців
колаген І типу	d=3–10 мм L=2–4 см	36–48 місяців
колаген І типу	d=4–12 мм L=2,5–5 см	4–8 місяців
полівініл алкоголь	d=2–10 мм L=6,35 см	не біодеградує

Однак, бажаного відновлення ПН у клініці неможливо досягти через відсутність у синтетичних трубках шванівських клітин, які є регуляторами направленої росту аксонів.

1.4. Принципи тканинної інженерії для відновлення периферичних нервів

Тканинна інженерія є одним із напрямків вирішення проблеми пошкодження нервової системи, як центральної, так і периферичної. Триває розробка конструкцій, що будуть захищати кінці нерва від залучення у рубець, топічно доставляти специфічні трофічні фактори, сприяти направленому росту аксонів, завдяки включенню в їх склад прорегенеративних медіаторів: медикаментів та стовбурових клітин [50].

Сучасний розвиток тканинної інженерії передбачає застосування синтетичних трубчатих протезів, якими можна з'єднати кінці ушкодженого нерва і забезпечити проростання аксонів, але інертне мікрооточення в таких ситуаціях дозволяє проводити нейропластику при невеликих дефектах (до 3 см у людей) [9, 12, 47, 48].

Наступним кроком є комбінація матриксів із природніх чи синтетичних матеріалів з потрібними фізико-хімічними властивостями та пептидів екстрацелюлярного матриксу, факторів росту, стовбурових клітин [9, 12, 50].

1.5. Джерела і види стовбурових клітин для відновлення периферичних нервів

Надзвичайно перспективним є застосування стовбурових клітин, що є джерелом нейротрофічних факторів та молекул екстрацелюлярного матриксу для регенеруючих аксонів, і в перспективі можуть прискорювати їх відновлення, а також попереджувати ретроградну дегенерацію та дегенерацію відповідних нейронів спинного мозку у відповідь на пошкодження на периферії [9, 51—53].

Критерії “ідеальних” стовбурових клітин включають швидкий та малоінвазивний спосіб їх отримання, швидке нарощування у культурі *in vitro*, здатність до виживання, проліферації та інтеграції в тканини центральної та

периферичної нервової систем реципієнта, здатність до стабільної трансфекції віральними векторами та експресії відповідних екзогенних генів [9, 54, 55].

При використанні стовбурових клітин для відновлення ушкоджених ПН, акцент робиться на збільшенні кількості та активності шванівських клітин, які є ключовою клітинною ланкою в регенерації ПН. Але важкість та трудомісткість виділення аутологічних шванівських клітин, що передбачає біопсію нерва, довгий період очищення та нарощування культури, змушує шукати альтернативні джерела стовбурових клітин. Тривала денервація приводить до апоптозу нейронів та атрофії цільових м'язів, тому використання аутологічних шванівських клітин зараз у практичному плані є не вигідним [56].

Одним із ключових факторів у використанні стовбурових клітин будь-якого походження для покращення регенерації ПН є концепція “мінімальних маніпуляцій”. За визначенням E.J. Culme-Seymour та C. Mason [57] “маніпуляції з клітинами не повинні ушкоджувати їхні біологічні властивості”. Нарощування клітин у культурі, для того, щоб збільшити їх кількість перед імплантацією, вимагає додавання різноманітних хімічних реагентів та факторів росту, що можуть змінити лінію диференціювання стовбурових клітин [58].

До сьогодні не існує єдиної думки яка ж кількість стовбурових клітин повинна бути імплантована для того, щоб отримати позитивний ефект від їх застосування. Одні дослідники використовують 4×10^3 клітин для трансплантації на одну тварину [59], інші — 2×10^7 [60]. Цікаво, що при використанні шванівських стовбурових клітин у кількості 80×10^6 на одну тварину були отримані гірші результати відновлення нерва ніж при використанні 20×10^6 клітин [9]. Тому, у даному дослідженні використовувалася кількість клітин 1×10^6 , для того щоб визначити ефект від їх застосування і при цьому забезпечити достатню кількість місця та ресурсів для контакту з природнім мікрооточенням ушкодженого нерва.

Інтенсивний поділ клітин може пошкодити їх генотип, і збільшити кількість мутацій, тому, краще використовувати клітинні культури з меншою кількістю пасажів [61, 62].

Сьогодні, всі зусилля науковців спрямовані на пошук джерела стовбурових клітин дорослого організму, які були б не менш ефективними у плані тканинної інженерії, але спосіб їх отримання був малоінвазивним, неболючим та виключав використання загальної анестезії. Стовбурові клітини дорослого організму присутні практично у всіх тканинах. Вони можуть бути отримані із строми кісткового мозку, жирової тканини, пульпи зуба, м'яза, пуповинної крові, Вартонових драглів, піднебіння, волосяного фолікула, як у експериментальних тварин так і у людей [9, 64—66].

Стовбурові клітини можна імплантувати у недиференційованому стані або після процесу предиференціювання у стовбурові клітини з фенотипом, подібним до шванівських. Останні мають здатність інтегруватися у стрічки Бюнгнера і стимулювати направлений ріст аксонів. Потенційні переваги такого предиференціювання полягає у кращій здатності таких клітин до виживання у новому середовищі після імплантації, посиленні секреції нейротрофічних факторів та мієлінізації аксонів [67, 68].

Проте, позитивний вплив недиференційованих стовбурових клітин також виявлений у дослідженнях [9, 69—73]. Прихильники такого виду клітин вважають, що пре диференціювання *in vitro* затримує імплантацію, що у свою чергу відтерміновує процеси регенерації тканин, що вкрай небажано у клінічному застосуванні [74, 75].

Одним із ефектів впливу на відновлення ПН є стимуляція стовбуровими клітинами нейротрофічних та ангіогенних факторів, а також молекул екстрацелюлярного матриксу. Ці ефекти можуть реалізуватися за допомогою паракринних механізмів та стимуляції ендогенних шванівських клітин до посилення власної активності. Такі молекули екстрацелюлярного матриксу як колаген I типу, колаген IV типу, фібронектин та ламінін сприяють регенерації нерва [9, 59, 68].

У багатьох роботах описано секрецію фактору росту нерва, нейротрофічного фактору, що продукується мозком, нейротрофічного фактору, що продукується гліальними клітинами, циліарного нейротрофічного фактору та нейротрофіну-3, як ендogenous шванівськими клітинами, так і стовбуровими клітинами дорослого організму різного походження [77, 78].

Імуномодуючий та помірний імуносупресивний ефект стовбурових клітин дорослого організму різного походження забезпечується ймовірно секрецією гранулоцитарного та макрофагального колонієстимулюючих факторів, інтерлейкінів 6, 7, 8 та 11 типів та фактора некрозу пухлин. Пригнічення імунної відповіді реципієнта допомагає попередити запалення та фіброз після операцій на ПН, а також, дозволяє використовувати алогенну трансплантацію, що є одним із найважливіших моментів у трансплантології та регенеративній медицині [54, 77].

Перші спроби трансплантації закладок ембріональної нервової тканини в ушкоджений нерв були зроблені ще у 80-90-х роках ХХ століття. Первиною метою цих експериментів було намагання довести принципову можливість такого виду трансплантації та дослідження подальшого диференціювання клітин ембріональної нервової тканини і їх вплив на регенерацію ушкодженого нерва [79]. Гарні результати були отримані при алогенній трансплантації ембріональної нервової тканини у експерименті, що підтверджено даними електрофізіологічного та морфологічного досліджень [80, 81].

У 1998 р. бурхливий розвиток технологій дозволив виділяти ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) із бластоцисти. Вперше ці клітини із людської бластоцисти були виділені групою вчених під керівництвом J.A.Thomson [82]. ЕСК здатні формувати тканини трьох зародкових листків, мають значно вищий потенціал проліферації у порівнянні із мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК) [83]. Проте диференціація цих клітин у нейральні лінії проблемна, а спеціальні протоколи розроблені

тільки для обмеженої кількості цих типів клітин [84]. Додаткові проблеми пов'язані з їхньою імуногенністю, туморогенністю та морально-етичними проблемами, адже забір ЕСК передбачає руйнування ембріона на стадії бластоцисти [82, 84]. Кількість робіт, що стосуються трансплантації ЕСК при ушкодженні ПН невелика, що обумовлено вищевказаними проблемами і труднощами подальшого клінічного використання.

Нейральні стовбурові клітини мають здатність диференціюватися у нейрони та клітини глії і знаходяться у субвентрикулярній зоні неокортексу і зубчатій звивині гіпокампа. Однак, їх активна проліферація відбувається під час ембріогенезу, а у дорослому організмі — тільки після ушкодження центральної нервової системи. W. Heine зі співавт. показали, що застосування нейрогенних стовбурових клітин справляє позитивний ефект не тільки при гострій травмі нерва, а і при хронічній денервації, що підтверджувалося електрофізіологічними та морфологічними методами [9, 85]. Застосування їх обмежується тому, що викорисання нейральних стовбурових клітин при різних видах травми ПН супроводжується високим ступенем утворення нейробластом [86], тому увагу дослідників привернули більш диференційовані клітини, а саме клітини нюхової цибулини [87]. Виявлено, що вони здатні продукувати речовини, які стимулюють регенерацію ПН: FGF, NGF, BDNF, GDNF, білки екстра целюлярного матриксу [88, 89]. Трансплантація цих клітин в ушкоджений ПН справляла позитивний вплив, що було підтверджено результатами електрофізіологічних та морфологічних досліджень. Коли ж проводили трансплантацію клітин нюхової цибулини сумісно зі шванівськими клітинами, результати виявилися ще кращими ніж при трансплантації цих двох видів клітин поодиночі. Такий ефект, очевидно, пов'язаний зі стимулюючим впливом клітин нюхової цибулини на шванівські клітини [90]. До того ж методом із GFP-позитивними клітинами була доведена здатність клітини нюхової цибулини мієлінізувати регенруючі аксони ПН [89].

Однак, для подальшого використання клітин нюхової цибулини в якості кандидата для клітинної терапії ушкоджень ПН потрібно більш детально вивчити їх гістобіологічні властивості, механізми дії та способи їх ідентифікації [89, 90].

МСК вперше були виявлені A.J.Fridenstein в стромі кісткового мозку у 1963 році [9]. Пізніше МСК були знайдені у багатьох тканинах організму: жировій, пульпи зуба, пуповинній крові, вартонових драглях пуповини [91—95]. Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку (МСК-КМ) позбавлені таких недоліків, як туморогенність і морально-етичні проблеми, можуть бути отримані за допомогою пункції кісткового мозку, а в спеціальних умовах культивування можуть диференціюватися у нейрони, астроцити і шванівські клітини [96, 97]. Багато дослідників показали, що використання МСК-КМ сумісно з матриксами для тубажу нерва чи ацелюлярними нервами дає кращі результати ніж використання самих порожнистих матриксів без МСК-КМ [74, 98—100], інші, що позитивний ефект від застосування МСК-КМ гірший ніж при використанні культивованих шванівських клітин [101], але більшість погоджуються з думкою, що ефект приблизно однаковий [102, 103].

Іншою проблемою є висока інвазивність і болючість процедури забору кісткового мозку, тому для успішного впровадження у клініку потрібні стовбурові клітини, забір яких менш інвазивний, зокрема це жирова тканина, волосяний фолікул, тканини плоду. Крім цього МСК-КМ володіють меншим коефіцієнтом диференціації та проліферації ніж ЕСК, нейральні стовбурові клітини чи культивовані шванівські клітини [9].

Жирова тканина людини є багатим джерелом мультипотентних стовбурових клітин. Крім адипоцитів та преадипоцитів вона містить гетерогенну групу клітин, що складається із фібробластів, мікроваскулярних ендотеліальних клітин, стовбурових клітин. Завдяки адгезивним властивостям стовбурових клітин, можна виділити мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини (МСКЖТ) [104—106].

Основними перевагами застосування МСКЖТ, є можливість отримання жирової тканини у достатньому об'ємі від будь-якого пацієнта, а також відносно прості умови її культивування. Загальна кількість стовбурових клітин у ліпоаспіраті складає в середньому 2% (із 300 мл жиру можна виділити від 10 до 20×10^6 клітин), а здатність викликати імунну реакцію шляхом експресії молекул головного комплексу гістосумісності є тільки у 1% цих клітин. Для порівняння: строма кісткового мозку містить від 0,001 до 0,1% стовбурових клітин, які володіють нижчим коефіцієнтом проліферації при аналогічній здатності до диференціації. Все вищесказане робить МСКЖТ надзвичайно перспективними для стимуляції регенерації тканин, зокрема периферійної нервової системи при алогенній трансплантації [107, 108].

МСКЖТ продукують різноманітні трофічні та ростові фактори незалежно від віку донора та локалізації анатомічної ділянки забору. Завдяки цьому, навіть, поживне середовище у якому вони культивувалися, також стимулює ріст аксонів і попереджує загибель нейронів [109].

У кількох роботах було показано, що за здатністю МСКЖТ стимулювати регенерацію ПН, вони не поступаються аутологічним шванівським клітинам [110—112]. Ще у кількох дослідженнях автори не виявили різниці у відновленні ПН при використанні матриксів із МСКЖТ та АНП [113—115].

Навколоплодові тканини є джерелом популяції більш онтогенетично ранніх МСК. Їх можна виділити із амніотичної рідини, безпосередньо із амніона, пуповинної крові та вартонових драглів пуповини. Таким МСК притаманна менша частота мутацій, так як вони починають своє існування із закладки ембріона і продовжують існувати, в більшості випадків, не довше 42 тижнів (протягом виношування вагітності). Після пологів їх можна виділити із навколоплодових тканин і у відповідних умовах культивування вони також проявляють нейральний фенотип [9, 116].

Стовбурові клітини амніотичної рідини можуть проявляти фенотип як МСК, так і нейральних стовбурових клітин і при їхній трансплантації на

моделі дефекту СН у щура, мають здатність стимулювати його регенерацію [117]. Стовбурові клітини пуповини також мають здатність прискорювати відновлення ПН на моделях його розчавлення чи перерізання [118].

Проте, стовбурові клітини такого походження викликають імунну реакцію організму при алогенній трансплантації, що не характерно для стовбурових клітин дорослого організму (МСКЖТ, МСК-КМ) а аутоотрансплантація не завжди можлива, так як стовбурові клітини навколоплодових оболонок потрібно заготовляти після народження плода і зберігати впродовж усього життя людини. Можливо у майбутньому проблема буде вирішена за рахунок збільшення кількості спеціальних банків, де зберігатимуться такі клітини [9].

У 2002 році М. Тамакі зі співавторами повідомили, що мультипотентні стовбурові клітини присутні у скелетних м'язах [120]. Пізніше було виявлено, що вони здатні диференціюватися у клітини мезодермальної (скелетні м'язи та ендотелій) та ектодермальної ліній *in vivo* [121]. Однією із переваг цих клітин є їхня здатність проліферувати і виживати в умовах гіпоксії та оксидантного стресу [122].

У експерименті виявлена здатність стовбурових клітин скелетних м'язів набувати фенотипу шванівських клітин та мієлінізувати регенеруючі аксони, а також стимулюють ріст ендотеліальних клітин, перицитів та фібробластів. Ці властивості були виявлені у експерименті на моделі аксонотмезису (розчавлення нерва) та невротмезису (дефект нерва з пластиною ацелюлярним трансплантатом) [123].

У 2006 році описано відкриття ще одного типу стовбурових клітин: індукованих плюрипотентних стовбурових клітин, що вперше виділені у мишей. Це соматичні клітини дорослого організму, індуковані у плюрипотентні, шляхом ектопічної ко-експресії факторів транскрипції [124]. Існує спеціальний протокол для індукції плюрипотентних стовбурових клітин у нейральній лінії [125], і кілька досліджень показали позитивний ефект від застосування їх для відновлення як центральної, так і периферичної

нервової систем [126—128]. Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини подібні до ЕСК, проте не мають недоліків: морально–етичних проблем у застосуванні та необхідності імуносупресії при їх трансплантації. Однак, епігенетична інформація, яка залишилася від соматичних клітин попередників, у вигляді хромосомних аберацій як наслідок генетичного ре-програмування, може зробити ці клітини ще більш туморогенними ніж ЕСК [129].

1.6. Перспективи використання стовбурових клітин нервового гребеня для регенерації периферичних нервів

Наявність серед клітин НГ стовбурових клітин було встановлено відносно недавно [130]. НГ — це транзиторна ембріональна структура, яка утворюється під час змикання нервових валиків у нервову трубку (нейруляції). В подальшому клітини НГ мігрують в товщу тканини сомітів і дають початок клітинним елементам периферичної нервової системи та структурам не нейронального типу [131].

Власне термін “стовбурові клітини нервового гребеня” вперше використали D. Stemple та D. Anderson, після того, як виділили культуру клітин НГ, шляхом флуоресцеїн активованого сортиingu тканин ембріона щура, використовуючи антитіла проти низькоафінного рецептора росту нерва p75 [132]. Наступне культивування цих клітин показало, що більшість із них стали нейронами та невелика кількість незрілими шванівськими клітинами. У популяції клітин наступного клону виявлялися клітини нейрального типу і неспецифічні не нейральні клітини із здатністю давати генерацію мультипотентних субклонів. Згодом у такий самий спосіб авторам вдалося виділити СКНГ, що представляли постмігаторну популяцію, із фетального СН щура. Клітини постмігаторної культури СКНГ *in vitro* диференціювалися у нейрони, шванівські клітини, міофібробласти. При трансплантації цієї культури без періоду культивування безпосередньо в

курячі ембріони спостерігався ріст нейрональних та гліальних структур у різних відділах периферичної нервової системи [133].

СКНГ ростральної частини НГ дають початок більшості кістково-хрящових структур обличчя, нервовим гангліям та гладким міоцитам судин голови, вагусної та сакральної частин — нейронам стінки кишечника, трункусної — структурам периферичної нервової системи, пігментним клітинам шкіри, ендокринним клітинам наднирників [134, 135].

Із СКНГ утворюються не тільки клітини гліального та нейрального типу, а й фібробласти ендоневрію, тобто утворення всіх елементів ПН залежить від мультилінійної диференціації одного типу клітин — похідних НГ [135].

Волосяний фолікул складається із концентрично розташованих циліндрів, що містять клітини, які продукують високоспеціалізовані протеїни, зокрема кератин, основний компонент волосся і перебуває у постійному динамічному стані: фаза росту (анаген), перехідна фаза (катаген), фаза спокою (телоген) [136]. Такий активний життєвий цикл передбачає наявність стовбурових клітин [137].

Валик бруньки волосяного фолікула є нішею для епідермальних та меланоцитарних стовбурових клітин. Також у волосяному фолікулі є популяція клітин, які є похідними НГ, що мають надзвичайно широкий потенціал до диференціювання і експресують нестин, маркер стовбурових клітин нейрального типу [130, 135, 136].

Група вчених під керівництвом M.Sieber-Blum відкрили їх у 2004 році і довели походження цих клітин із НГ [130].

На сьогодні доведено, що СКНГ, виділені із волосяного фолікула, можуть диференціюватися у нейрони, гліальні клітини, кератиноцити, гладком'язові клітини, меланоцити *in vitro* [139—141]. Нестин-позитивні, кератин 15-негативні клітини, можуть диференціюватися у нейрони при їх підшкірній імплантації білими мишам [140, 142]. Фенотип та особливості культивування СКНГ доводять, що вони мають високий проліферативний

потенціал, здатні до мультилінійного диференціювання, експресують антигени, характерні для мультипотентних стовбурових клітин (CD44, CD73, CD90 и Sca-1) и CD117 (маркер мігруючих клітин НГ). В культурі *in vitro* СКНГ демонструють здатність до клонального росту та самооновлення [137, 138]. Виділені із волосяних фолікулів гризунів та людини СКНГ, залежно від умов культивування перетворювалися у нейрони та S100-імунопозитивні гліоцити, що експресували β -3-тубулін та кислий гліальний протеїн фібрил (GFAP) [137, 143]. Пізніше було встановлено, що використання цих стовбурових клітин може стимулювати регенерацію ушкодженого ПН щура [137]. Введення СКНГ, отриманих із волосяного фолікула щурів, у аутонейротрансплантат також стимулювало відновлення ПН при його значному дефекті [144, 145].

У кількох дослідженнях вивчався вплив недиференційованих СКНГ на регенерацію СН та великогомілкового нерва на моделі краш-ушкодження. Результати показали здатність СКНГ диференціюватися у GFAP-позитивні клітини, що були подібні до шванівських, і мієлінізувати аксони. У таких експериментальних групах результати функціонального відновлення були значно вищими [145, 146].

Вивчався також вплив на регенерацію нерва диференційованих СКНГ імплантованих у ацелюлярний ксенотрансплантат. Підтверджена здатність клітин тривалий час підтримувати диференційований стан кількість регенеруючих аксонів та ступінь мієлінізації у таких ксенотрансплантатах була значно вищою, ніж у трансплантатах без СКНГ [147].

Незважаючи на те, що СКНГ подібні до ЕСК, вони не є туморогенними та не втрачають потенціалу до диференціювання після заморожування та розморожування, що вкрай важливо з точки зору їх застосування у клініці та надає перевагу над індукованими плюрипотентними стовбуровими клітинами та ЕСК [141, 147] (Таблиця 1.6.1).

Таблиця 1.6.1

Роботи у яких досліджувався вплив СКНГ на регенерацію ПН

Автор	Експериментальна модель	Спосіб доставки	Результат
Амош У. та співавтори [140]	Перерізка СН та великогомілкового нервів миші	Введення у операційну рану навколо нерва	Значно краще відновлення нерва у порівнянні з контролем; GFP-позитивні СКНГ диференціювалися у GFAP-позитивні клітини, подібні до шванівських, і брали участь у мієлінізації нерва
Амош У. та співавтори [144]	Розчавлення СН миші	Введення у операційну рану навколо нерва	СКНГ диференціювалися у клітини, подібні до шванівських, і брали участь у мієлінізації нерва
Амош У. та співавтори [145]	Перерізка СН миші (дефект 2 мм)	Введення у операційну рану навколо нерва	СКНГ диференціювалися у GFAP-позитивні клітини, подібні до шванівських, і брали участь у мієлінізації нерва
Lin H. та співавтори [147]	Перерізка СН щура (дефект 4 мм)	Пряме введення у ацелюлярний ксенотрансплант нерва	СКНГ диференціювалися у клітини, подібні до шванівських, збільшували кількість аксонів, що регенерували, ступінь їх мієлінізації

Таким чином, щоб розробити ефективну методику відновлення ПН при їх дефектах великого розміру, необхідно використовувати принцип тканинної інженерії, який передбачає розробку біологічних субститутів, що підтримуватимуть, відновлюватимуть чи покращуватимуть функцію певного

виду тканини чи цілого органу. Використання комплексного підходу, а не тільки вдосконалення якогось окремого напрямку.

Перспективним з точки зору доступності, етичних принципів та біологічних властивостей є використання мультипотентних стовбурових клітин — похідних НГ для заміщення значних дефектів ПН, і вивчення їх впливу на регенерацію ПН при його травматичному ураженні в експерименті, з подальшим можливим клінічним впровадженням.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Методика культивування стовбурових клітин нервового гребеня

Дослідження виконано на 55 білих безпородних щурах-самцях (250 ± 25 г, 5–6 міс), утримуваних у стандартних умовах віварію ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України" з дотриманням чинних норм біоетики (Директива Ради ЄС 86/609/ЕЕС "Про наближення законів, підзаконних та адміністративних положень держав-членів про захист тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (1986), Європейська Конвенція про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (1986), Закон України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006)). Протокол дослідження схвалено Комітетом з біоетики ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України".

Тварини були розділені на 4 групи, 3 з яких, у свою чергу, розділялися на 2 підгрупи (з часовими проміжками спостереження 4 тижні та 8 тижнів). 4 група тварин (псевдооперовані) використовувалися для отримання контрольних показників функціонального індексу СН. 3 тварини використовувалися для підтвердження життєдіяльності СКНГ у тканинно-інженерних матриксах на 7 добу експерименту.

СКНГ виділялися методом експлантатів за М. Sieber-Blum та співавторами [130] у модифікації Р.Г. Васильєва [137, 138] з валика бруньки волосяного фолікула вібрис безпорідних дорослих щурів самців ($n=3$) віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» на базі ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України».

Під контролем стереомікроскопа Stemi 2000 (Carl Zeiss, Німеччина) волосяні фолікули вібрисів вирізалися з біоптатів шкіри і очищалися від прилеглої дерми і жирової тканини. Потім проводили мікродиссекцію валика бруньки волосяного фолікула на рівні кільцевого синуса і вище волосяного сосочка на рівні кавернозного синуса. Після цього розсікали сполучнотканинну капсулу і витягували валик мікропінцетом. 3–5 експлантатів валика бруньки волосяного фолікула поміщали в покриту колагеном І-го типу чашку Петрі 35, інкубували протягом 1 год для їх прикріплення. Після прикріплення протягом однієї години, експлантати заливали середовищем росту: α MEM ("Sigma", США) з додаванням 5% фетальної телячої сироватки ("Sigma", США), 5 нг/мл основного фактору фібробластів ("Sigma", США), 10 нг/мл епідермального фактору росту ("Sigma", США), 1% розчину вітамінів MEM ("Sigma", США), 1% поживної добавки ITS ("Gibco", США), 2 мМ глютаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В. Культивування проводили в мультигазовому інкубаторі CB 210 ("BINDER", Німеччина) при температурі 37°C у газовій суміші, що мала наступний склад: 90% N₂, 5% O₂ и 5% CO₂. Перший пасаж (П1) проводили на десяту добу в культуральний флакон 25 см². Пасажування проводили за допомогою 0,05% розчину трипсину в 0,53 мМ розчині Na₂EDTA ("Sigma", США).

В експерименті використовували стовбурові клітини з фенотипом нервового гребеня п'ятого пасажу згідно паспорту наданого ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України".

2.2. Методика виготовлення тканинно-інженерного матрикса на основі стовбурових клітин нервового гребеня та колагенової трубки

Тканинно-інженерний матрикс для пластики дефекту ПН виготовляли СКНГ за двоетапною технікою. На першому етапі проводили імплантацію 200 тисяч СКНГ на внутрішню поверхню колагенового матриксу довжиною

1,2 см. Для цього закривали один кінець трубки фібриновим згустком, вносили суспензію клітин у поживному середовищі, та закривали другий кінець аналогічним чином. Для рівномірного розподілу клітин матрикс поміщали у роллерну установку CellNest Roller D2 (SINO-BIOTOP, Китай), яка знаходилась у мультигазовому інкубаторі та культивували на протязі 24 годин із швидкістю 20 обертів в хвилину. На другому етапі на наступну добу імплантували ще 800 тисяч СКНГ у порожнину матрикса шляхом полімеризації фібринового гелю, що був виготовлений із крові щурів. Для виготовлення фібринового гелю від щурів збирали кров шляхом пункції хвостової вени: 1) у центрифужні пробірки без антикоагулянту для виготовлення сироватки, що містить тромбін; 2) у центрифужні пробірки з антикоагулянтом ACD-A ("Haemonetics", США) у співвідношенні 9 : 1 для отримання збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП). Кров без антикоагулянту інкубували у термостаті при 37°C на протязі години для її згортання. Потім центрифугували 20 хв при 4°C та 2300 g, відбирали супернатант (сироватка, що містить тромбін) та заморожували при — 80°C до використання. Кров за антикоагулянтом обробляли центрифугуванням в два етапи: 1) 10 хв при 4°C та 800 g (седиментація еритроцитів та мононуклеарів крові, отримання плазми крові); 2) 20 хв при 4°C та 2300 g для седиментації тромбоцитів та отримання збагаченої тромбоцитами плазми. Потім ЗТП піддавалась двом циклам заморожування-відтаювання і центрифугувалася 20 хв при 4°C та 2300 g. Супернатант (кріолізат ЗТП) відбирався та зберігався при — 80°C до використання. Для формування фібринового гелю клітини ресуспендували у 900 мкл кріолізату ЗТП, додавали 100 мкл сироватки з активованим тромбіном (суміш 750 мкл сироватки з тромбіном з 250 мкл 10% розчину CaCl_2) та заповнювали цим розчином порожнину закритого з одного боку колагенового матрикса, закривали другий кінець матрикса та інкубували 20 хв у мультигазовому інкубаторі при 37°C до полімеризації фібринового гелю. Потім засіяний клітинами матрикс поміщували у живильне середовище та культивували на протязі 24 годин до використання.

2.3. Методика проведення хірургічного втручання

Хірургічне втручання виконувалося під загальним знеболенням, шляхом внутрішньоочеревинного введення суміші розчинів ксилазину гідрохлориду 15 мг/кг та кетаміну гідрохлориду 70 мг/кг маси тіла. Тварину фіксували на операційному столику черевцем донизу. Дотримуючись правил асептики та антисептики, після обробки операційного поля, виконувався лінійний розріз шкіри по латеральній поверхні стегна у проекції СН зліва. За допомогою інструментів (затискач типу “москіт”, пінцет хірургічний) тупо-гостро виділявся та мобілізувався лівий СН (рис. 2.4.1).



Рис. 2.3.1. Етапи виділення СН. А — тварина фіксована на операційному столі; В — операційне поле перед розрізом шкіри; С — виділено СН

У 1 (експериментальна): У СН (на відстані $10 \pm 1,5$ мм від точки виходу його з порожнини малого тазу) за допомогою леза висікався фрагмент довжиною до 10 ± 2 мм (рис. 2.4.2.В). Після повороту фрагменту на 180° , він знову вшивався між кінцями СН. Накладалося 3–6 епіневральних швів за допомогою атравматичної голки із монофіламентною поліамідною ниткою 10/0 з використанням операційного мікроскопа (збільшення $\times 12$). Цей спосіб моделює операцію АНП у клініці (рис. 2.4.2.С).

У 2 (експериментальна): У СН (на відстані $10 \pm 1,5$ мм від точки виходу його з порожнини малого тазу) за допомогою леза висікався фрагмент довжиною до 10 ± 2 мм. Проксимальний та дистальний кінці нерва вводилися у порожнину трубчатого матриксу, заповненого фібриновим гелем і фіксувалися до його стінок за допомогою 4 епіневральних швів за допомогою атравматичної голки із монофіламентною поліамідною ниткою 10/0 з використанням операційного мікроскопа (збільшення $\times 12$) (рис. 2.4.2.D,E).

У експериментальній групі 3: У СН (на відстані $10 \pm 1,5$ мм від точки виходу його з порожнини малого тазу) за допомогою леза висікався фрагмент довжиною до 10 ± 2 мм. Проксимальний та дистальний кінці нерва у порожнину трубчатого матриксу, заповненого фібриновим гелем із СКНГ у кількості 1×10^6 , і фіксувалися до його стінок за допомогою 4 епіневральних швів за допомогою атравматичної голки із монофіламентною поліамідною ниткою 10/0 з використанням операційного мікроскопа (збільшення $\times 12$).

У контрольній групі 4 (несправжньооперовані): після обробки операційного поля, виконувався лінійний розріз шкіри по латеральній поверхні стегна у проекції СН зліва. За допомогою інструментів (затискач типу “москіт”, пінцет хірургічний) тупо виділявся та мобілізувався лівий СН (рис. 2.4.2.A). Після цього проводилося пошарове відновлення цілісності м'яких тканин без маніпуляцій з нервом.

Після ретельного гемостазу в усіх групах тварин пошарове зашивання післяопераційної рани проводилося за допомогою сертифікованої атравматичної голки із монофіламентною поліамідною ниткою 4/0.

З метою попередження інфекційних ускладнень у задню шийну ділянку підшкірно вводили розчин бензилпеніциліну у дозі 1 млн. ОД на 1 кг маси тіла. З метою протизапальної і протинабрякової терапії інтраперитонеально вводили розчин дексаметазону у дозі 6 мг/кг маси тіла. Після хірургічного втручання контрольні і дослідні тварини отримували однакове харчування згідно норм віварію.

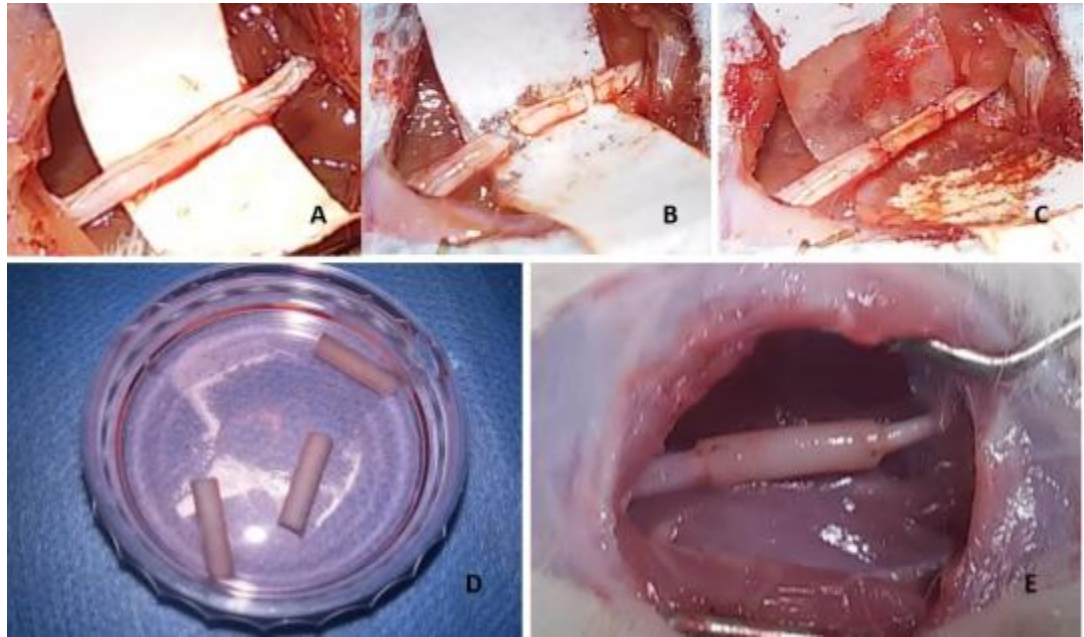


Рис. 2.3.2. А — виділення СН; В — формування дефекту СН; С — АНП; D — матрикси, підготовані до імплантації; Е — пластика зони діастазу СН матриксом

2.4. Методика проведення функціонального тесту відновлення сідничного нерва

Для контролю функціонального відновлення СН використовували “тест з біговою доріжкою” (“Walking Track Test”) з визначенням функціонального індексу СН (Sciatic Functional Index, SFI) за методикою T.S. Johnson та співавторів [121] у нашій модифікації [149, 155].

Визначення SFI проводили у всіх групах тварин кожного тижня через рівні проміжки часу протягом 8 тижнів експерименту для отримання

повнішої інформації щодо динаміки відновлення СН. До цього щурів “тренували” ходити по доріжці 1 раз в день протягом 3-х днів до початку експерименту. Кожну тварину тестували 3 рази і вибирали найбільш показові відбитки підошовних поверхонь стоп на папері.

Для отримання відбитків підошовних поверхонь стоп щурів використовувалася спеціально розроблена конструкція (Патент України на корисну модель №118157), яка складалася із дерев'яного піддона з бортиками на який накладалася половина розрізаної повздовж пластикової труби (рис. 2.4.1).



Рис. 2.4.1. А — загальний вигляд пристрою із знятою кришкою; В — рух тварини по піддону (демонстрація принципу методу; під час тестування трубу закривали кришкою)

У такий спосіб формувався тунель, дно якого встелювалося папером. Розмір тунелю виключав поворот тварини і рух був можливим тільки вперед. З одного кінця у піддоні формувався жолоб, що заповнювався поролоном, просякнутим барвником (фукорцин). Тварину опускали задніми лапками на поролон, таким чином зафарбовувалися підошви. Після цього вона відпускалася і вхід у тунель закривався заслінкою. Тварина починала рух по тунелю, залишаючи відбитки стоп на папері і потрапляла у клітку, яка розміщувалася на протилежному кінці тунелю (рис. 2.4.1.В).

У такий нескладний та легковідтворюваний спосіб вдалося отримати відбитки стоп експериментальної тварини на папері, які аналізувалися. Визначали наступні показники: print length (PL) — відстань від п'яти до третього пальця, toe spread (TS) — відстань від 1 до 5 пальців, intermediate toe spread (ITS) — відстань від 2 до 4 пальця. Всі показники визначали у міліметрах для експериментальної (E) та інтактної (N) кінцівок (рис. 2.4.2).

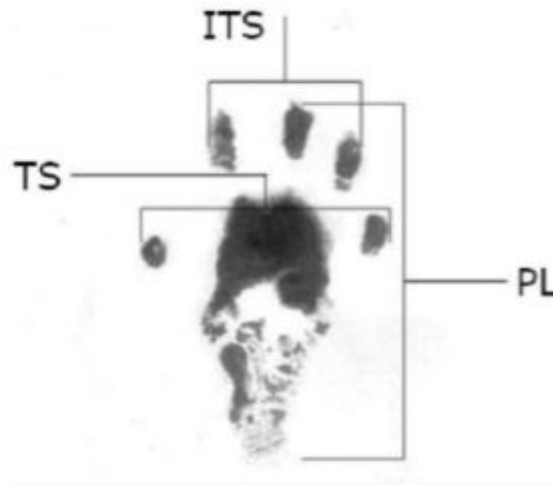


Рис. 2.4.2. Відбиток підошовної поверхні стопи щура, отриманий за допомогою “Тест з біговою доріжкою” (пояснення у тексті)

SFI визначали за допомогою формули Bain-Mackinnon-Hunter [122, 123]:

$$SFI = -38,8 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109,5 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13,3 \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8,8$$

За «0» вважали нормальну функцію нерва, за «-100» — відсутність функції нерва. Показник розраховували в усіх групах тварин, визначали середнє значення та середньоквадратичне відхилення. Статистичну достовірність різниці в отриманих показниках розраховували за допомогою U-тесту Mann–Whitney для порівняння груп між собою на кожному тижні спостереження та для порівняння показників у межах кожної окремої групи на кожному тижні – парний тест Вілкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test).

2.5. Методика проведення електрофізіологічного дослідження

ЕНМГ виконували у тварин усіх експериментальних груп через 4 та 8 тижнів після моделювання травми. Після наркотизації тварин шляхом внутрішньоочеревинного введення суміші ксилазину гідрохлориду 15 мг/кг та кетаміну гідрохлориду 70 мг/кг маси тіла, вони фіксувалися на операційному столику черевцем донизу. Вздовж хвоста фіксували електрод заземлення (металізована стрічка, змочена 0,9% розчином натрію хлориду, шириною 20 мм, довжиною 100 мм), за допомогою мікрохірургічної методики виділяли СН від місця виходу з малого тазу до розподілу його на гілки на лівій (експериментальній) та правій (інтактній) задніх кінцівках. Фізіологічним розчином змивали сліди крові, повністю очищуючи операційне поле. Для проведення ЕНМГ, нерв охоплювали платиновим гачкоподібним біполярним електродом (діаметр монополяру — 0,22 мм, відстань між монополярними — 5,5 мм), уникаючи контакту з оточуючими тканинами. Стимулюючий струм генерували цифровим електронейроміографом «Нейро-МВП-Мікро» (ТОВ «НЕЙРОСОФТ», Росія), подавали у імпульсному режимі (тривалість імпульсу — 5 мс) з частотою 0,2 Гц (1 імпульс на 5 сек) та кроком збільшення сили струму у 1 мА (рис 2.6.1). Інтенсивність стимуляції підбиралася індивідуально, виходячи з того рівня, при якому досягали максимальної амплітуди М-відповіді (Амв) і становила в середньому $2,5 \pm 0,5$ мА ($3,0 \pm 0,5$ мВ). Реєстрацію збудження проводили вказаним електронейроміографом за допомогою концентричного голкового електроду (довжина — 25 мм, діаметр — 0,3 мм, площа відведення — $0,015 \text{ мм}^2$) у руховій точці литкового м'язу. Відстань між стимулюючими та реєструючими електродами становила ~30 мм. Після проведення дослідження тварину у стані наркотичного сну виводили з експерименту методом шийної дислокації шляхом тракції за ростральний кінець.

Аналіз функції нервово-м'язового апарату лабораторних тварин здійснювали на підставі таких показників ЕНМГ:

✓ амплітуда М-відповіді (A_{mv}) — показник амплітуди потенціалу дії максимального скорочення м'яза на пряму стимуляцію нерва, який іннервує цей м'яз (у мкВ); цей показник відображає кількість волокон м'яза, які беруть участь у його скороченні і є непрямим показником відновлення трофічної функції ушкодженого нерва;

✓ латентний період М-відповіді (ЛПмв) — період від моменту стимуляції нерва, до моменту реєстрації потенціалу дії м'яза (у мс); ЛПмв нерва характеризує швидкість регенерації, структурної перебудови (мієлінізації) товстих рухових волокон.

Так як відстань між стимулюючим та реєструючим електродами у експериментальних тварин була малою (близько 3 см), визначати швидкість проведення збудження по нерву недоцільно через значну похибку, яка робила б недостовірними результати роботи. Зручніше і ефективніше з практичної точки зору є порівняння ЛПмв.

Для аналізу відбирали тільки показники амплітуди максимальної М-відповіді, отримані у більшості випадків — при силі стимулюючого струму у 3 мА.

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного пакету STATISTICA 10.0 на персональному комп'ютері. Усереднені величини представляли у вигляді ($M \pm m$), де M — середнє значення величини, m — стандартна похибка середнього значення величини. Достовірність різниці даних правої та лівої задньої кінцівки у межах кожної групи оцінювали за Уїлкоксоном (Wilcoxon Matched Pairs Test), гомолатеральних кінцівок у межах кожної групи на різних термінах спостереження, а також між різними групами на однакових термінах спостереження — за допомогою U-тесту Мана-Уїтні (Mann-Whitney U-test). У всіх випадках припущення щодо статистичної значущості отриманого результату вважали вірним, якщо ймовірність нульової гіпотези була меншою ніж 0,05 ($p < 0,05$).

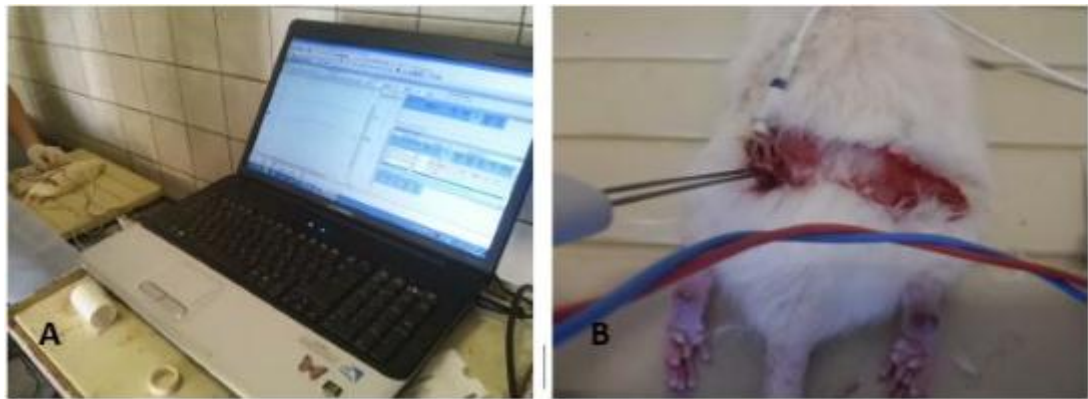


Рис. 2.5.1. Проведення ЕНМГ. А — загальний вигляд; В — момент реєстрації показників

Показники відновлення СН досліджували через 4 і 8 тижнів експерименту електрофізіологічними морфологічними та імуногістохімічними методами.

Розподіл лабораторних тварин на групи залежно від застосованих мікрохірургічних технік реконструкції та методів контролю відновлення СН представлений у таблиці 2.5.1.

Таблиця 2.5.1

Групи тварин, залежно від застосованих мікрохірургічних технік реконструкції та методів контролю відновлення СН

Групи тварин	Тривалість експерименту			
	4 тижні		8 тижнів	
1. АНП СН (n=14) (експериментальна група)	1А (n=7)		1В (n=7)	
	Еф	Гіст/ІГХ	Еф	Гіст/ІГХ
2. Тубаж дефекту СН колагеновим матриксом, заповненим фібриновим гелем (n=15) (експериментальна група)	2А (n=7)		2В (n=8)	
	Еф	Гіст/ІГХ	Еф	Гіст/ІГХ
3. Тубаж дефекту СН колагеновим матриксом, заповненим фібриновим гелем з СКНГ (n=16) (експериментальна група)	3А (n=8)		3В (n=8)	
	Еф	Гіст/ІГХ	Еф	Гіст/ІГХ
4. Псевдооперовані (n=7) (контрольна група)	4 (n=7)			
	Еф, Гіст/ІГХ			

Примітка. Еф – електрофізіологічне дослідження; Гіст/ІГХ – гістологічне та імуногістохімічне дослідження.

2.6. Методика проведення морфологічного та імуногістохімічного досліджень

2.6.1. Виготовлення гістологічних препаратів

Для світлооптичної мікроскопії біологічний матеріал фіксували протягом доби в 10% розчині нейтрального формаліну, промивали зразки, зневоднювали у серії спиртів, заключали їх у парафін та отримували зрізи товщиною 5 мкм на мікротомі (MICROM HR325). Потім зрізи депарафінізували у ксилолі і заливалися у парапласт (Plastiwax, Kaltek). Залиті у парапласт зразки ПН та тканинно-інженерних матриксів фарбувалися з використанням протоколів наступних гістологічних методик.

1) Імпрегнація сріблом по Більшовському-Гросс.

Депарафіновані і промиті у дистильованій воді зрізи покривали 10% розчином нітрата срібла і витримували у чашках Петрі, при 56°C, протягом 15 хв. Потім промивали у дистильованій воді. Продовжували інкубацію в розчині 10% нітрату срібла з гідроксидом амонію. Витримували 30 хвилин при 56°C. Після потемніння зрізів їх промивали у розчині що містить формалін, лимонну кислоту, азотну кислоту та гідроксид амонію. Предметні скельця зі зрізами занурювали у 1% розчин гідроксиду амонію на декілька хвилин, щоб зупинити хімічну реакцію. Далі промивали дистильованою водою та тонували 2% водним розчином AgCl_3 . Після тонування у тривалентному хлориді золота на зрізи наносили 5% розчин тіосульфату натрію. Промивали в 3 змінах дистильованої воді і дофарбовували еозином. Пофарбовані зрізи зневоднювали в спирті 95%, проводили через ксилол та покривали гістологічним бальзамом для фіксування зрізів, що містить ксилол (Nichirei corporation).

2) Прискорений метод фарбування мієлінових волокон і нервових клітин люксолевим синім.

Депарафіновані і промиті у дистильованій воді зрізи фарбували у розчині люксолеового міцного синього 2 години при температурі + 56–60°C. Промивали зрізи у 96% і 70% спиртах і дистильовані воді. Диференціювали пофарбовані зрізи у 0,1% розчині тетраборату натрію, контролюючи процес під мікроскопом.

Після закінчення диференціації зрізів їх прополіскували у 5% розчині оцтової кислоти. Потім зрізи фарбували крезоловим фіолетовим міцним, 5 хвилин, промивали у дистильованій воді та зневоднювали у 96% спирті, просвітлювали у ксилолі і покривали середовищем для фіксації.

2.6.2. Мікроскопічні методи дослідження

Світлову мікроскопію, дослідження цитологічних і гістологічних препаратів проводили на інвертованому флюоресцентному мікроскопі Axio Observer A1, оснащеному цифровою камерою AxioCam ERc 5s і ліцензійним програмним забезпеченням ZEN 2012.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВІДНОВЛЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА ПІД ВПЛИВОМ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ ЗА ДАНИМИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ТЕСТУ

Після експериментального ураження СН завжди відбувається порушення його функції, що відображається у вигляді порушення ходи. Поступове покращення ходи відображає процес регенерації СН щура у часовому аспекті. Електрофізіологічні та морфіологічні методи не повністю відображають ступінь регенерації СН та його динаміку, тому для їх доповнення необхідно використовувати функціональний метод [152]. Показники функціонального індексу СН (SFI) визначалися у всіх тварин до 4 тижня і після виведення з експерименту половини їх (для електрофізіологічних, морфологічних та імуногістохімічних досліджень), SFI продовжували визначати тварин, що залишилися (до 8 тижнів), тим не менше їх кількість дозволяє вважати результати статистично достовірними. Показники SFI у всіх групах представлені у таблиці 3.1.

У однієї тварини з групи 1 та в однієї із групи 2 розвинулися трофічні зміни п`яти експериментальної кінцівки (рис.3.1). Аутономій та мутиляцій зафіксовано не було.



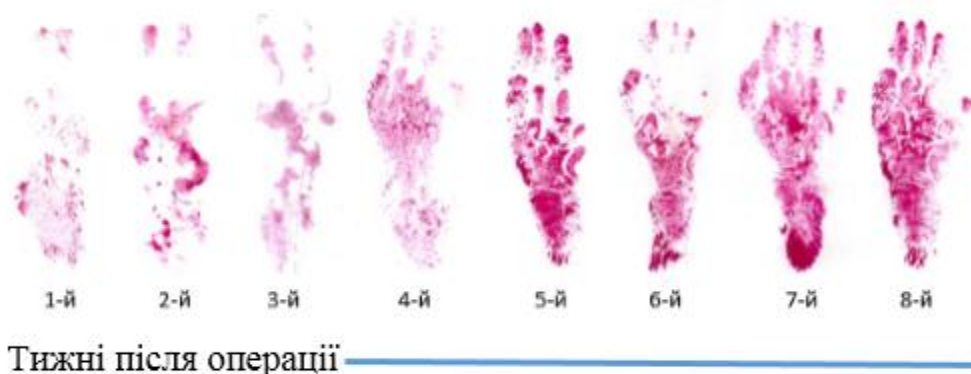
Рис. 3.1. Трофічні зміни п`яти експериментальної кінцівки

Таблиця 3.1

**Показники функціонального індексу СН (SFI) у групах
експериментальних тварин**

Тиждні експерименту	1	2	3	4	5	6	7	8
АНП								
Ср.	-70,31	-59,26	-48,96	-34,98	-28,87	-28,50	-27,68	-25,52
±	2,58	1,75	2,41	1,41	1,55	1,42	1,40	1,16
Імплантація тканинно-інженерного матрикса								
Ср.	-70,43	-68,19	-56,19	-44,00	-41,25	-40,37	-36,34	-35,87
±	2,28	1,61	2,03	1,77	2,56	2,08	1,58	1,75
Імплантація тканинно-інженерного матрикса + СКНГ								
Ср.	-70,76	-55,52	-45,00	-32,27	-30,31	-30,24	-29,72	-25,07
±	1,39	1,28	1,88	1,13	0,72	0,79	0,73	0,79
Псевдооперовані								
Ср.	-4,06	-3,26	-3,14	-2,37	-3,01	-2,66	-3,02	-3,07
±	0,73	0,51	0,53	0,31	0,17	0,27	0,26	0,26

У групі 1 після протягом першого тижня експерименту спостерігалось видовження ($PL=38,23\pm0,54$) та звуження ($TS=8,43\pm0,23$) експериментальної стопи. Це пояснюється наявністю атрофічних змін у м'язово-зв'язковому апараті, що свідчить про порушення функції СН (рис.3.2).



**Рис. 3.2. Відбитки підшов експериментальної кінцівки у щурів
отримані щотижнево після виконання АНП**

SFI у групі 1 на першому тижні дорівнював $-70,31 \pm 2,58$. У порівнянні з другим тижнем, SFI зріс до $-59,26 \pm 1,75$, що свідчить про присутність регенеративних процесів у СН і різниця між ними статистично достовірна ($p < 0,01$). На третьому тижні експерименту SFI зріс до $-48,96 \pm 2,41$. Різниця SFI між другим та третім тижнями статистично достовірна ($p < 0,01$). На четвертому тижні SFI дорівнював $-34,98 \pm 1,41$ і достовірно відрізнявся від аналогічного показника у групі 1 на 1, 2, 3 тижнях ($p < 0,01$). На п'ятому тижні SFI все ще статистично достовірно відрізнявся від аналогічного показника на четвертому тижні і складав $-28,87 \pm 1,55$ ($p < 0,01$).

На шостому тижні експерименту у групі 1 SFI складав $-28,50 \pm 1,42$, і різниця індексу між п'ятим та шостим тижнями виявилася статистично недостовірною ($p \geq 0,05$). Це може говорити про поступове призупинення процесів регенерації СН. Ці дані можна співставити з результатами ЕНМГ, які говорять про те, що регенерація СН у щура досягає свого піку в межах четвертого тижня. Використання функціонального методу дозволяє дещо конкретизувати часові рамки і за його даними процеси регенерації набувають характеру “плато” у межах четвертого-п'ятого тижня експерименту.

На сьомому та восьмому тижнях експерименту SFI у групі 1 складали $-27,68 \pm 1,40$ і $-25,52 \pm 1,16$ відповідно. Статистично достовірної різниці між ними не спостерігалось ($p \geq 0,05$). Це підтверджує думку про те, що далі процеси регенерації після виконання АНП у експерименті не відбуваються (рис.3.3).



Рис. 3.3. Динаміка SFI у групі 1 протягом 8 тижнів експерименту

У групі 2 функціональний індекс СН складав $-70,43 \pm 2,28$, що свідчить про дегенеративні процеси у СН після його перетину і, відповідно, у м'язово-суглобовому апараті експериментальної кінцівки щура (рис.3.4). У порівнянні з другим тижнем, де SFI був $-68,19 \pm 1,61$, статистично достовірної різниці між ними не було ($p \geq 0,05$). Це означає про затримку репаративних процесів в ушкоджені нерві після імплантації колагенового матриксу. Ймовірно, внаслідок невідповідності природнього мікрооточення, яке є при виконанні АНП, а також брак хемоатрактантів, які виділяють дегенеруючі аксони на шванівські клітини, для того, щоб стимулювати ріст “бюнгнерівських стрічок” та спраутинг аксонів.

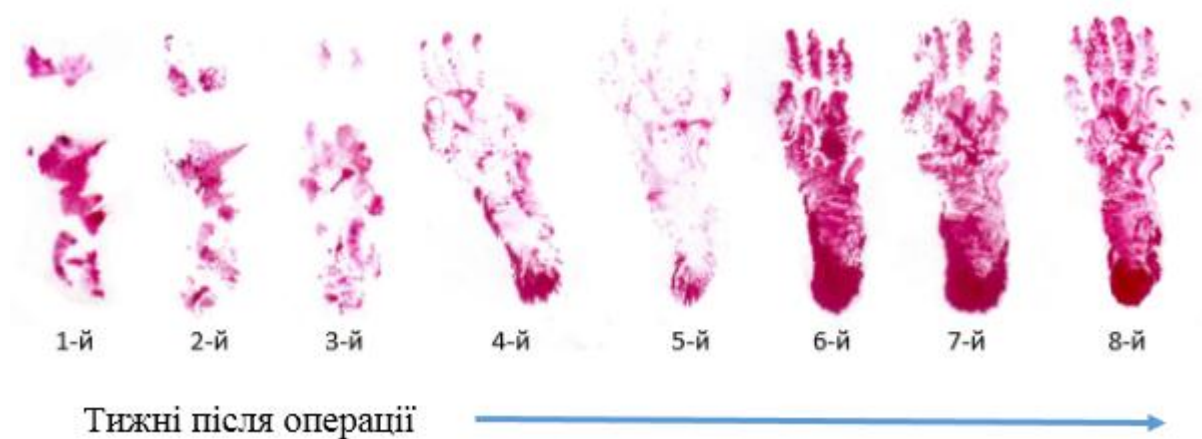


Рис. 3.4. Відбитки підшов експериментальної кінцівки у щурів отримані щотижнево після імплантації тканинно-інженерного матрикса

Процеси відновлення нервово-м'язового апарату розпочинаються тільки після другого тижня, і на третьому тижні SFI вже був $-56,19 \pm 2,03$ і достовірно відрізнявся від аналогічного показника на першому та другому тижнях ($p < 0,01$).

Протікання регенераційних процесів далі в цілому подібне до АНП. Так, на п'ятому тижні SFI склав $-41,25 \pm 2,56$ та статистично достовірно відрізнявся від SFI на четвертому тижні ($p < 0,01$). На шостому тижні SFI достовірно не відрізнявся від аналогічного показника на п'ятому тижні і був $-40,37 \pm 1,58$ ($p \geq 0,05$).

На сьомому та восьмому тижнях експерименту SFI у групі 2 складала $-36,34 \pm 1,58$ і $-35,87 \pm 1,75$ відповідно. Статистично достовірної різниці між ними не спостерігалось ($p \geq 0,05$). Це говорить про те, що далі процеси регенерації після виконання імплантації колагенового матриксу у експерименті не відбуваються (рис.3.5).

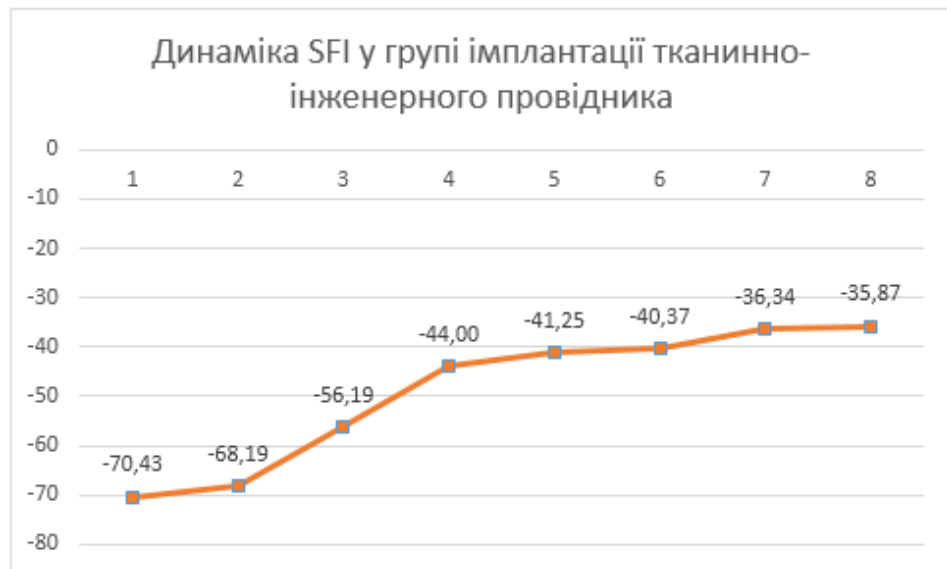


Рис. 3.5. Динаміка SFI у групі 2 протягом 8 тижнів експерименту

При виконанні імплантації тканинно-інженерного матрикса із СКНГ вже на другому тижні є статистично достовірна різниця у SFI в порівнянні з першим тижнем, відповідно $-70,76 \pm 1,39$ та $-55,52 \pm 1,28$ ($p < 0,01$). Це опосередковано відображає швидший розвиток репаративних процесів в ушкодженному нерві, ймовірно завдяки присутності у матриксу СКНГ (рис.3.6).

На першому тижні SFI був подібним до такого у групах 1 та 2, що також опосередковано свідчить про дегенерацію нерва після його перетину і, відповідні зміни в нервово-м'язовому апараті експериментальної тварини.

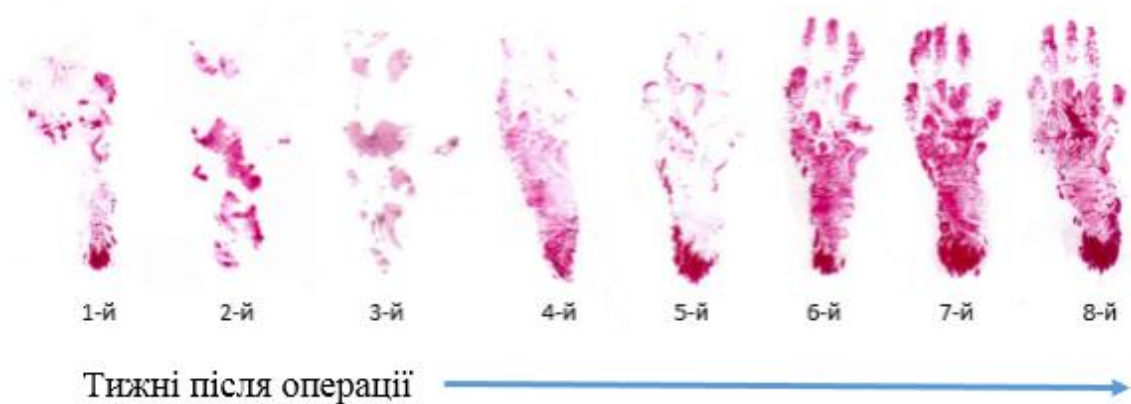


Рис. 3.6. Відбитки підшав експериментальної кінцівки у щурів отримані щотижнево після виконання імплантації тканинно-інженерного матрикса та СКНГ

Виявлена статистично достовірна різниця у SFI між другим і третім тижнями ($p < 0,01$). На третьому тижні SFI складав $-45,00 \pm 1,88$. Аналогічна динаміка спостерігалася і на четвертий тиждень, де SFI був $-32,27 \pm 1,13$. Різниця у показниках між третім та четвертим тижнями статистично достовірна ($p < 0,01$).

На п'ятому тижні експерименту SFI складав $-30,31 \pm 0,72$ і різниця між ним та SFI на четвертому тижні виявилася статистично недостовірною ($p \geq 0,05$). Такі дані опосередковано свідчать про те, що при виконанні АНП процес регенерації триває довше, ніж при імплантації тканинно-інженерного матрикса, навіть сумісно із СКНГ.

На шостому і сьомому тижні SFI склав $-30,24 \pm 0,79$ та $-29,72 \pm 0,73$ відповідно, різниця між ними та у порівнянні із показником SFI на п'ятому тижні експерименту різниця була статистично не достовірною ($p \geq 0,05$).

Цікаво що на восьмому тижні SFI склав $-25,07 \pm 0,79$ і виявився достовірно вищим за аналогічний показник на сьомому місяці ($p < 0,01$). Це опосередковано може свідчити про стимуляцію процесів регенерації в ушкодженному СН у пізній період завдяки СКНГ (рис.3.7).

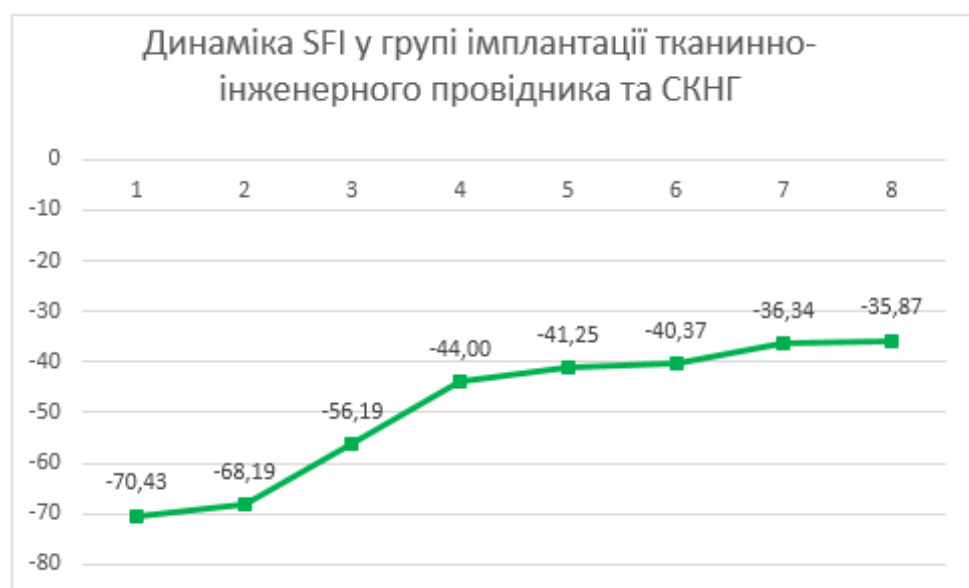


Рис. 3.7. Динаміка SFI у групі 3 протягом 8 тижнів експерименту

При порівнянні різних експериментальних груп на кожному тижні, було виявлено, що за даними SFI на першому тижні статистично достовірно не відрізнялися групи АНП та імплантації тканинно-інженерного матрикса, відповідно $-70,31 \pm 2,58$ та $-70,43 \pm 2,28$ ($p \geq 0,05$). Це, ймовірно, пов'язано із ранньою фазою відновлення, коли процеси дегенерації закінчуються, а процеси регенерації ще не розпочалися у повній мірі.

На другому тижні SFI у групі АНП дорівнював $-59,26 \pm 1,75$, а у групі ІКМ $-68,19 \pm 1,61$, і достовірна відмінність між ними на користь АНП ($p < 0,01$) говорить про швидший початок регенеративних процесів у цьому випадку (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

Починаючи з другого тижня показник SFI у групі 1 був статистично достовірно вищим від аналогічного показника у групі 2

Тиждень	Група 1	Група 2	p-value
2	$-59,26 \pm 1,75$	$-68,19 \pm 1,61$	0,002986
3	$-48,96 \pm 2,41$	$-56,19 \pm 2,03$	0,038167
4	$-34,98 \pm 1,41$	$-44,00 \pm 1,77$	0,001148
5	$-28,87 \pm 1,55$	$-41,25 \pm 2,56$	0,004578
6	$-28,50 \pm 1,42$	$-40,37 \pm 2,08$	0,006489
7	$-27,68 \pm 1,40$	$-36,34 \pm 1,58$	0,002164
8	$-25,52 \pm 1,16$	$-35,87 \pm 1,75$	0,001460

Можна зробити висновок, що імплантат колагенового матриксу не може у повній мірі забезпечити субстрат для відновлення СН, створюючи тільки механічну опору для направленого росту аксонів. Необхідні фактори росту, хемокіни та природне мікрооточення (рис.3.8).

При порівнянні групи 2 із групою 3, де SFI наприкінці першого тижня складав $-70,43 \pm 2,28$ та $-70,76 \pm 1,39$ відповідно, різниця у показниках виявилася статистично недостовірною ($p \geq 0,05$). Ці результати

опосередковано свідчать про те, що присутність СКНГ у колагеновому матриксі на початкових етапах регенерації не справляє позитивного впливу і не пришвидшує відновлення нервово-м'язового апарату (таблиця 3.3).

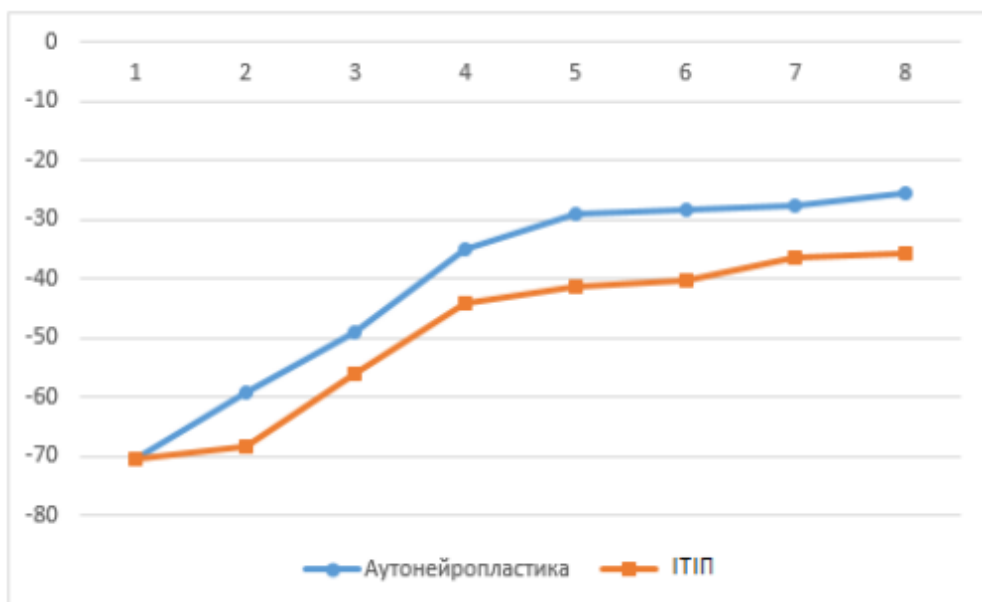


Рис. 3.8. Динаміка SFI у групах 1 та 2 протягом 8 тижнів експерименту

Таблиця 3.3

В кінці другого тижня відмічена статистично достовірна різниця у показниках SFI між групами 2 та 3 на користь останньої

Тиждень	2	3	p-value
2	-68,19±1,61	-55,52±1,28	0,000028
3	-56,19±2,03	-45,00±1,88	0,001129
4	-44,00±1,77	-32,27±1,13	0,000057
5	-41,25±2,56	-30,31±0,72	0,001948
6	-40,37±2,08	-30,24±0,79	0,007362
7	-36,34±1,58	-29,72±0,73	0,001948
8	-35,87±1,75	-25,07±0,79	0,000939

Такі дані (таблиця 3.4) опосередковано свідчать про позитивний вплив СКНГ на регенерацію ПН. Їх присутність ймовірно дозволяє створити більшу

відповідність природнього мікрооточення для регенеруючих аксонів, забезпечивши “функціоналізацію” колагенового матриксу, який в даному випадку є не просто механічною опорою для направленого росту аксонів, а виступає в якості біологічно активного субстрату (рис.3.9).

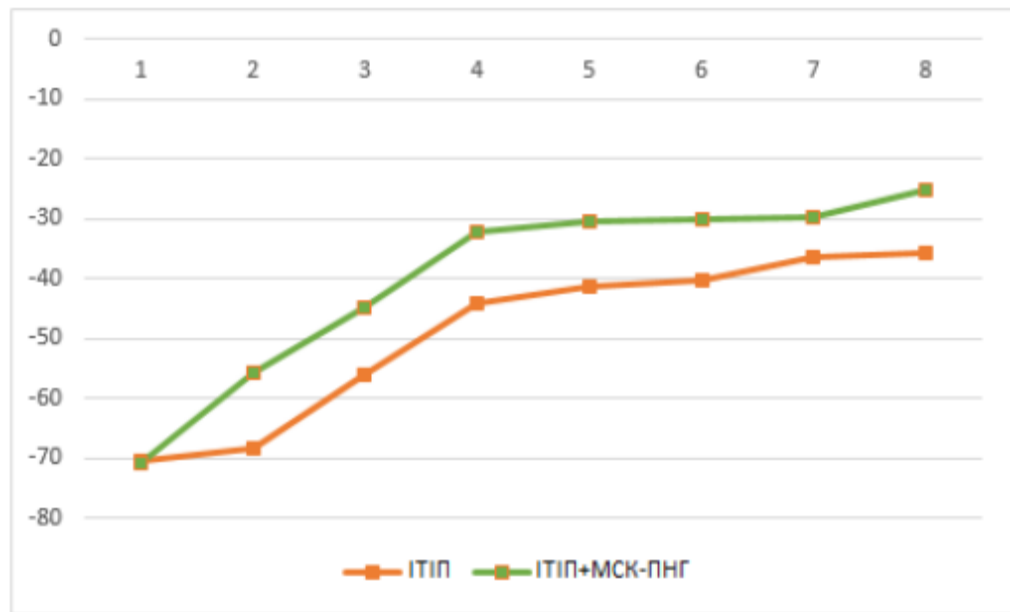


Рис. 3.9. Динаміка SFI у групах 2 та 3 протягом 8 тижнів експерименту

Таблиця 3.4

Порівнюючи групи 1 та 3 на всіх часових проміжках статистично достовірної різниці SFI не спостерігається

Тиждень	Група 1	Група 3	p-value
1	-70,31±2,58	-70,76±1,39	0,878579
2	-59,26±1,75	-55,52±1,28	0,052121
3	-48,96±2,41	-45,00±1,88	0,132144
4	-34,98±1,41	-32,27±1,13	0,143726
5	-28,87±1,55	-30,31±0,72	0,685444
6	-28,50±1,42	-30,24±0,79	0,602525
7	-27,68±1,40	-29,72±0,73	0,524450
8	-25,52±1,16	-25,07±0,79	0,772338

Такі дані (рис.3.10) опосередковано свідчать про позитивний вплив СКНГ на регенерацію ПН, що відображається у відновленні функції ходи у тварин в групі 3, яка аналогічна такій при виконанні АНП у групі 1 [153].

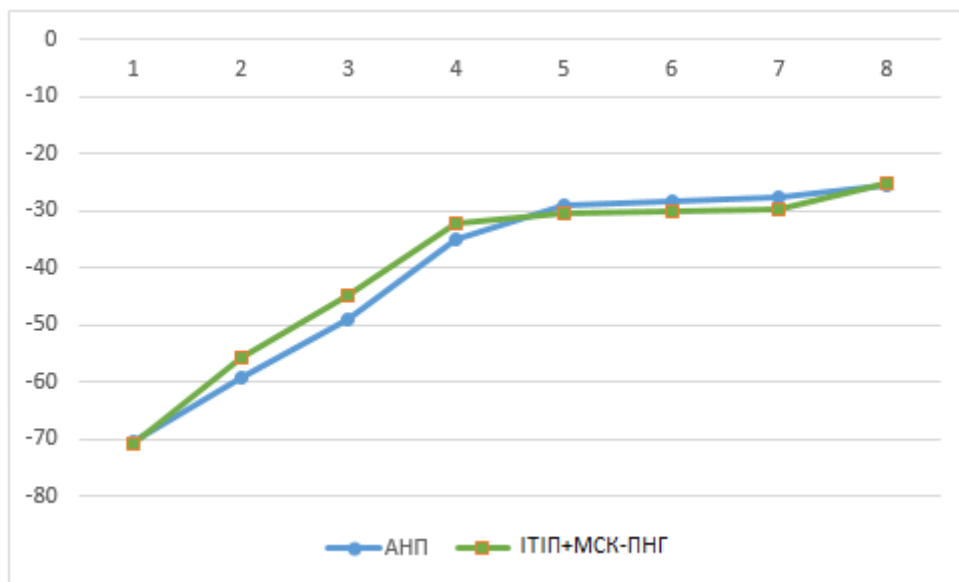


Рис. 3.10. Динаміка SFI у групах 1 та 3 протягом 8 тижнів експерименту

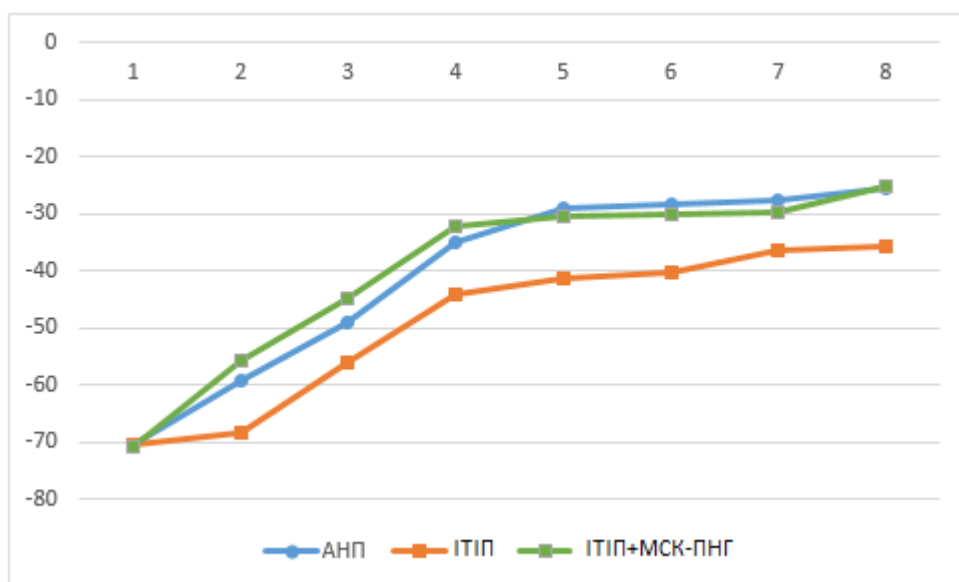


Рис. 3.11. Динаміка SFI у групах 1, 2 та 3 протягом 8 тижнів експерименту

Отже, дані функціонального тесту (рис.3.11) дозволяють зробити висновки:

1) Імплантація тканинно-інженерного матрикса без СКНГ не здатна забезпечити повноцінний субстрат для відновлення і супроводжується гіршим результатом ніж АНП.

2) Використання тканинно-інженерного матрикса сумісно з СКНГ дозволяє отримати результати тотожні АНП, тому можна стверджувати, що СКНГ мають позитивний вплив на функціональне відновлення СН щура у експерименті.

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ВІДНОВЛЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА ПІД ВПЛИВОМ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ ЗА ДАНИМИ ЕЛЕКТРОНЕЙРОМІОГРАФІЇ

Електрофізіологічні показники відновлення функції нервово-м'язового апарату в групах аутонейропластики (таблиця 4.1), імплантації тканинно-інженерного матрикса (таблиця 4.2) та імплантації тканинно-інженерного матрикса із вмістом стовбурових клітин нервового гребеня (таблиця 4.3) закономірно відображають стадійність процесів регенерації ПН

Таблиця 4.1

Електрофізіологічні показники відновлення функції нервово-м'язового апарату в групі аутонейропластики (права кінцівка-контроль, ліва-експеримент)

	ПРАВА		ЛІВА	
АНП				
4 тижні				
	А, мВ	t, мс	А, мВ	t, мс
1	14	0,6	3,14	1,5
2	16,4	0,5	4,15	1,5
3	21,5	1,5	1,26	1,5
4	12	1,4	2,15	0,6
5	11,75	0,75	3,16	0,72
6	30	1,5	3,85	1,5
7	10	1,5	5,4	1,5
Ср.	16,52	1,11	3,30	1,26
±	2,67	0,18	0,51	0,16

Продовж. табл. 4.1

	ПРАВА		ЛІВА	
АНП				
8 тижнів				
	А, мВ	t, мс	А, мВ	t, мс
1	12	1,6	3,86	1,5
2	29	1,1	2,25	0,96
3	30	1,35	2,47	1,5
4	15	0,9	2,59	1,36
5	10,5	1,5	4,67	1,5
6	23	1,2	5,71	0,88
7	22,5	1,1	6,84	0,3
Ср.	20,29	1,25	4,06	1,14
±	2,99	0,09	0,67	0,17

Після травми ПН, аксони, що регенерують, ростуть із проксимального відрізка в дистальному напрямку до місця ушкодження нерва.

Таблиця 4.2

Електрофізіологічні показники відновлення функції нервово-м'язового апарату в групі імплантації тканинно-інженерного матрикса (права кінцівка-контроль, ліва-експеримент)

	ПРАВА		ЛІВА	
Імплантація колагенового матриксу				
4 тижні				
	А, мВ	t, мс		А, мВ
1	12,5	0,75	1	12,5
2	8,7	1,3	2	8,7
3	21	0,9	3	21
4	26	1,2	4	26

Продовж. табл. 4.2

	ПРАВА		ЛІВА	
Імплантація колагенового матриксу				
4 тижні				
	А, мВ	t, мс		А, мВ
5	20	1,3	5	20
6	15,5	1,1	6	15,5
7	12	1,2	7	12
Ср.	16,53	1,11	Ср.	16,53
±	2,29	0,08	±	2,29
8 тижнів				
	А, мВ	t, мс		А, мВ
1	12	1,5	1	12
2	19	1,5	2	19
3	23	1,35	3	23
4	15	0,9	4	15
5	8,5	1,5	5	8,5
6	17,5	1,2	6	17,5
7	14,5	1,5	7	14,5
8	9	1,3	8	9
Ср.	14,81	1,34	Ср.	14,81
±	1,76	0,08	±	1,76

Після перетину нерва цей латентний період триває близько 20–36 годин. У цей же період на кінцях ушкодженого нерва починається проліферація шванівських клітин, які утворюють “бюнгнерівські стрічки”. Середня швидкість росту аксонів у ссавців складає від 1 до 3 мм на добу [154].

Таблиця 4.3

Електрофізіологічні показники відновлення функції нервово-м'язового апарату в групі імплантації тканинно-інженерного матрикса+СКНГ (права кінцівка-контроль, ліва-експеримент)

	ПРАВА		ЛІВА	
Імплантація тканинно-інженерного матрикса+СКНГ				
4 тижні				
	А, мВ	t, мс	А, мВ	t, мс
1	10	1,5	2,46	3,65
2	19	1,5	1,86	1,65
3	25	1,35	1,56	1,5
4	15	0,9	1,93	1,7
5	7,5	0,7	1,99	1,5
6	19	1,2	2,36	1,5
7	14,5	1,5	2,64	1,5
8	7,5	1,3	3,39	1,85
Ср.	14,69	1,24	2,27	1,86
±	2,19	0,11	0,20	0,26
8 тижнів				
	А, мВ	t, мс	А, мВ	t, мс
1	12	1,6	2,98	1,5
2	19	1,1	2,47	0,4
3	23	1,35	1,55	6,3
4	15	0,9	2,11	1,5
5	8,5	0,7	3,5	1,65
6	17,5	1,3	3,64	1,85
7	14,5	1,4	4,94	1,5
8	9	1,3	2,13	0,8
Ср.	14,81	1,21	2,92	1,94
±	1,76	0,10	0,38	0,65

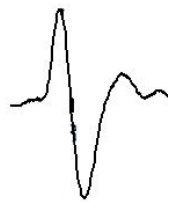
Швидкість росту аксонів сповільнюється зі збільшенням їхньої довжини. Основною перешкодою для росту аксонів є зона рубця між відрізками зшитого нерва.

Першою ознакою дегенерації нерва є відсутність електрозбудливості нижче рівня ушкодження. Відразу після повного ушкодження ПН перестають реєструватися потенціал дії нерва та м'язова відповідь при стимуляції проксимальніше місця ушкодження, але дистальна ділянка нерва зберігає свою електрозбудливість ще протягом 3–5 діб з поступовим її зниженням, після чого нерв стає незбудливим.

Після відновлення цілості нервового стовбура, розпочинається регенераційний процес, проте показники ЕНМГ ніколи не досягають нормальних значень після завершення регенерації (таблиця 4.4).

Таблиця 4.4

Типові криві М-відповіді у групах експериментальних тварин

Методика відновлення ПН	4 тижні	8 тижнів
АНП СН (n=14) (експериментальна група)		
Тубаж дефекту СН тканинно-інженерним матриксом (n=15) (експериментальна група)		
Пластика дефекту СН тканинно-інженерним матриксом із СКНГ (n=16) (експериментальна група)		
Псевдооперовані (n=7) (контрольна група)		

У 4 групі (псевдооперовані тварини), яка була контрольною, Амв дорівнювала $10,06 \pm 1,03 \text{ мВ}$, ЛПмв дорівнювала $0,85 \pm 0,43 \text{ мс}$ (рис.4.1).

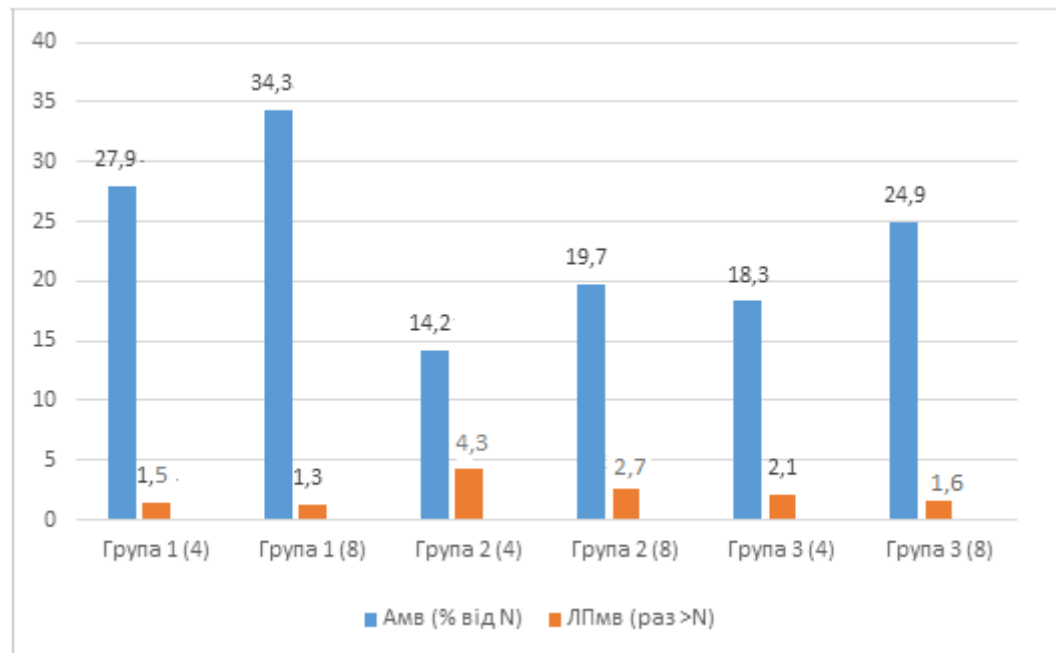


Рис. 4.1. Амплітуда М-відповіді (Амв), латентний період М-відповіді (ЛПмв) через 4 тижні та 8 тижнів

У групі 1 у порівнянні із групою псевдооперованих тварин через 4 тижні спостерігалися подібні криві М-відповіді, проте амплітуда М-відповіді була значно нижчою. У групі 1 через 4 тижні Амв дорівнювала $3,3 \pm 0,51 \text{ мВ}$ і складала 27,9% від норми. ЛПмв дорівнювала $1,26 \pm 0,16 \text{ мс}$ і була у 1,48 разів вище норми. Лише Амв паретичної кінцівки достовірно ($p=0,018$) поступалась значенням інтактної кінцівки ($3,3 \pm 0,51 \text{ мВ}$ проти $16,5 \pm 2,3 \text{ мВ}$).

У групі 1 через 8 тижнів Амв дорівнювала $4,06 \pm 0,64 \text{ мВ}$ і складала 34,3% від норми. ЛПмв дорівнював $1,14 \pm 0,17 \text{ мс}$ і був у 1,34 разів вище норми.

Різниця між показниками Амв та ЛПмв у групах 1 через 4 тижні та через 8 тижнів є статистично недостовірною, що говорить про відсутність змін ключових параметрів ЕНМГ в динаміці ($p=0,44$), ($p=0,52$), ($p=1,00$) відповідно (рис.4.2).

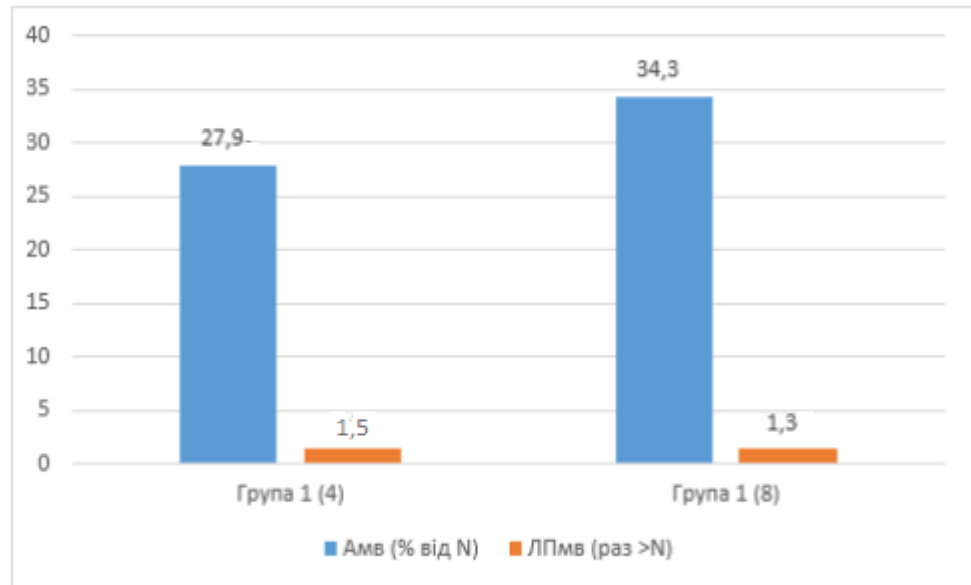


Рис. 4.2. Амплітуда М-відповіді (Амв), латентний період М-відповіді (ЛПмв) через 4 тижні та 8 тижнів у групі АНП СН

Дещо нижчі показники відновлення функції нерва за даними ЕНМГ отримані у групі пластики дефекту СН щура тканинно-інженерним матриксом, заповненим фібриновим гелем.

У групі 2 через 4 тижні Амв дорівнювала $0,87 \pm 0,23$ мВ і складала 14,2% від норми. ЛПмв дорівнював $4,09 \pm 1,97$ мс і був у 4,25 разів вище норми.

У групі 2 через 8 тижнів Амв дорівнювала $1,40 \pm 0,34$ мВ і складала 19,7% від норми. ЛПмв дорівнював $2,50 \pm 0,64$ мс і був у 2,67 разів вище норми.

Цифрові значення Амв у групі 2 в динаміці збільшуються, проте ця різниця є статистично недостовірною ($p=0,22$), ЛПмв знизилася в динаміці з 4,25 до 2,67 (разів більше норми), проте різниця між ними також статистично недостовірна ($p=0,36$). У 2 на четвертому тижні експерименту статистично значущу перевагу значень інтактної кінцівки спостерігали для Амв ($16,5 \pm 2,3$ мВ проти $0,9 \pm 0,2$ мВ; $p=0,018$) (рис.4.3).

Результати показують, що за умов пластики дефекту СН тканинно-інженерним матриксом, процеси відновлення досягають максимуму

протягом перших 4 тижнів, а після вказаного терміну відновлення практично не відбувається. Подібна динаміка спостерігається і у групі АНП, проте цифрові значення достовірно вищі. Отже імплантація тканинно-інженерного матрикса без клітинного компоненту, не забезпечує оптимального проростання волокон. При цьому протягом другого місяця спостереження у групі 2 наявне достовірне ($p=0,034$ та $p=0,04$) збільшення латентного періоду, що опосередковано свідчить про зменшення швидкості проведення збудження по СН інтактної кінцівки. Такі результати, ймовірно, свідчать про компенсаторне сповільнення рухів інтактної кінцівки під сповільнену рухову активність паретичної, для того, щоб не порушувати руховий патерн. У випадку АНП такого явища не спостерігається, оскільки нема такого вираженого сповільнення швидкості проведення збудження по нерву.

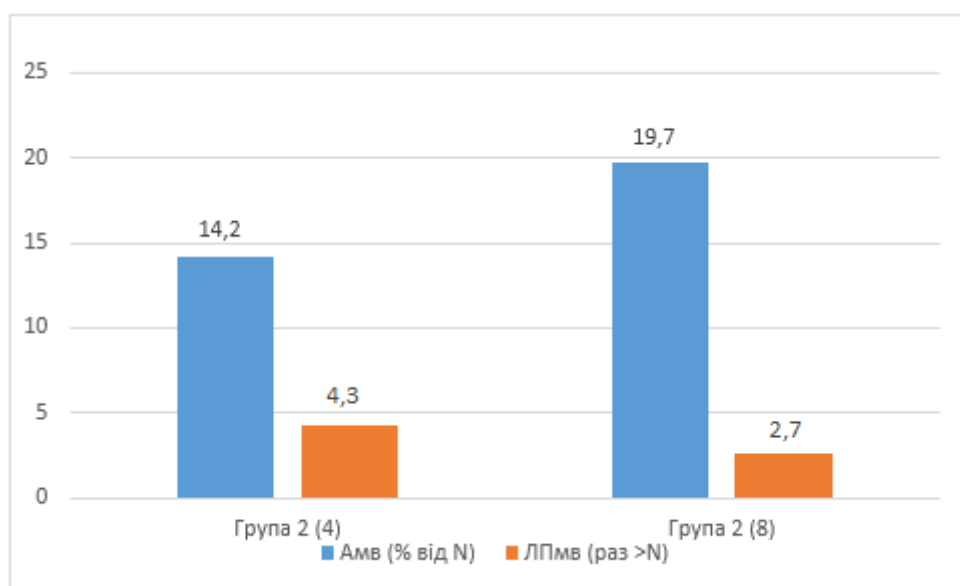


Рис. 4.3. Амплітуда М-відповіді (Амв) та латентний період М-відповіді (ЛПмв) через 4 тижні та 8 тижнів у групі пластики СН тканинно-інженерним матриксом

У групі 3 отримано такі результати в динаміці: через 4 тижні Амв дорівнювала $2,27 \pm 0,20$ мВ і складала 18,3% від норми. ЛПмв дорівнював $1,86 \pm 0,26$ мс і був у 2,1 разів вище норми.

У групі 3 через 8 тижнів Амв дорівнювала $2,92 \pm 0,38$ мВ і складала 24,9% від норми. ЛПмв дорівнював $1,94 \pm 0,65$ мс і був у 1,56 разів вище норми.

Амв у групі 3 в динаміці зростає із 18,3% до 24,9% порівняно з контролем, але була статистично недостовірною ($p=0,18$). ЛПмв зменшилася із 2,1 до 1,56 (разів більше контролю), різниця статистично недостовірна ($p=0,47$).

У групі 3 на четвертому тижні експерименту статистично значущу ($p=0,018$) перевагу значень інтактної кінцівки спостерігали для Амв ($14,7 \pm 2,2$ мВ проти $2,3 \pm 0,2$ мВ; $p=0,018$) (рис.4.4).

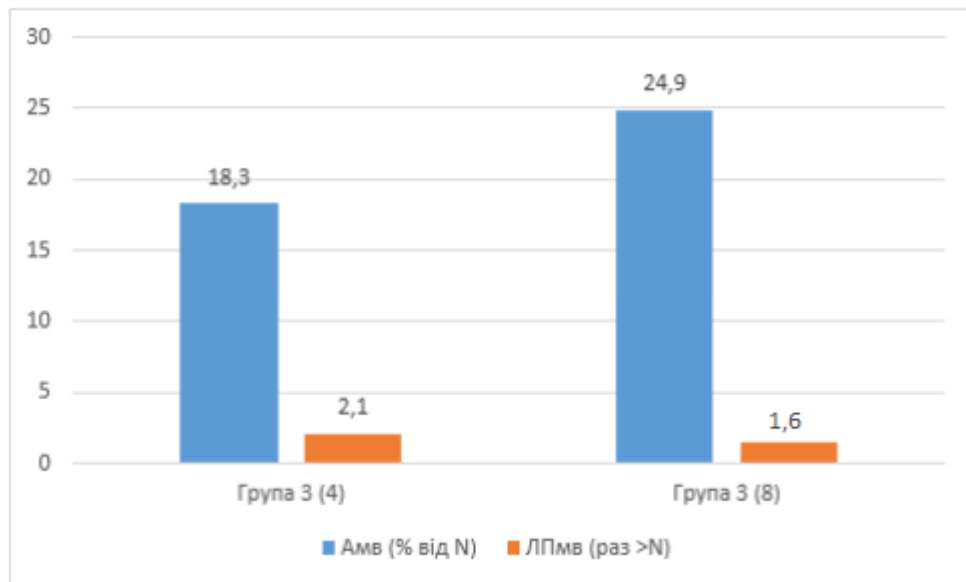


Рис. 4.4. Амплітуда М-відповіді (Амв) та латентний період М-відповіді (ЛПмв) через 4 тижні та 8 тижнів у групі пластики СН тканинно-інженерним матриксом з СКНГ

Динаміка ключових показників ЕНМГ у групах 1 через 4 та 8 тижнів, подібна до динаміки у групах 2 через 4 та 8 тижнів і 3 через 4 та 8 тижнів. Ці дані говорять про те, що СКНГ не продовжують регенераційний процес в динаміці і основний ефект від їх трансплантації (за даними ЕНМГ) спостерігається протягом перших 4 тижнів.

При порівнянні груп 1 через 4 тижні та 2 через 4 тижні гірші результати відновлення отримано у групі 2. Показник Амв у групі 1 був $3,30 \pm 0,51$ мВ і складав 27,9%, а у групі 2 $0,87 \pm 0,23$ мВ і складав 14,24% від контрольних показників. Різниця статистично достовірна, ($p=0,005$). ЛПмв у групі 1 через 4 тижні була $1,26 \pm 0,16$ мс, що у 1,48 рази більше контролю, а у групі 2 $4,09 \pm 1,97$ мс, що у 4,25 рази більше контролю, різниця статистично достовірна ($p=0,009$).

Результати говорять про те, що АНП дозволяє досягти кращого відновлення ніж пластика СН колагеновим матриксом протягом перших 4 тижнів (рис.4.5).

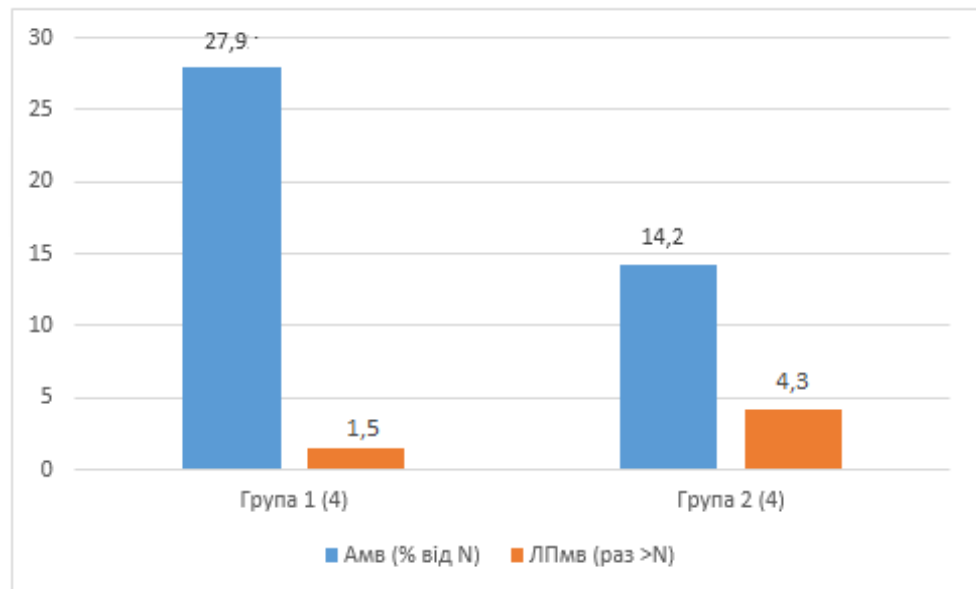


Рис. 4.5. Амплітуда М-відповіді (Амв) та латентний період М-відповіді (ЛПмв) через 4 тижні у групах АНП СН 1(4) та пластики СН тканинно-інженерним матриксом 2(4)

При порівнянні груп 1 та 3, вищі показники Амв отримані у групі АНП 1(4) - $3,30 \pm 0,51$ мВ, що складає 27,92% від контрольного показника. У групі 3 $2,27 \pm 0,20$ мВ, що складає 18,3% порівняно з контролем. Проте різниця між ними є статистично недостовірною ($p=0,11$).

ЛПмв у 1 через 4 тижні була $1,26 \pm 0,16$ мс, що у 1,48 разу, а у 3 через 4 тижні $1,86 \pm 0,26$ мс, що у 2,1 разу більше показника у контрольній групі. Різниця між показниками статистично достовірна ($p=0,02$).

При порівнянні груп 2 та 3 через 4 тижні, вищі показники відновлення отримані у групі 3, і різниця між ними є статистично достовірною ($p=0,002$). Амв була відповідно $0,87 \pm 0,23$ мВ, що складає 14,2% від контрольного показника і $2,27 \pm 0,20$, що складає 18,3% від контрольних показників. ЛПмв у групі 2 через 4 тижні була $4,09 \pm 1,97$ мс, що в 4,8 разу більше контролю, а у групі 3 $1,86 \pm 0,26$ мс, що в 2,1 разу більше контрольних показників. Різниця статистично достовірна $U_{\text{емп ЛПмв}} = 7$ ($p=0,002$) (рис.4.6).

При порівнянні значень ЕНМГ-показників досліджуваних груп станом на кінець 4 тижня спостереження достовірних відмінностей щодо інтактної кінцівки не виявлено. Значення Амв у групі 2 через 4 тижні ($0,9 \pm 0,2$ мВ) виявилося достовірно меншим, ніж значення групи 1 ($3,3 \pm 0,5$ мВ; $p=0,006$), групи 3 ($2,3 \pm 0,2$ мВ; $p=0,002$) і групи псевдооперованих тварин ($16,6 \pm 1,4$ мВ; $p=0,006$). Значення Амв у групі 3 через 4 тижні, у свою чергу, були достовірно меншими, ніж значення групи 4 ($p=0,004$).

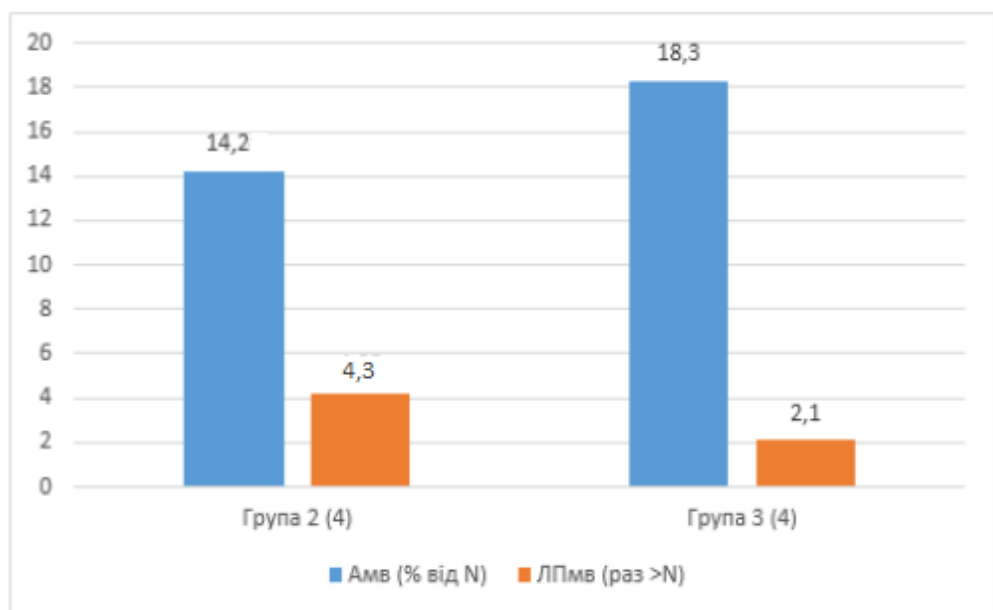


Рис. 4.6. Амплітуда М-відповіді (Амв) та латентний період М-відповіді (ЛПмв) через 4 тижні у групах 2 і 3

Такі результати дозволяють стверджувати, що СКНГ у тканинно-інженерному матриксу чинять позитивний вплив на регенерацію СН, про що свідчать достовірно вищі значення ключових показників ЕНМГ.

Через 8 тижнів у групі 1 де проводилася АНП, показники ЕНМГ були достовірно вищими, ніж у групі 2 (рис.4.7). Амв у групі 1 була $4,06 \pm 0,67$ мВ, що складало 34,3%, а у групі 2 — $1,40 \pm 0,34$ мВ, що складало 19,7% від показників у контрольній групі ($p=0,007$). ЛПмв у групі 1 був $1,14 \pm 0,17$ мс, у 1,37 рази достовірно більше контрольного показника, а у групі 2 був $2,50 \pm 0,64$ мс, у 2,67 рази достовірно більше контролю ($p=0,012$).

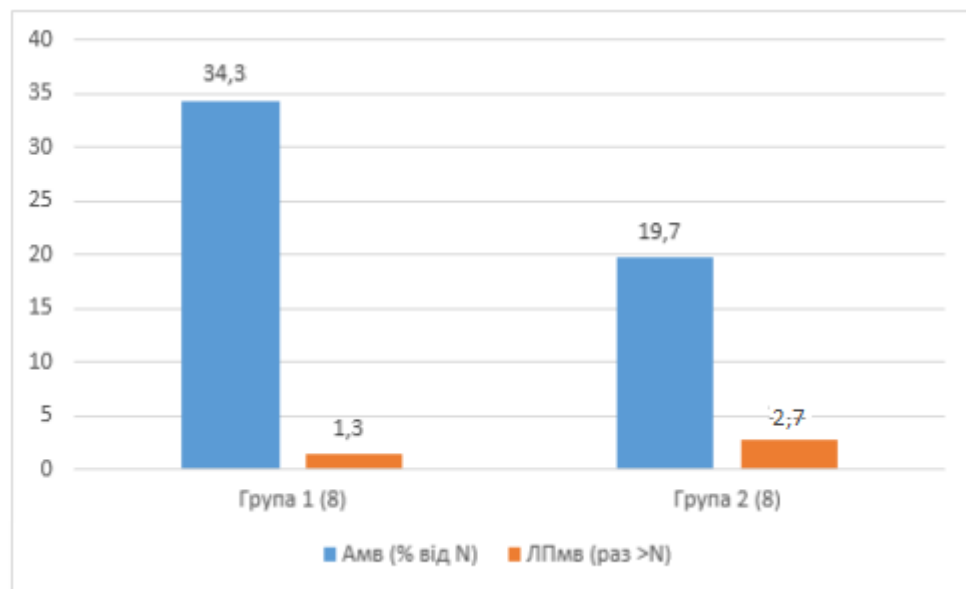


Рис. 4.7. Амплітуда М-відповіді (Амв) та латентний період М-відповіді (ЛПмв) через 8 тижнів у групах 1 та 2

При порівнянні груп 2 та 3, вищі показники відновлення отримані у групі 3 (рис.4.8). Станом на кінець 8 тижня спостереження у групах 1 і 2 картина різниці значень ЕНМГ-показників між інтактною та паретичною кінцівкою аналогічна попередньому терміну спостереження.

Амв у групі 2 складала $1,40 \pm 0,34$ мВ, 19,7% від контролю, а у групі 3 — $2,92 \pm 0,38$ мВ, 24,9% від показника у контрольній групі ($p=0,02$). ЛПмв у

групі 2 була $2,50 \pm 0,64$ мс, у 2,67 рази більша, а у групі 3 $1,94 \pm 0,65$ мс у 1,56 разу більша ніж відповідний показник у контрольній групі ($p=0,43$).

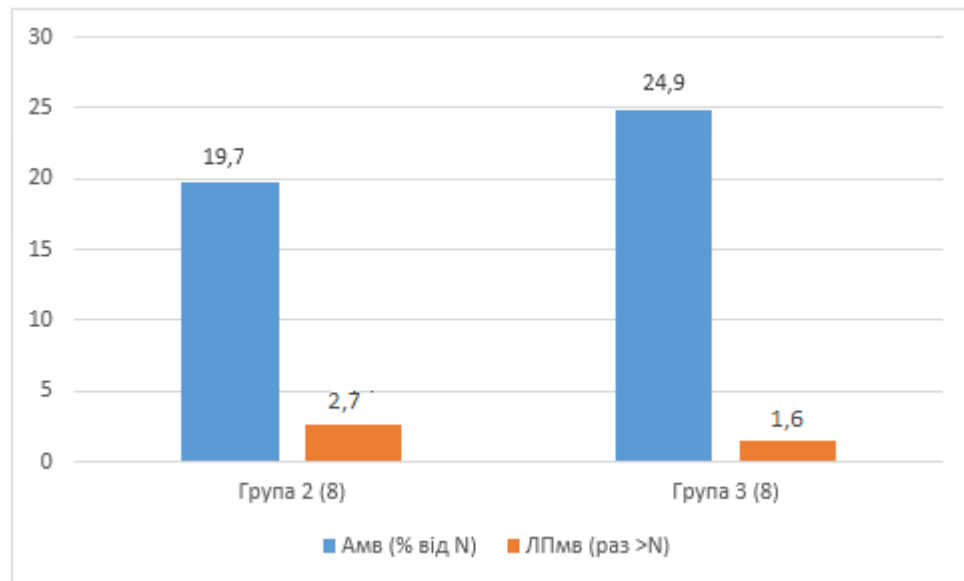


Рис. 4.8. Амплітуда М-відповіді (Амв) та латентний період М-відповіді (ЛПмв) через 8 тижнів у групах 2 та 3

Станом на 8 тиждень спостереження відмічали достовірну перевагу величини Амв паретичної кінцівки тварин групи 1 ($4,1 \pm 0,7$ мВ) лише над показником групи 2 ($1,4 \pm 0,3$ мВ; $p=0,007$). Достовірна різниця виявлена і між значеннями показника групи 2 і 3 ($2,9 \pm 0,4$; $p=0,018$) на користь останньої. Значення Амв паретичної кінцівки груп 1, 2 і 3 достовірно поступались значенню групи псевдооперованих тварин ($22,4 \pm 2,2$ мВ; $p=0,006$, $p=0,004$, $p=0,004$, відповідно). Різниці значень аналогічного показника інтактних кінцівок виявлено не було (рис.4.9).

На цьому ж терміні спостереження ЛПмв у паретичній кінцівці тварин групи 2 ($2,5 \pm 0,6$ мс) відрізнявся від групи 1 ($1,1 \pm 0,2$ мс), ($p=0,012$). Статистично значущу різницю виявляли також при порівнянні тривалості латентного періоду у групах 1 і псевдооперованих тварин (гірша у групі 2 — $2,5 \pm 0,6$ мс, $p=0,045$). Жодних статистично значущих відмінностей між показниками інтактної кінцівки експериментальних груп на зазначеному терміні спостереження не виявлено.

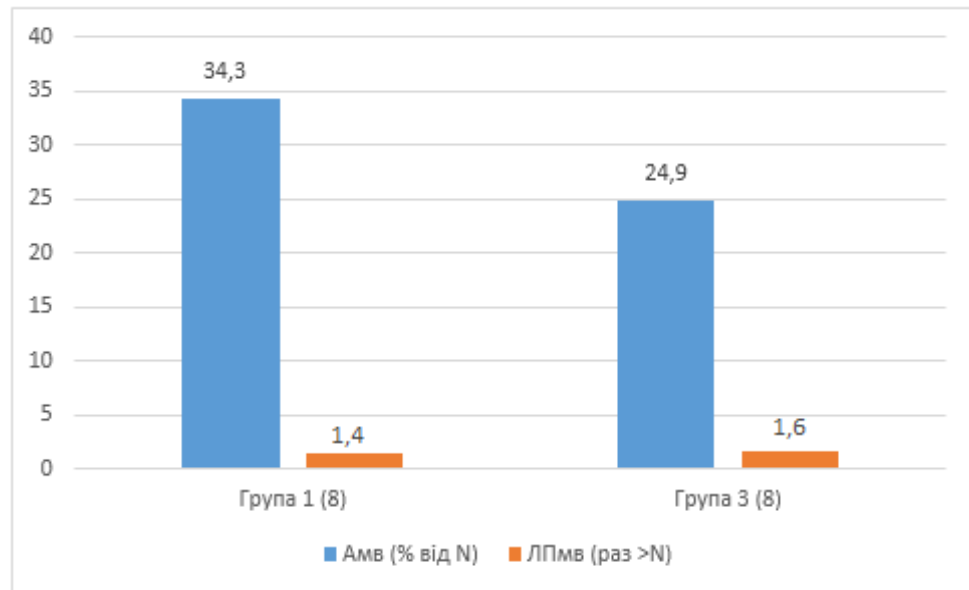


Рис. 4.9. Амплітуда М-відповіді (Амв) та латентний період М-відповіді (ЛПмв) через 8 тижнів у групах 1 і 3

Отже, аналіз результатів ЕНМГ у групах експериментальних тварин в динаміці через 4 та 8 тижнів, а також при порівнянні експериментальних груп між собою на вказаних вище проміжках часу, дозволяє зробити підсумки про позитивний вплив СКНГ на регенерацію ПН. У випадку АНП, попри низькі показники реінервації м'яза, спектр регенеруючих волокон, що забезпечують реінервацію, ймовірно, не відрізняється від наявних у контрлатеральному нерві тієї ж тварини, однак, відрізняється від спектру псевдооперованих тварин. У випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса у поєднанні з СКНГ станом на кінець першого місяця спектр волокон суттєво відрізняється від спектру контрлатерального нерва, однак не відрізняється від спектру нерва псевдооперованих тварин. Протягом до кінця 4 тижня у випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса, асоційованого з СКНГ, має місце результативна реінервація м'яза волокнами великого діаметра, так що станом на 8 тижнів спостереження швидкість проведення збудження, не відрізняється від реєстрованої для інтактної кінцівки, про що можна опосередковано судити за ЛПмв. У випадку ж АНП

зникнення достовірної різниці у показнику ЛПмв у паретичній кінцівці у порівнянні з інтактною кінцівкою та псевдооперованою кінцівкою, яке відмічали станом на 8 тижень, свідчить про більш інтенсивну реінервацію м'яза волокнами меншого діаметру протягом другого місяця регенераційного процесу (знову ж таки опосередковано, згідно даних ЕМНГ).

Отже під час АНП протягом першого місяця спостереження має місце преферентне проростання волокон великого діаметру, відсутнє у випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса, наявне у меншій мірі у випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса, асоційованого з СКНГ. Протягом другого місяця реінервація у випадку АНП здійснюється переважно за рахунок волокон меншого діаметру, у випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса, асоційованого з СКНГ — за рахунок волокон більшого діаметру.

Результат реінервації у випадку АНП та імплантації тканинно-інженерного матрикса у поєднанні з СКНГ за двома оцінюваними ЕМНГ-показниками у цілому рівнозначний, недостовірно відрізняється електрофізіологічним спектром волокон, що реінервували паретичний м'яз (опосередковано за даними ЕМНГ).

Виявлений прямопропорційний зв'язок між кількістю аксонів, що регенерували (опосередковано відображає Амв) і наявністю у тканинно-інженерних матриксах СКНГ. Результати відновлення СН за умов АНП вищі ніж при пластиці дефекту СН тканинно-інженерним матриксом, проте достовірно не відрізняються від результатів, отриманих при пластиці СН тканинно-інженерним матриксом із СКНГ. Можна стверджувати, що саме завдяки позитивному впливу СКНГ на процеси регенерації СН, досягнуто результатів відновлення, які практично не відрізняються від результатів АНП. У той же час результати пластики СН тканинно-інженерним матриксом без СКНГ виявилися гіршими [154].

Підсумовуючи всі дані, наведені вище, можна зробити наступні висновки:

1) СКНГ мають позитивний вплив на регенерацію ПН у експерименті, що підтверджується достовірно кращим відновленням нерва заданими ключових ЕНМГ-показників.

2) СКНГ забезпечують відновлення більшої кількості аксонів (що опосередковано відображає Амв), а відповідно нервово-м'язових зв'язків та волокон, що беруть участь у скороченні м'яза не змінюючи динаміку процесів регенерації у часі.

3) Тканинно-інженерний підхід у пластиці дефекту ПН з використанням колагенових матриксів та СКНГ забезпечує результат, тотожний “золотому стандарту” — аутонейропластиці.

РОЗДІЛ 5

РЕЗУЛЬТАТИ ВІДНОВЛЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА ПІД ВПЛИВОМ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ ЗА ДАНИМИ ІМУНОГІСТОХІМІЧНОГО МЕТОДУ ДОСЛІДЖЕННЯ

У нативному контрольному нерві виявляли β -III-тубулін, який є маркером нейрофібрил та основний білок мієліну (myelin basic protein, MBP), який характерний для мієлінізованих волокон (рис.5.1).

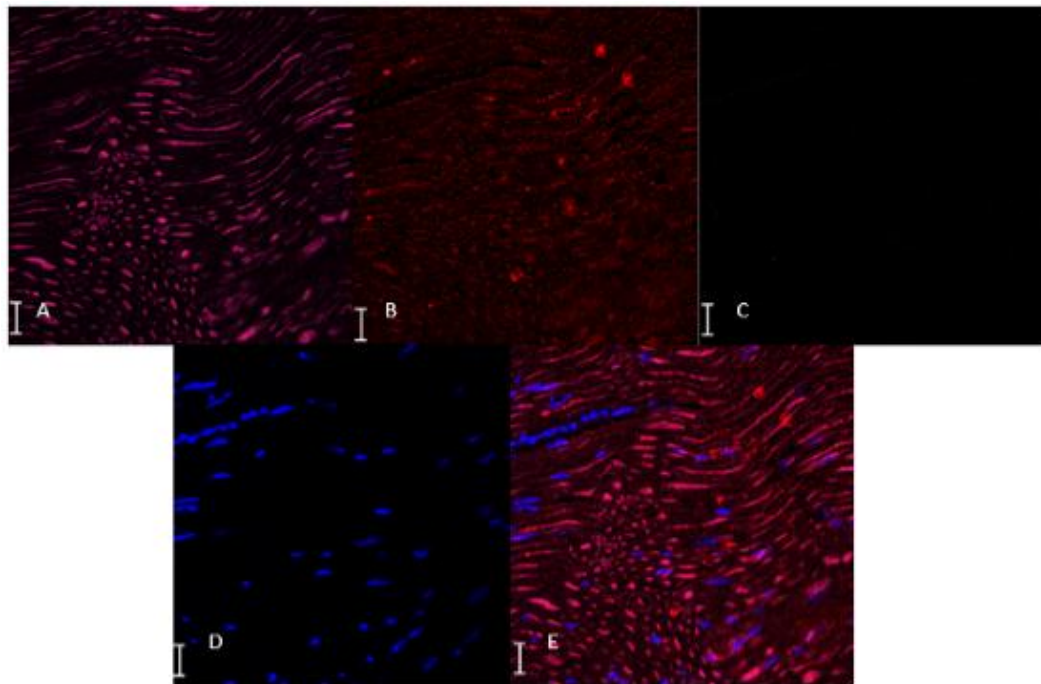


Рис. 5.1. Імуногістохімічний аналіз експресії β -III-тубуліну (А, пурпуровий), основного білка мієліну (MBP, В, червоний колір), GFP (білок зеленої флюоресценції, С, сигнал відсутній), поєднане зображення (Е). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (D, синій колір). Збільшення $\times 200$

На 7 добу експерименту у тканинно-інженерних матриксах з СКНГ виявляли експресію низькоафінного рецептора до нейротрофінів p75, що характерний як для СКНГ, які підтримують функціональну активність і

мультипотентність у тканинно-інженерному матриксі, так і для шванівських клітин, які перебувають на ранніх етапах диференціювання (рис. 5.2). Не виявляли експресії β -III-тубуліну, який є маркером нейрофібрил, що вказує на відсутність проростання нервових волокон у тканинно-інженерному матриксі на 7 добу.

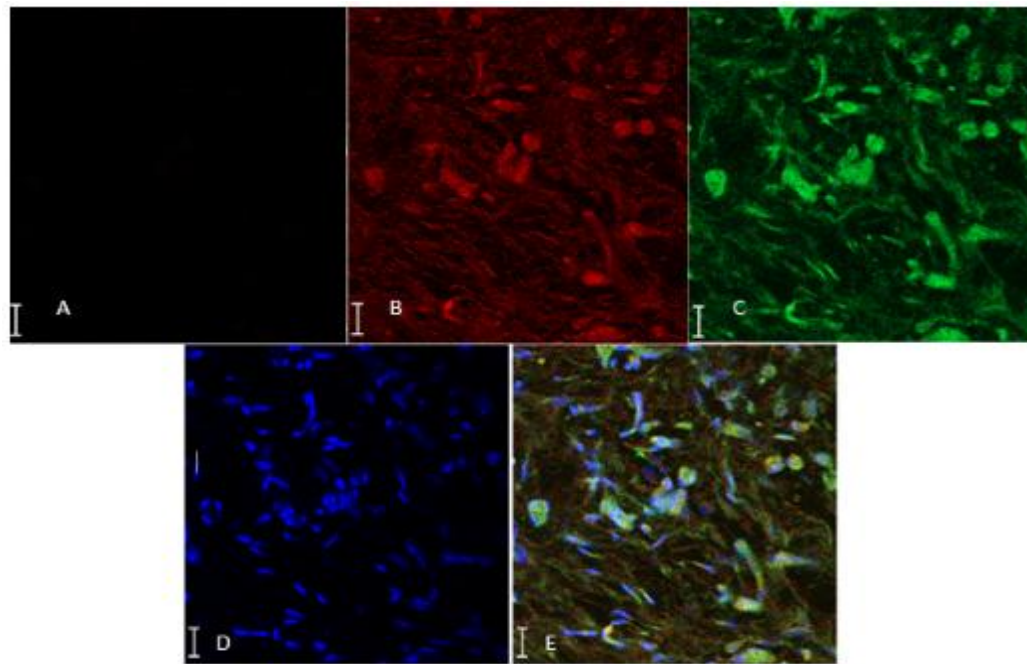


Рис. 5.2. Імуногістохімічний аналіз експресії β -III-тубуліну (А, сигнал відсутній), p75 (В, червоний колір), GFP (білок зеленої флюоресценції, С, зелений колір), поєднане зображення (Е). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (D, синій колір). Збільшення $\times 200$

Експресія білка S100b, що характерна для шванівських клітин, показує, що у тканинно-інженерному матриксі СКНГ набувають шванівського фенотипу (рис. 5.3).

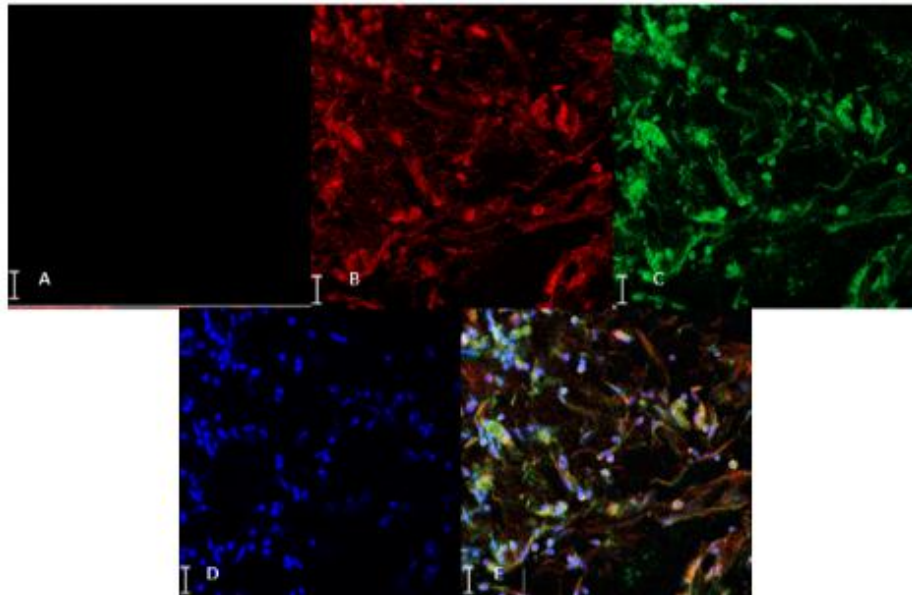


Рис. 5.3. Імуногістохімічний аналіз експресії білка β -III-тубуліну (А, сигнал відсутній), білка S100b (В, червоний колір), GFP (білок зеленої флюоресценції, С, зелений колір), поєднане зображення (Е). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (D, синій колір). Збільшення $\times 200$

На 7 добу у матриксу виявлено дуже слабку експресію основного білка мієліну що свідчить про відсутність проростання аксонів та їх мієлінізації (рис. 5.4).

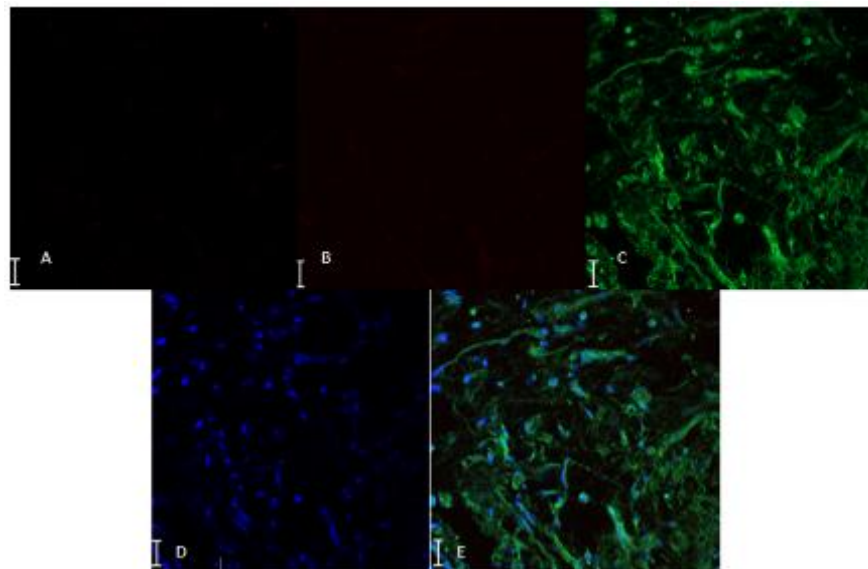


Рис. 5.4. Імуногістохімічний аналіз експресії білка β -III-тубуліну (А, сигнал відсутній), основного білка мієліну (В, червоний колір), GFP (білок зеленої флюоресценції, С, зелений колір), поєднане зображення (Е). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (D, синій колір). Збільшення $\times 200$

Отже, на 7 добу СКНГ підтримують функціональну активність у тканинно-інженерному матриксі, експресують маркери, характерні для клітин, що походять із НГ, про що свідчить експресія p75 та білка S100b.

Проростання нервових волокон на 7 добу у матриксі не виявлено про що свідчить відсутність експресії β -III-тубуліну та МВР.

Через 4 тижні у тканинно-інженерному матриксі зберігалася експресія p75, що вказує на присутність клітин зі шванівським фенотипом, які перебувають на ранніх етапах диференціювання (рис. 5.5).

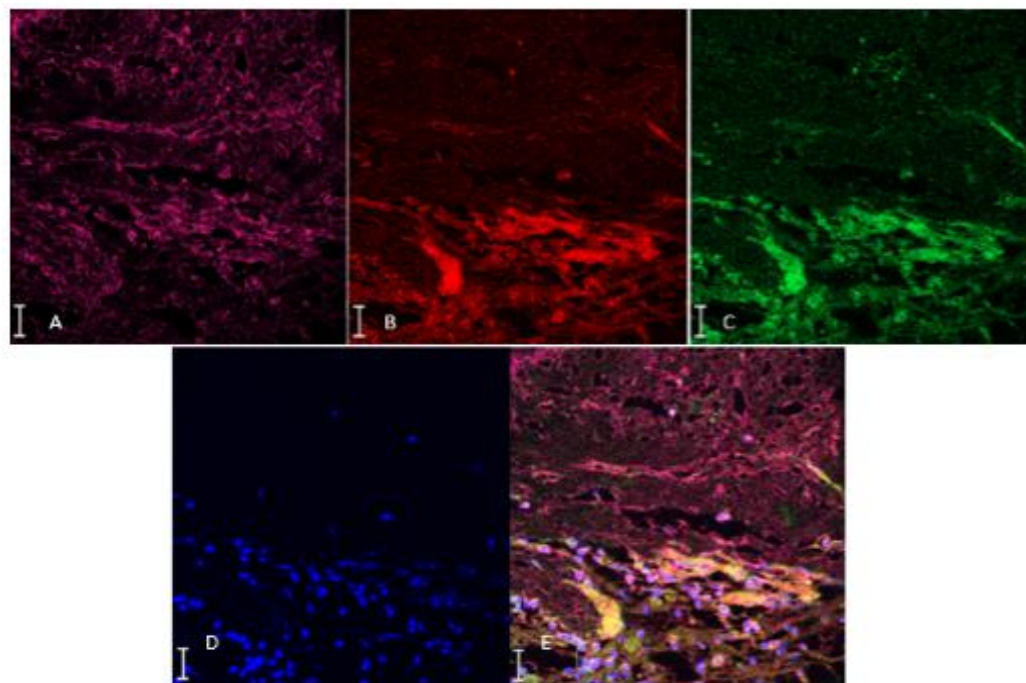


Рис. 5.5. Імуногістохімічний аналіз експресії білка β -III-тубуліну (А, пурпуровий), p75 (В, червоний колір), GFP (білок зеленої флюоресценції, С, зелений колір), поєднане зображення (Е). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (D, синій колір). Збільшення $\times 200$

Також через 4 тижні у тканинно-інженерному матриксі виявлялася експресія білків S100b, β -III-тубуліну та MBP, що свідчить про проростання нервових волокон та їх мієлінізацію (рис. 5.6, рис. 5.7).

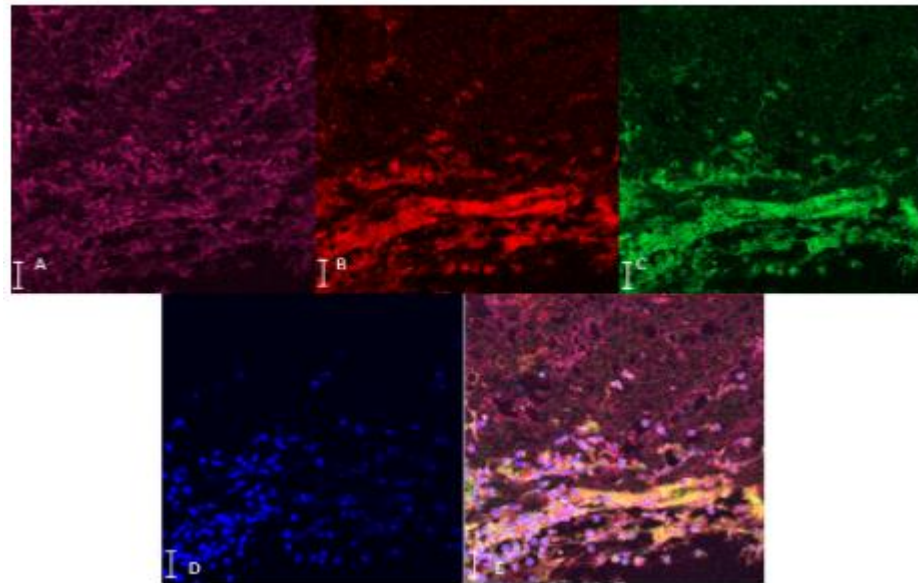


Рис. 5.6. Імуногістохімічний аналіз експресії білків β -III-тубуліну (А, пурпуровий) та S100b (В, червоний колір), GFP (білок зеленої флюоресценції, С, зелений колір), поєднане зображення (Е). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (D, синій колір). Збільшення $\times 200$

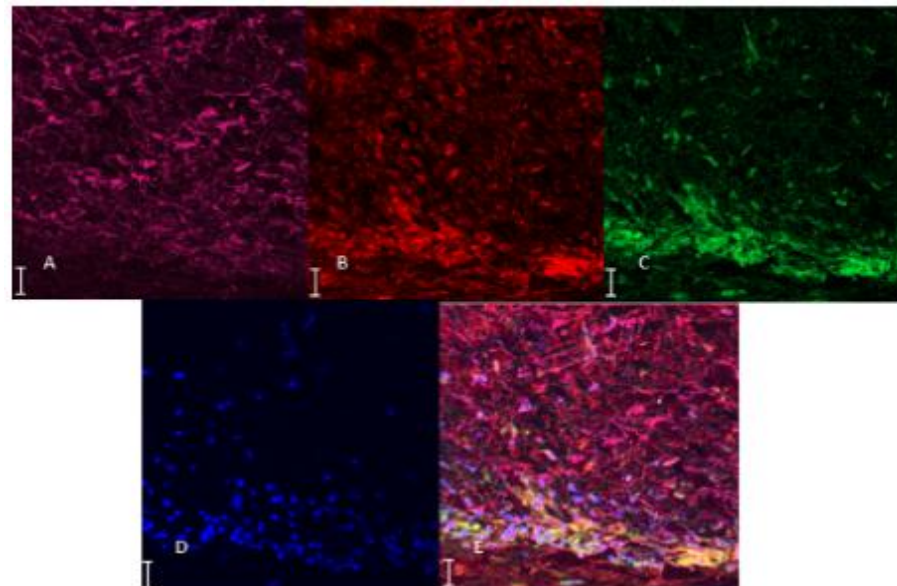


Рис. 5.7. Імуногістохімічний аналіз експресії білків β -III-тубуліну (А, пурпуровий) та MBP (В, червоний колір), GFP (білок зеленої флюоресценції, С, зелений колір), поєднане зображення (Е). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (D, синій колір). Збільшення $\times 200$

Експресія GFP дозволяє стверджувати, що безпосередню участь у цих процесах беруть СКНГ, імплантовані у складі тканинно-інженерного матрикса.

Через 8 тижнів експресія p75 у тканинно-інженерному матриксу практично відсутня, що опосередковано свідчить на користь диференціювання СКНГ у клітини зі “шванівським” фенотипом (рис. 5.8).

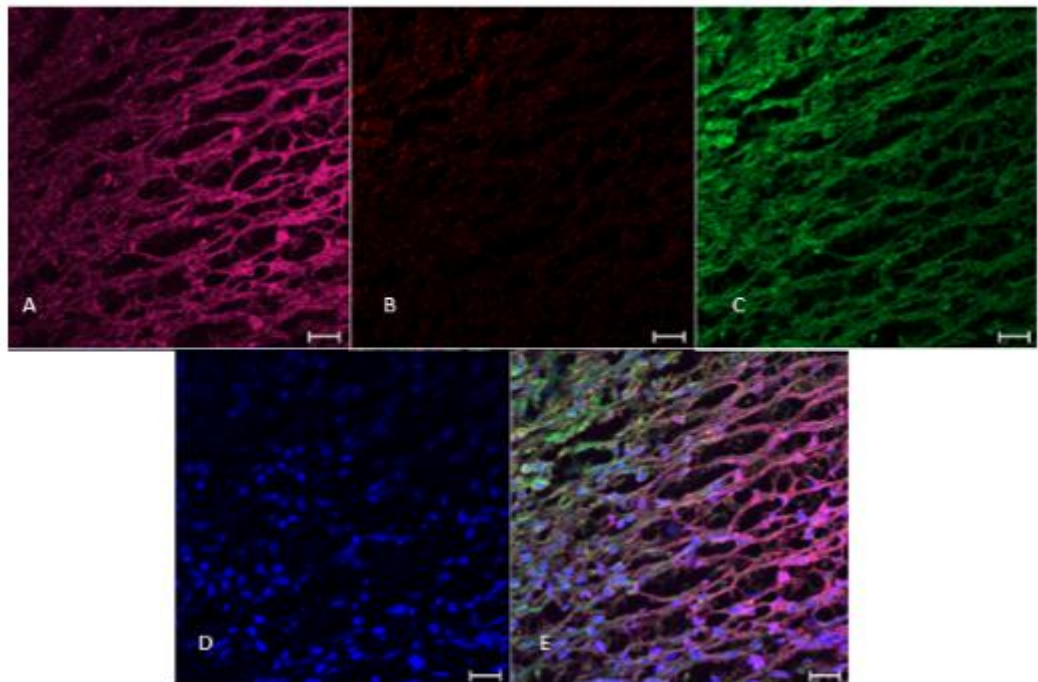


Рис. 5.8. Імуногістохімічний аналіз експресії білка β -III-тубуліну (А, пурпуровий), p75 (В, червоний колір), GFP (білок зеленої флюоресценції, С, зелений колір), поєднане зображення (Е). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (D, синій колір). Збільшення $\times 200$

Через 8 тижнів, також виявлялася чітка експресія β -III-тубуліну, S100b та MBP (рис. 5.9, рис. 5.10).

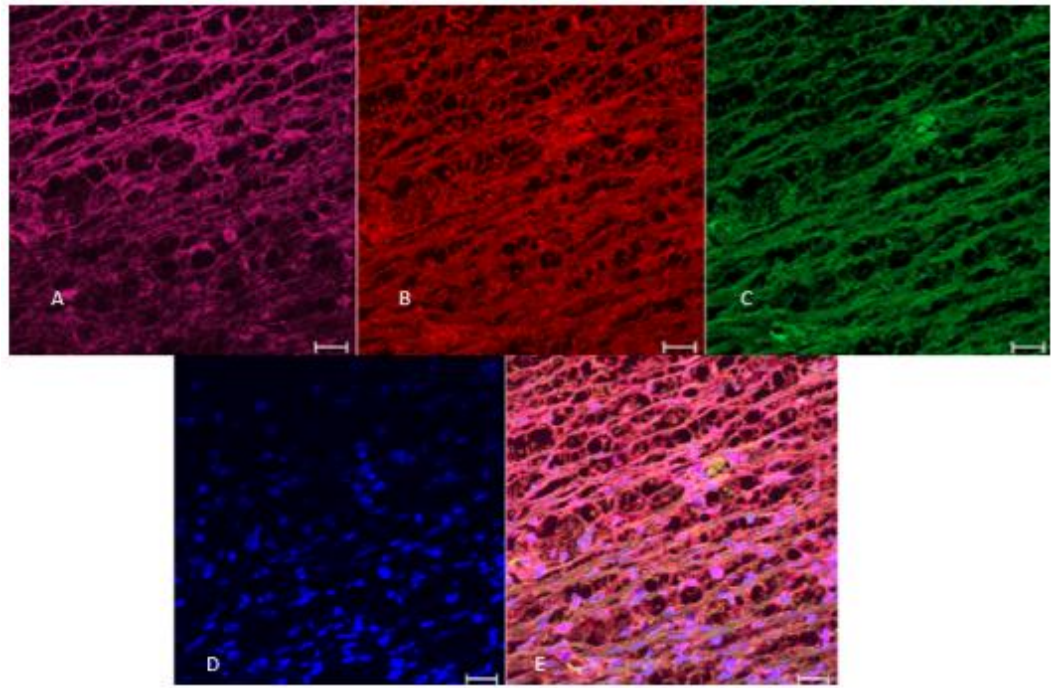


Рис. 5.9. Імуногістохімічний аналіз експресії білків β -III-тубуліну (А, пурпуровий) та S100b (В, червоний колір), GFP (білок зеленої флюоресценції, С, зелений колір), поєднане зображення (Е). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (D, синій колір). Збільшення $\times 200$

У порівнянні із 4 тижнем, на 8 тиждень клітинна організація у тканинно-інженерних матриксах була впорядкованою. Присутність експресії білків S100b, β -III-тубуліну та MBP, свідчить про дозрівання СКНГ у клітині зі “шванівським” фенотипом. У порівнянні з четвертим тижнем експресія фактора p75 не визначається.

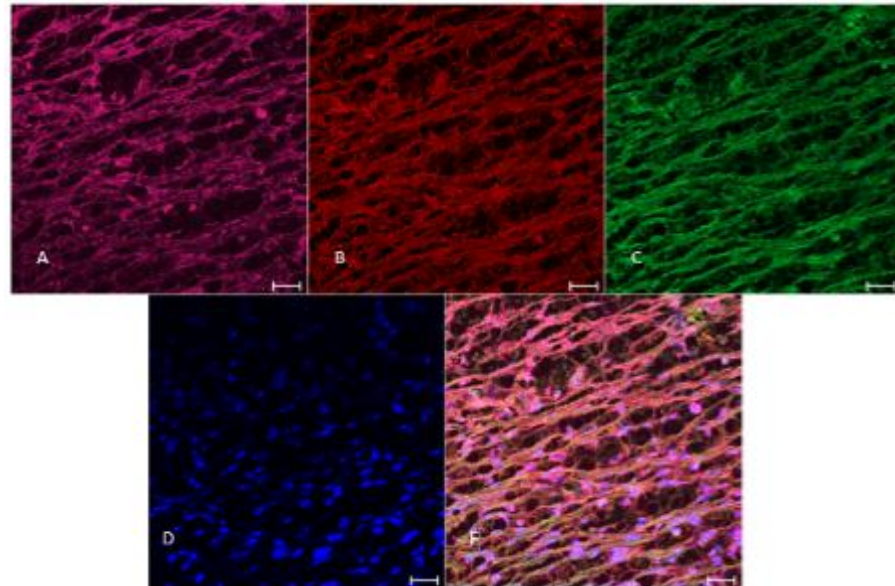


Рис. 5.10. Імуногістохімічний аналіз експресії білків β -III-тубуліну (А, пурпуровий) та MBP (В, червоний колір), GFP (білок зеленої флюоресценції, С, зелений колір), поєднане зображення (Е). Ядра клітин забарвлені Hoechst 33342 (D, синій колір). Збільшення $\times 200$

Отже, через 7 днів СКНГ у матриксі зберігають функціональну активність та фенотипові властивості.

Через 4 тижні відмічається початкова стадія диференціювання СКНГ у клітини із “шванівським” фенотипом, які все ще є незрілими. Виявляється проростання нервових волокон, що є невідпорядкованими та направленість їх росту із ознаками мієлінізації.

Через 8 тижнів у тканинно-інженерному матриксу відмічається впорядкована організація мієлінізованих нервових волокон. СКНГ диференціюються у клітини зі “шванівським” фенотипом.

СКНГ імплантовані у складі тканинно-інженерного матрикса для відновлення ПН при його травматичному ушкодженні, мають стимулюючий вплив на регенерацію нерва, переважно за рахунок їх диференціювання у клітини зі “шванівським” фенотипом, що здатні мієлінізувати нервові волокна.

РОЗДІЛ 6

РЕЗУЛЬТАТИ ВІДНОВЛЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА ПІД ВПЛИВОМ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ ЗА ДАНИМИ ГІСТОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

6.1. Результати гістологічного дослідження тканинно-інженерних матриксів із вмістом стовбурових клітин нервового гребеня методом імпрегнації сріблом

На повздовжніх зрізах нативні нервові волокна, що складають СН, утворюють звивисті цілісні тяжі з прошарками пухкого волокнистого сполучнотканного матриксу (рис. 6.1.1). Товщина волокон контрольного нерва складала $0,0061 \pm 0,004$ мм. Щільність розташування аксонів складала 5362 ± 432 на 1 мм^2 .



Рис. 6.1.1. Гістологічне дослідження структури контрольного СН. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Збільшення $\times 200$

Після перетину СН і наступної АНП через 4 тижні на тлі посиленого розростання волокнистої сполучної тканини спостерігалось формування коротких тяжів нервових волокон, а також упорядковане їх розміщення. Крім того, у регенераті формувалися тонкі перемички між ділянками тяжів нервових волокон, що призводило до утворення неперервного зв'язку між

регенеруючими тяжами нервових волокон на різних рівнях зони пошкодження СН (рис. 6.1.2). Товщина волокон складала $0,002 \pm 0,0003$. Щільність розташування аксонів складала $3566,8 \pm 598$ на 1 мм^2 .

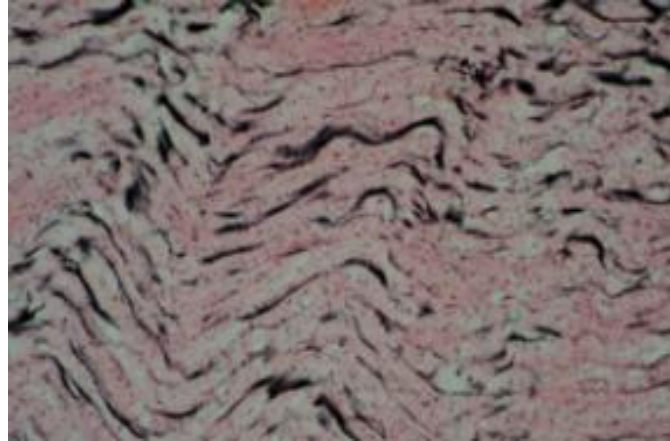


Рис. 6.1.2. Гістологічне дослідження структури нерва, відновленого шляхом АНП, на 4 тиждень. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Збільшення $\times 200$

При застосуванні тканинно-інженерного матрикса із фібриновим гелем для заміщення дефекту, СН через 4 тижні відмічалось формування незначної кількості тонких, хаотично розташованих нервових волокон і слабо виражене формування волокнистої пухкої сполучної тканини (рис. 6.1.3). Товщина волокон складала $0,0061 \pm 0,004$ мм, Щільність розташування аксонів складала $1914,83 \pm 387,9$ на 1 мм^2 .

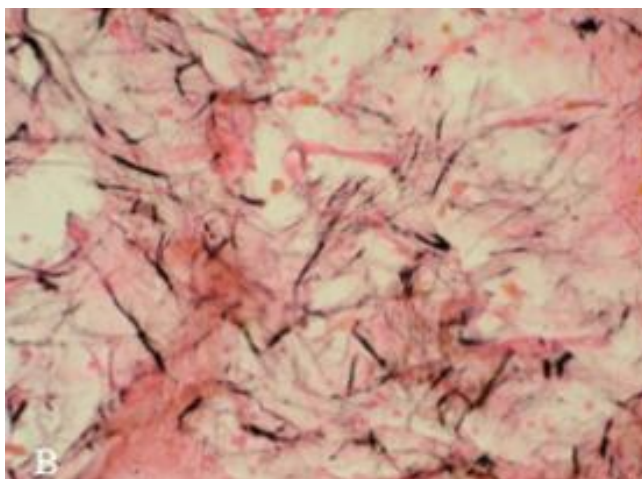


Рис. 6.1.3. Гістологічне дослідження структури тканинно-інженерного матрикса на 4 тиждень. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Збільшення $\times 200$

При використанні тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ, в цей же часовий період, відбувалося значне розростання нервових волокон, їх гіпертрофія і утворення розгалужень нервових волокон, орієнтованих у різних напрямках. Також при застосуванні матрикса із вмістом СКНГ не відмічено вираженого формування пухкої волокнистої сполучної тканини, у порівнянні з першою і другою експериментальними групами (рис. 6.1.4) [154]. Товщина волокон складала $0,0043 \pm 0,002$ мм, Щільність розташування аксонів складала $3338,6 \pm 302,7$ на 1 мм^2 .

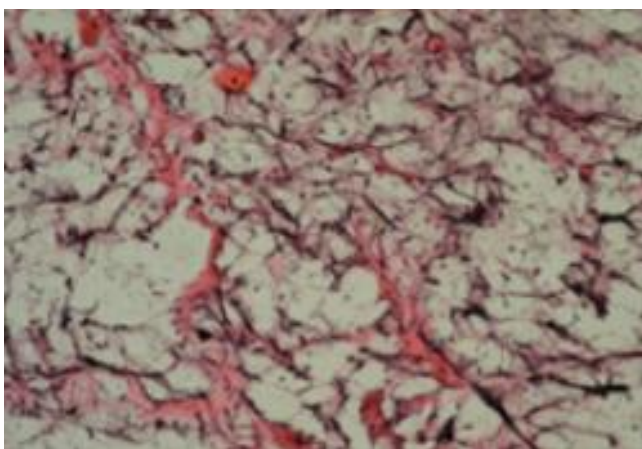


Рис. 6.1.4. Гістологічне дослідження структури тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ на 4 тиждень. Імпрегнація азотнокислим сріблом (А — збільшення $\times 200$, В — збільшення $\times 400$)

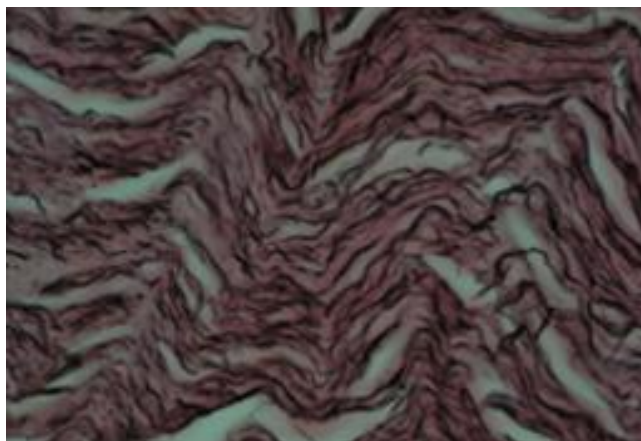


Рис. 6.1.5. Гістологічне дослідження структури нерва, відновленого шляхом АНП, на 8 тиждень. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Збільшення $\times 200$

Після перетину СН і наступної АНП через 8 тижнів експерименту подальше розростання волокнистої сполучної тканини не відбувалося, спостерігалось упорядковане їх розміщення. Зберігалися перемички між ділянками тяжів нервових волокон, які ставали упорядкованими. Відмічалися поодинокі ділянки жирової дегенерації. Визначалося інтенсивніше проростання капілярів із явищами стазу (рис. 6.1.5). Товщина волокон складала $0,006 \pm 0,0004$ мм, Щільність розташування аксонів складала $3389 \pm 387,9$ на 1 мм^2 . При порівнянні товщини нервових волокон у нерві відновленому шляхом АНП на двох часових проміжках, різниця між ними є статистично достовірною ($0,002 \pm 0,0003$ мм і $0,006 \pm 0,0004$ мм, $p=0,0003$). У той же час при порівнянні щільності розташування аксонів статистично значущої різниці не виявлено ($p=0,46$).

При застосуванні тканинно-інженерного матрикса із фібриновим гелем для заміщення дефекту, СН, через 8 тижнів відмічалось формування більшої кількості у порівнянні із 4 тижнем нервових волокон, ($1914,83 \pm 268,9$ проти $2188 \pm 419,5$) які, однак, мали хаотичне розташування, утворюючи велику кількість зв'язків на різних рівнях. Різниця у щільності розташування аксонів після імплантації тканинно-інженерного матрикса в динаміці була

статистично не достовірною ($p=0,46$) Також відмічалось посилене розростання сполучної тканини (рис. 6.1.6). Товщина волокон складала $0,009\pm0,002$ проти $0,008\pm0,001$ ($p=1,0$) і різниця між ними статистично недостовірна.

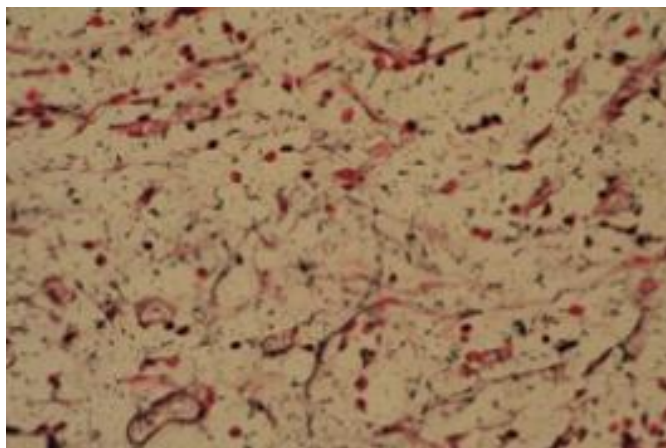


Рис. 6.1.6. Гістологічне дослідження структури тканинно-інженерного матрикса на 8 тиждень. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Збільшення $\times 200$

При використанні тканино-інженерного матрикса із вмістом СКНГ на 8 тиждень експерименту відмічалася значна гіпертрофія нервових волокон, які формували односпрямовані тяжі. Товщина волокон складала $0,0043\pm0,002$ мм проти $0,007\pm0,0001$ мм на 8 тиждень і ця різниця статистично достовірна ($p=0,00006$). Посилення розростання сполучної тканини у порівнянні з 4 тижнем не спостерігалось. Виявлялися капіляри, які розташовувалися паралельно до нервових волокон, інколи з ознаками стазу. Кількість нервових волокон складала $3140, \pm 357$ на 1 мм^2 .

При порівнянні щільності розташування аксонів у групах в динаміці, статистично достовірна різниця не була виявлена у жодній групі. У групі 1 $3566,8\pm598$ і $3389\pm387,9$ через 4 тижні та 8 тижнів відповідно ($p=0,46$). У групі 2 $1914,83\pm268,9$ і $2188\pm419,5$ через 4 тижнів та 8 тижнів відповідно ($p=0,43$; Mann-Whitney U-test). У групі 3 $3338,6\pm302,7$ і $3140,66\pm357$ через 4 тижні і 8 тижнів відповідно ($p=0,34$) (рис.6.1.7).

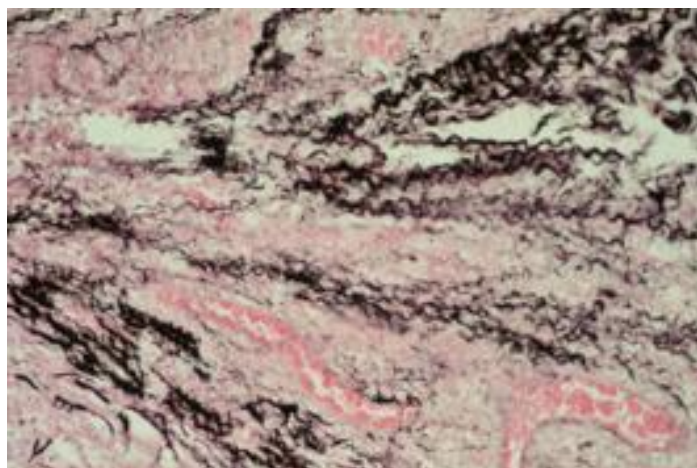


Рис. 6.1.7. Гістологічне дослідження структури тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ на через 8 тижнів. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Збільшення $\times 200$

Через 4 та 8 тижнів спостерігалася схожа динаміка при порівнянні 1 з 2, де статистично достовірно вищою щільність розташування аксонів була у групі 1, $3566,8 \pm 598$ та $1914,83 \pm 387,9$ через 4 тижні ($p=0,02$; Mann-Whitney U-test); $3389 \pm 387,9$ та $2188 \pm 419,5$ через 8 тижнів ($p=0,02$; Mann-Whitney U-test).

При порівнянні груп 2 та 3, також виявилася статистично значуща різниця на користь останньої групи: $1914,83 \pm 387,9$ та $3338,6 \pm 302,7$ через 4 тижні ($p=0,027$; Mann-Whitney U-test); $2188 \pm 419,5$ та $3140,66 \pm 357$ ($p=0,046$; Mann-Whitney U-test).

Статистично недостовірною виявилася різниця між групами 1 та 3 як через 4 тижні, так і через 8 тижнів: $3566,8 \pm 598$ та $3338,6 \pm 302,7$ ($p=0,43$; Mann-Whitney U-test) та $3389 \pm 387,9$ і $3140,66 \pm 357$ ($p=0,24$; $3140,66 \pm 357$).

Отримані дані свідчать про стимулюючий вплив СКНГ на ріст аксонів. Відсутність статистично достовірної різниці між групами 1 та 3 робить пластику СН тканинно-інженерним матриксом із вмістом СКНГ за даними щільності розташування аксонів максимально наближеною до АНП.

При порівнянні товщини нервових волокон у групах 1 та 2 через 4 тижні, різниця між ними статистично достовірна на користь групи 2 ($p=0,019$). Значущою була різниця між товщиною волокон груп 2 і 3 на користь групи 2 ($p=0,0002$). Така гіпертрофія волокон у групі імплантації

тканинно-інженерного матрикса, ймовірно, обумовлена меншою їх кількістю у колагеновій трубці. Статистично достовірної різниці між товщиною нервових волокон у групах 1 і 3 не відмічалось ($p=0,18$), отже результати пластики ПН тканинно-інженерним матриксом із вмістом СКНГ є наближеним до АНП.

6.2. Результати гістологічного дослідження тканинно-інженерних матриксів із вмістом стовбурових клітин нервового гребеня методом забарвлення люксолевим синім

При забарвленні нативного нерва люксолевим синім візуалізувалися щільні пласти тяжів нервових волокон, які були місцями розділені пухкою сполучною тканиною. Волокна характеризувалися впорядкованим розташуванням (рис. 6.2.1).

Після перетину нерва та АНП на 4 тиждень спостерігалось посилене, у порівнянні з інтактним нервом, розростання сполучної тканини. Нервові волокна характеризувалися неупорядкованим розташуванням у порівнянні із інтактним нервом, деякі набували рекурентного ходу, проте утворювали зв'язки з іншими волокнами на всіх рівнях. Звертала на себе увагу велика кількість гіперхромних ядер (рис. 6.2.2).

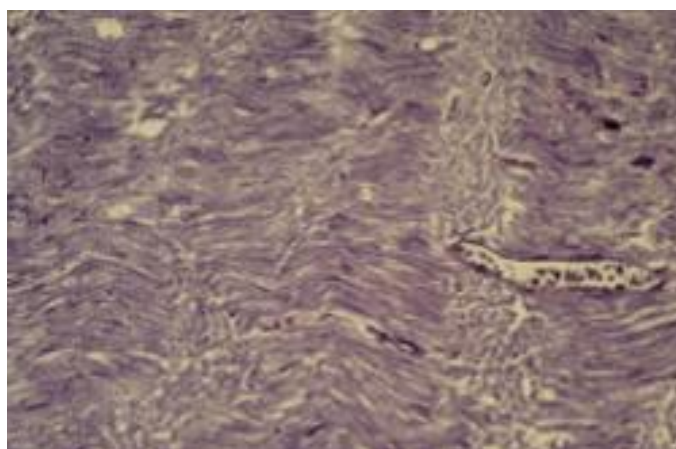


Рис. 6.2.1. Гістологічне дослідження структури контрольного СН. Забарвлення люксолевим синім. Збільшення $\times 200$

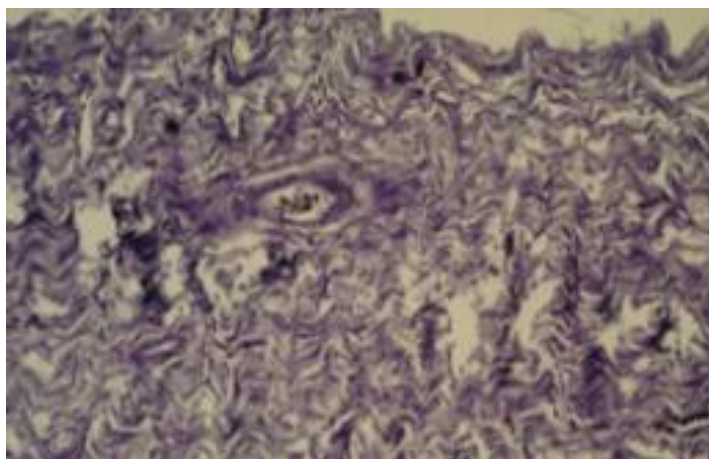


Рис. 6.2.2. Гістологічне дослідження структури нерва, відновленого шляхом АНП, на 4 тижень. Забарвлення люксолевим синім. Збільшення $\times 200$

При застосуванні тканинно-інженерного матрикса із фібриновим гелем для заміщення дефекту СН, на 4 тижень відмічалось формування хаотично розташованих нервових волокон і слабо виражене формування волокнистої сполучної тканини (рис. 6.2.3).

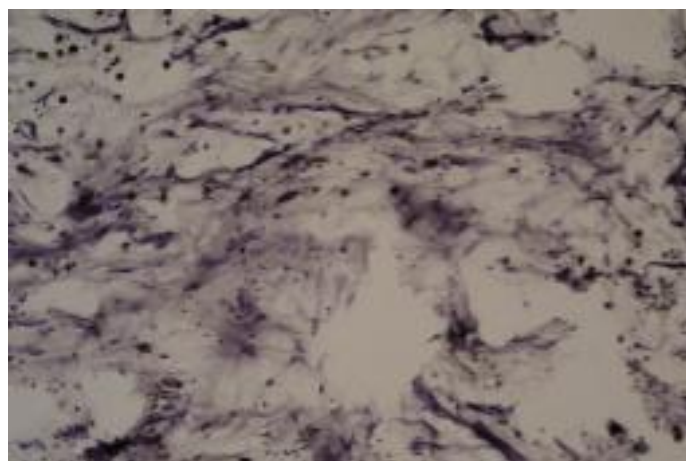


Рис. 6.2.3. Гістологічне дослідження структури тканинно-інженерного матрикса на 4 тижень. Забарвлення люксолевим синім. Збільшення $\times 200$

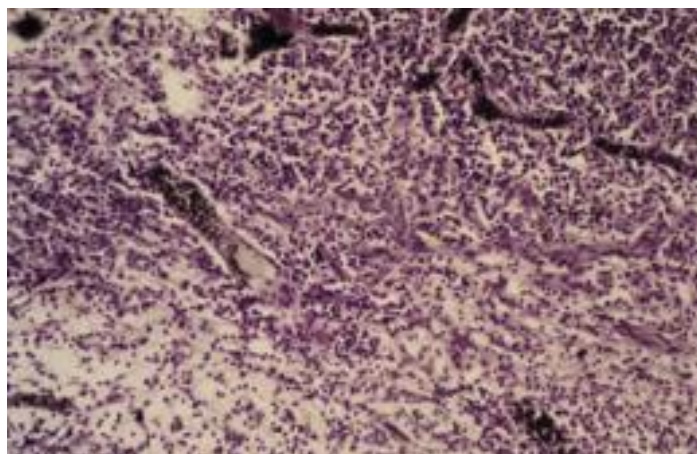


Рис. 6.2.4. Гістологічне дослідження структури тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ на 4 тиждень. Забарвлення люксолевим синім. Збільшення $\times 200$

При використанні тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ на 4 тиждень, нервові волокна розрослися інтенсивніше, у порівнянні із групою імплантації матрикса без СКНГ (рис.6.2.4), відмічалася їх гіпертрофія і утворення розгалужень нейрофібрил, які загалом були односпрямовані і нагадували архітекtonіку нерва після АНП.

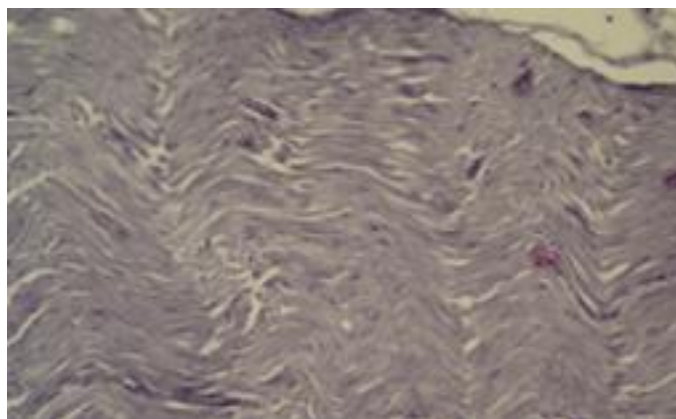


Рис. 6.2.5. Гістологічне дослідження структури нерва, відновленого шляхом АНП, на 8 тиждень. Забарвлення люксолевим синім. Збільшення $\times 200$

На 8 тиждень у нерві, відновленому шляхом АНП візуалізувалися впорядковані тяжі нервових волокон, паттерн росту яких був подібний до

інтактного нерва. Виявлялися прошарки сполучної тканини та невиражене формування капілярної сітки (рис. 6.2.5).

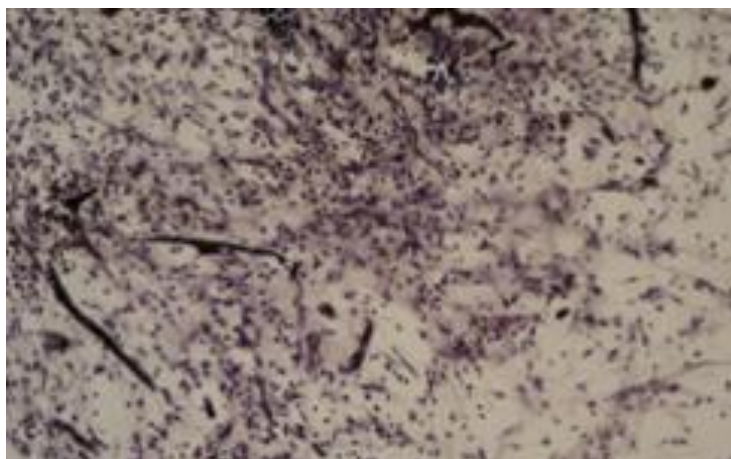


Рис. 6.2.6. Гістологічне дослідження структури тканинно-інженерного матрикса на 8 тиждень. Забарвлення люксолевим синім. Збільшення $\times 200$

На 8 тиждень після пластики СН тканинно-інженерним матриксом із фібриновим гелем спостерігалось посилене розростання сполучної тканини, велика кількість ядер та невиражене формування капілярної сітки (рис.6.2.6). Нервові волокна мали більш упорядковану структуру, проте кількість їх була значно меншою ніж у групах АНП та пластики нерва тканинно-інженерним матриксом із СКНГ.

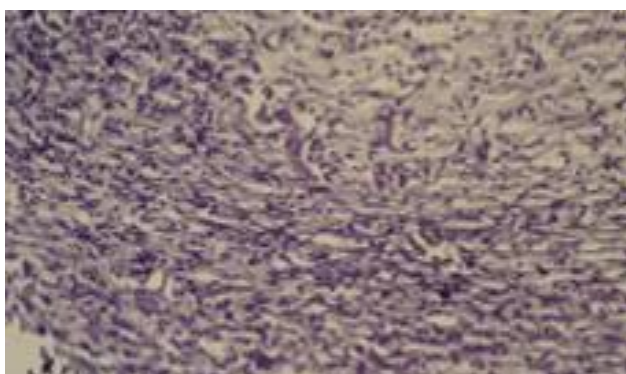


Рис. 6.2.7. Гістологічне дослідження структури тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ на 8 тиждень. Забарвлення люксолевим синім. Збільшення $\times 200$

На 8 тиждень у групі пластики СН тканинно-інженерним матриксом із СКНГ спостерігалася гістологічна картина, що була найбільше подібна до групи АНП. Нервові волокна були впорядкованими із великою кількістю відростків, що зв'язували регенеруючі волокна між собою. Спостерігалось слабе розростання сполучної тканини (рис. 6.2.7).

Отже, найбільшу подібність до архітекtonіки СН інтактних тварин, має регенерат нервових волокон, що утворюється при застосуванні АНП. У цьому регенераті утворювалися ділянки нервових волокон які за своєю архітекtonікою найбільш близько відповідали нервовим волокнам у інтактному СН. Однак найбільш виражено формування нервових волокон, а саме, гіпертрофія і значне їх розгалуження з формуванням сітки, виявлено при застосуванні тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ. При цьому в тканинно-інженерному матриксі на фоні гіпертрофії регенеруючих волокон відмічено невиражене формування пухкої волокнистої сполучної тканини.

Підсумовуючи вищесказане, можна зробити висновок, що найбільш подібну до контрольного нерва гістологічну структуру має нерв, відновлений шляхом АНП, проте, присутність у тканинно-інженерних матриксах СКНГ наближає їх структуру до структури інтактного нерва і покращує регенерацію нервових волокон.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Частота травми ПН становить 0,3–0,5 на 10 000 населення [1]. В Україні щорічно реєструють 2,5–3 тис. випадків травми ПН, з яких 60–75% супроводжуються інвалідизацією хворого [4]. Середній вік пацієнтів (18–44 роки) та значна тривалість життя після отримання травми обумовлюють значну соціально-економічну вагу проблеми відновлення функції травмованого нерва [5]. Незважаючи на значний технологічний прогрес, створення умов для інтенсивного росту перетнутих нервових волокон через зону травми нерва залишається актуальною проблемою. Одним із перспективних напрямків вирішення проблеми є залучення методу тканинної інженерії [8–10].

Регенерацію травмованого нерва активно вивчають в умовах експерименту [7, 10]. За даними метааналізу 1500 наукових публікацій із цієї проблематики у межах бази даних PubMed, у 90% випадків дослідження здійснено на моделі травми СН щура [6–9], що обумовлено доступністю біологічного матеріалу, простотою відтворення, наявністю засобів кількісної оцінки функції нерва [6].

Важливим питанням тканинної інженерії є пошук доступного джерела стовбурових клітин. У якості перспективного кандидата розглядають СКНГ, що містяться у бульбарному регіоні волосяного фолікула і володіють здатністю до нейрогенного диференціювання [130, 131]. НГ — тимчасова структура, що утворюється під час нейруляції і дає початок широкому спектру клітин нейрального та мезенхімного фенотипу [132]. У ряді досліджень встановлено позитивний вплив СКНГ на регенерацію травмованого СН [132, 134].

Травма СН супроводжується периферичним парезом м'язів стопи й зміною її просторової конфігурації; аналіз геометричних особливостей відбитку паретичної стопи щура є основою оцінки функції СН [36]. У даній

роботі наведено результати відновного нейроінженерного лікування травми СН зрілого щура за участю СКНГ із застосуванням методу оцінки відбитку паретичної стопи. Розроблений пристрій для отримання відбитків стоп щурів для розрахунку функціонального індексу СН дозволяє оптимізувати процес їх отримання.

Лінійна динаміка значення SFI, виявлена у групах 1, 2 і 3 може відображати динаміку кількості нервових волокон, що реінервують м'язи паретичної кінцівки. Лінійне збільшення кількості таких волокон можливе за умови нерівномірності їх росту з існуванням сукупного фронту росту — розташування конусів росту окремих волокон у товщі нерва — нахилоного під певним кутом до осі нерва. За таких умов, враховуючи сталу швидкість росту, однак нерівномірну ініціацію цього процесу серед регенеруючих волокон, першими досягають м'яза певна кількість конусів росту, у подальшому збільшення кількості волокон, що досягли цілі зростатиме зі сталою швидкістю, лінійно. У рамках такої моделі зменшення швидкості росту волокон з часом може компенсуватися пластичними перебудовами на рівні центральної нервової системи, а також галуженням аксонів, що досягли цілі, у товщі м'язу. У такій моделі регенераційна пауза протягом перших 2-х тижнів у групі 2 свідчить про суттєво нижчу швидкість росту авангардних волокон, ніж у групах 1 і 3; після доростання авангардних волокон до цілі швидкість росту у групі 2 стає аналогічною групам 1 і 3. Отже, у групах 1 і 3 існують більш сприятливі умови для направленого росту аксонів, і якщо у випадку АНП такі умови слід пов'язувати з тунельованою структурою сполучнотканинного каркасу аутоімплантату, частково заповненого клітинами шванівської глії, то у випадку імплантації трубчатого резервуару СКНГ високу швидкість росту нервових волокон можна пояснити стимулюючим ефектом “шванівських” нащадків імплантованих стовбурових клітин, стимулюючим впливом цих клітин на ріст аксональних конусів у бік дистального кінця нерва.

Іншою цікавою рисою регенераційного процесу, виявленою нами, є завершення його активної фази до 5 тижня спостереження, що є додатковою причиною низької результативності відновного процесу у групі 2. Пояснення, на нашу думку, слід пов'язувати з особливістю молекулярних механізмів регенераційного росту аксонів рухових нейронів, їх центральних ланок, а також у явищі денерваційної атрофії м'яза: незважаючи на пластичність м'язової тканини, період результативної його регенерації обмежений [19—22].

У випадку імплантації колагенового матриксу у поєднанні з клітинами НГ станом на кінець першого місяця спектр волокон суттєво відрізняється від спектру контрлатерального нерва за електрофізіологічними показниками, однак не відрізняється від спектру нерва псевдооперованих тварин. Протягом другого місяця у випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса, асоційованого з клітинами НГ, має місце результативна реінервація м'яза волокнами великого діаметра, так що станом на 8 тижень спостереження ЛПмв не відрізняється від реєстрованої для інтактної кінцівки. У випадку ж АНП зникнення достовірної різниці у показнику летентного періоду реєстрації збудження у паретичній кінцівці у порівнянні з інтактною кінцівкою та псевдооперованою кінцівкою, яке відмічали станом на 8 тижень, свідчить про більш інтенсивну реінервацію м'яза волокнами меншого діаметру протягом другого місяця регенераційного процесу. Отже під час АНП протягом 4 тижнів спостереження має місце преферентне проростання волокон великого діаметру, відсутнє у випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса, наявне у меншій мірі у випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса, асоційованого з клітинами НГ. Протягом 5-8 тижнів реінервація у випадку АНП здійснюється переважно за рахунок волокон меншого діаметру, у випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса, асоційованого з клітинами НГ — за рахунок волокон більшого діаметру. Результат реінервації у випадку АНП та імплантації тканинно-інженерного матрикса і вмістом СКНГ за оцінюваними ЕНМГ-показниками у

цілому рівнозначний, недостовірно відрізняється електрофізіологічним спектром волокон, що реінервували паретичний м'яз.

Експресія білка зеленої флюоресценції при імуногістохімічному методі дослідження дозволяє стверджувати, що безпосередню участь у процесах регенерації ПН після імплантації тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ беруть участь саме останні.

Через 4 тижні у тканинно-інженерному матриксу зберігалася експресія маркера p75, що вказує на присутність клітин зі шванівським фенотипом, які перебувають на ранніх етапах диференціювання, а експресія білків S100b, β -III-тубуліну та MBR, що свідчить про проростання нервових волокон та їх мієлінізацію. Через 8 тижнів експресія p75 у тканинно-інженерному матриксу практично відсутня, що говорить про диференціювання СКНГ у зрілі шванівські клітини.

СКНГ імплантовані у складі тканинно-інженерного матрикса для відновлення ПН при його травматичному ушкодженні, мають стимулюючий вплив на регенерацію нерва, переважно за рахунок їх диференціювання у шванівські клітини, що здатні мієлінізувати нервові волокна.

За даними гістологічних методів дослідження найбільшу подібність до архітекτονіки СН інтактних тварин, має регенерат нервових волокон, що утворюється при застосуванні АНП. У цьому регенераті утворювалися ділянки нервових волокон які за своєю архітектонікою найбільш близько відповідали нервовим волокнам у нативному СН. Крім того, у ділянці пошкодження формувалися тонкі відростки, що зв'язували ділянки регенеруючих нервових волокон на різних рівнях. При цьому спостерігалось посилене розростання пухкої волокнистої сполучної тканини.

Однак найбільш виражено формування нервових волокон, їх розгалуження з формуванням сітки, виявлено при застосуванні тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ. При цьому в тканинно-інженерному матриксу на фоні гіпертрофії регенеруючих волокон відмічено слабе формування пухкої волокнистої сполучної тканини.

При застосуванні тканинно-інженерного матрикса без СКНГ для заміщення дефекту СН, відмічалось формування незначної кількості тонких, хаотично розташованих нервових волокон і слабо виражене формування волокнистої пухкої сполучної тканини.

Отримані дані опосередковано свідчать про стимулюючий вплив СКНГ спрямований на ріст аксонів, формування їх мієлінової оболонки та відновлення морфо-функціонального стану сидничного нерва.

Відсутність статистично достовірної різниці у морфогенезі нерва між групами 1 і 3, робить пластику СН тканинно-інженерним матриксом із вмістом СКНГ максимально наближеною до аутонейропластики.

Для уточнення ефекту впливу СКНГ на регенерацію периферичного нерва рекомендується проведення подальших досліджень з мультидисциплінарною оцінкою щодо оптимальності застосування тканинно-інженерних конструкцій (терміни, структура, вид і кількість стовбурових клітин).

ВИСНОВКИ

1. Модифікований спосіб подолання дефекту периферичного нерва великого розміру із застосуванням тканинно-інженерного матрикса із вмістом стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня, доводить активізацію компенсаторно-приспосувальних процесів із статистично значущим відновленням нервово-м'язового апарату, максимально наближеним до аутонейропластики.

2. Стовбурові клітини (похідні) нервового гребеня зберігають функціональну активність до 8 тижня, у порівнянні із 4 тижнем спостереження, після трансплантації у складі тканинно-інженерного матрикса, про що свідчить забарвлення Ноехст 33342 і GFP.

3. Стовбурові клітини (похідні) нервового гребеня, імплантовані у складі тканинно-інженерного матрикса забезпечують максимальне відновлення структурно-функціональних стромально-мезенхімальних співвідношень та прискорення мієлінізації відновлених нервових волокон, про що свідчить експресія основного білка мієліну у тканинно-інженерних матриксах.

4. Стовбурові клітини (похідні) нервового гребеня, трансплантовані у складі тканинно-інженерного матрикса у найближчі терміни після травми диференціюються у клітини з “шванівським” фенотипом, про що свідчить експресія β -3-тубуліну та білка S100 у тканинно-інженерних матриксах на 8 тижні експерименту.

5. Морфологічна структура тканинно-інженерного матрикса із вмістом стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня за щільністю розташування аксонів ($3338,6 \pm 302,7$ на 1 мм^2 через 4 тижні і $3140,66 \pm 357$ на 1 мм^2 через 8 тижнів) статистично значуще не відрізняється від ділянки нерва, відновленого шляхом аутонейропластики ($3566,8 \pm 598$ на 1 мм^2 через 4 тижні і $3389 \pm 387,9$ на 1 мм^2 через 8 тижнів), що подібно до структури функціонально активного нерва.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Запропоновано підхід до відновлення периферичного нерва за умов його дефекту великого розміру, шляхом застосування тканинно-інженерних технологій на основі стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня.

Подолання дефектів периферичного нерва великого розміру за допомогою імплантації тканинно-інженерного матрикса пропонується для вивчення впливу на регенерацію периферичного нерва стовбурових клітин різного походження, а також різних факторів, які можна асоціювати із тканинно-інженерним матриксом.

2. Модифікований пристрій для визначення функціонального індексу сідничного нерва рекомендується для оцінки його за методикою “тесту з біговою доріжкою” (“Walking track test”) (Патент України на корисну модель №118157).

Спосіб визначення функціонального індексу сідничного пропонується для вивчення ступеня відновлення периферичного нерва за умов його дефекту великого розміру та оцінки ефективності реконструктивних нейрохірургічних операцій у експерименті нерва (Патент України на корисну модель №118156).

3. Подальша розробка методів подолання дефектів периферичних нервів великого розміру шляхом використання трансплантації стовбурових клітин, створює перспективу теоретичної розробки методу у клінічній практиці при лікуванні означеної патології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Torres RY, Miranda GE. Epidemiology of Traumatic Peripheral Nerve Injuries Evaluated by Electrodiagnostic Studies in a Tertiary Care Hospital Clinic. *P R Health Sci J*. 2016 Jun;35(2):76-80. PMID: 27232868.
2. Puzović V, Samardžić M, Jovanović M, Živković B, Savić A, Rasulić L. Etiology and mechanisms of ulnar and median forearm nerve injuries. *Vojnosanitetski Pregled*. 2015 Nov; 72(11):961-7. PMID: 26731969.
3. Цимбалюк ВІ, Страфун СС, Гайко ОГ, Гайович ВВ. Концепція відновлення функції кінцівки при травматичному ушкодженні периферичних нервів. *Український нейрохірургічний журнал*. 2016;(3):48-54.
4. Цимбалюк ВІ, Чеботарьова ЛЛ, Дубина ГІ. Електрофізіологічна діагностика закритого травматичного ураження плечового сплетення, поєданого з черепно-мозковою травмою. *Український нейрохірургічний журнал*. 2004;(4):65-8.
5. Rasulić L, Puzović V, Rotim K, Jovanović M, Samardžić M, Živković B, et al. The epidemiology of forearm nerve injuries – a retrospective study. *Acta Clinica Croatica*. 2015 Mar; 54(1):19-24. PMID: 26058238.
6. Jonsson S, Wiberg R, McGrath AM, Novikov LN, Wiberg M, Novikova LN, et al. Effect of Delayed Peripheral Nerve Repair on Nerve Regeneration, Schwann Cell Function and Target Muscle Recovery. *PLoS ONE*. 2013 Feb; 8(2): e56484. doi: 10.1371/journal.pone.0056484. PMID: 23409189; PMCID: PMC3567071.
7. Belanger K, Dinis TM, Taourirt S, Vidal G, Kaplan DL, Egles C. Recent Strategies in Tissue Engineering for Guided Peripheral Nerve Regeneration. *Macromol Biosci*. 2016 Apr;16(4):472-81. doi: 10.1002/mabi.201500367. Review. PubMed PMID: 26748820.

8. Fairbairn NG, Meppelink AM, Ng-Glazier J, Randolph MA, Winograd JM. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World J Stem Cells*. 2015 Jan;7(1):11-26. doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.11. Review. PubMed PMID: 25621102; PubMed Central PMCID: PMC4300921.

9. Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. *J Bone Joint Surg Am*. 2013 Dec;95(23):2144-51. doi: 10.2106/JBJS.L.00704. Review. PubMed PMID: 24306702.

10. Hansen C, Dinis TM, Vidal G, Ben-Mansour K, Bresson D, Egles C, et al. In-vivo analysis of nerve regeneration after sciatic nerve injury in a rat model. *International Biomechanics*. 2016 Oct;3(1):57-65. DOI: 10.1080/23335432.2016.1233077.

11. Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, Reid AJ. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Mar;82-83:160-7. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.010. Review. PubMed PMID: 25446133.

12. Цимбалюк ВІ, Третяк ІБ, Гацький ОО. Дослідження ефективності комбінованої пластики сідничного нерва за його великого дефекту шляхом кількісної оцінки ступеня функціонального відновлення в експерименті у щурів. *Український нейрохірургічний журнал*. 2012;(3):48-51.

13. Цимбалюк ВІ, Третяк ІБ, Гацький ОО, Вернигородський СВ. Гістоморфометрична оцінка ефективності комбінованої пластики сідничного нерва при його великому дефекті у щурів в експерименті. *Український нейрохірургічний журнал*. 2013;(1):32-9.

14. Sebben AD, Lichtenfels M, Braga da Silva JL. Peripheral nerve regeneration: cell therapy and neurotrophic factors. *Rev Bras Ortop*. 2011 Nov-Dec; 46(6): 643-9. doi: 10.1016/S2255-4971(15)30319-0. PMID: 27027067; PMCID: PMC4799329.

15. Seidel MF, Wise BL, Lane NE. Nerve growth factor: an update on the science and therapy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Sep;21(9):1223-8. doi:

10.1016/j.joca.2013.06.004. Review. PubMed PMID: 23973134; PubMed Central PMCID: PMC4252012.

16. Gómez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML. Neurotrophins and synaptic plasticity. Neurogenesis and neural plasticity. In: Belzung C, Wigmore P, eds. Neurogenesis and Neural Plasticity. Springer; 2013. Current Topics in Behavioral Neurosciences. Vol.15. p.117-136. doi: 10.1007/7854_2012_231.

17. Funa K, Sasahara M. The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. J Neuroimmune Pharmacol. 2014 Mar;9(2):168-81. doi: 10.1007/s11481-013-9479-z. Epub 2013 Jun 15. Review. PubMed PMID: 23771592; PubMed Central PMCID: PMC3955130.

18. Ramburrun P, Kumar P, Choonara YE, Bijukumar D, du Toit LC, Pillay V. A review of bioactive release from nerve conduits as a neurotherapeutic strategy for neuronal growth in peripheral nerve injury. Bio Med Research International. 2014;2014:132350. doi: 10.1155/2014/132350. Epub 2014 Jul 21.

19. Godinho MJ, Teh L, Pollett MA, Goodman D, Hodgetts SI, Sweetman I, et al. Immunohistochemical, ultrastructural and functional analysis of axonal regeneration through peripheral nerve grafts containing Schwann cells expressing BDNF, CNTF or NT3. PLoS One. 2013 Aug 9;8(8):e69987. doi: 10.1371/journal.pone.0069987. eCollection 2013. PubMed PMID: 23950907; PubMed Central PMCID: PMC3739754.

20. Zhang Y, Zhang H, Katiella K, Huang W. Chemically extracted acellular allogeneic nerve graft combined with ciliary neurotrophic factor promotes sciatic nerve repair. Neural Regen Res. 2014 Jul 15;9(14):1358-64. doi: 10.4103/1673-5374.137588. PubMed PMID: 25221592; PubMed Central PMCID: PMC4160866.

21. Liu G-Y, Jin Y, Zhang Q, Li R. Peripheral nerve repair: a hot spot analysis on treatment methods from 2010 to 2014. Neural Regen Res. 2015 Jun; 10(6): 996-1002. doi: 10.4103/1673-5374.158368. PMID: 26199620; PMCID: PMC4498365.

22. Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, Magill CK, et al. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve*. 2009 Jun;39(6):787-99. doi: 10.1002/mus.21220. PubMed PMID: 19291791.

23. Paczkowska E, Kaczyńska K, Pius-Sadowska E, Rogińska D, Kawa M, Ustianowski P, Safranow K, et al. Humoral activity of cord blood-derived stem/progenitor cells: implications for stem cell-based adjuvant therapy of neurodegenerative disorders. *PLoS One*. 2013 Dec 31;8(12):e83833. doi: 10.1371/journal.pone.0083833. eCollection 2013. PubMed PMID: 24391835; PubMed Central PMCID: PMC3877125.

24. Battiston B, Titolo P, Ciclamini D, Panero B. Peripheral Nerve Defects: Overviews of Practice in Europe. *Hand Clin*. 2017 Aug;33(3):545-550. doi: 10.1016/j.hcl.2017.04.005. Review. PubMed PMID: 28673630.

25. Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res*. 2004 Mar;26(2):151-60. Review. doi: 10.1179/016164104225013798. PubMed PMID: 15072634.

26. Brooks DN, Weber RV, Chao JD, Rinker BD, Zoldos J, Robichaux MR, et al. Processed nerve allografts for peripheral nerve reconstruction: a multicenter study of utilization and outcomes in sensory, mixed, and motor nerve reconstructions. *Microsurgery*. 2012 Jan;32(1):1-14. doi: 10.1002/micr.20975. PubMed PMID: 22121093.

27. Kim BS, Yoo JJ, Atala A. Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Feb;68(2):201-9. doi: 10.1002/jbm.a.10045. PubMed PMID: 14704961.

28. Мументалер М, Штёр М, Мюллер-Фаль Г, ред. Поражения периферических нервов и корешковые синдромы. Пер. с нем. Москва: МЕДпресс-информ; 2013. 616 с.

29. Pabari A, Yang SY, Seifalian AM, Mosahebi A. Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 Dec;63(12):1941-8. doi: 10.1016/j.bjps.2009.12.010. PMID: 20061198.

30. Birch R. Nerve Repair. In: Wolfe S, Pederson W, Kozin SH. Green's Operative Hand Surgery. 6th ed. Philadelphia; 2011. p.1035-1074.

31. Золотов АС, Пак ОИ. К вопросу об истории хирургических операций при ранениях периферических нервов. Травматология и ортопедия России. 2013;(3):162-166.

32. Гацький ОО. Комбінована пластика периферичних нервів при їх великих дефектах (експериментальне дослідження) [дисертація]. Київ: Ін-т нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова НАМН України; 2015. 23 с.

33. Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. Injury. 2012 May;43(5):553-72. doi: 10.1016/j.injury.2010.12.030. Epub 2011 Jan 26. Review. PubMed PMID: 21269624.

34. Safa B, Buncke G. Autograft Substitutes: Conduits and Processed Nerve Allografts. Hand Clin. 2016 May;32(2):127-40. doi: 10.1016/j.hcl.2015.12.012. Review. PubMed PMID: 27094886.

35. Yan Y, MacEwan MR, Hunter DA, Farber S, Newton P, Tung TH, et al. Nerve regeneration in rat limb allografts: evaluation of acute rejection rescue. Plast Reconstr Surg. 2013 Apr;131(4):499e-511e. doi: 10.1097/PRS.0b013e31828275b7. PubMed PMID: 23542267; PubMed Central PMCID: PMC3613760.

36. García-Medrano B, Mesuro Domínguez N, Simon Perez C, Garrosa García M, Gayoso del Villar S, Mayo Íscar A, et al. Repair of nerve injury by implanting prostheses obtained from isogenic acellular nerve segments. Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition). 2017 Sep-Oct; 61(5):359-366. DOI: 10.1016/j.recote.2017.08.011.

37. Neubauer D, Graham JB, Muir D. Chondroitinase treatment increases the effective length of acellular nerve grafts. Exp Neurol. 2007 Sep; 207(1):163-70. doi:10.1016/j.expneurol.2007.06.006. PMID: 17669401; PMCID: PMC2956445.

38. Gunn S, Cosetti M, Roland JT Jr. Processed allograft: novel use in facial nerve repair after resection of a rare racial nerve paraganglioma. *Laryngoscope*. 2010 Jan;120 Suppl 4:S206. doi: 10.1002/lary.21674. PubMed PMID: 21225804.

39. Karabekmez FE, Duymaz A, Moran SL. Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. *Hand (N Y)*. 2009 Sep;4(3):245-9. doi: 10.1007/s11552-009-9195-6. PubMed PMID: 19412640; PubMed Central PMCID: PMC2724628.

40. Braga Silva J, Marchese GM, Cauduro CG, Debiasi M. Nerve conduits for treating peripheral nerve injuries: A systematic literature review. *Hand Surg Rehabil*. 2017 Apr;36(2):71-85. doi: 10.1016/j.hansur.2016.10.212. PubMed PMID: 28325431.

41. Mackinnon SE, Dellon AL. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconstr Surg*. 1990 Mar; 85(3): 419-24. PMID:2154831. doi: 10.1097/00006534-199003000-00015.

42. Costa MP, Teixeira NH, Longo MV, Gemperli R, Costa HJ. Combined polyglycolic acid tube and autografting versus autografting or polyglycolic acid tube alone. A comparative study of peripheral nerve regeneration in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2015 Jan;30(1):46-53. doi: 10.1590/S0102-86502015001000006. PubMed PMID: 25627270.

43. Konofaos P, Ver Halen JP. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *J Reconstr Microsurg*. 2013 Mar; 29(3): 149-64. doi: 10.1055/s-0032-1333316. PMID: 23303520.

44. Krarup C, Archibald SJ, Madison RD. Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve. *Ann Neurol*. 2002 Jan;51(1):69-81. PubMed PMID: 11782986.

45. Rodríguez FJ, Verdú E, Ceballos D, Navarro X. Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2000 Feb;161(2):571-84. PubMed PMID: 10686077. DOI: 10.1006/exnr.1999.7315.

46. Benga A, Zor F, Korkmaz A, Marinescu B, Gorantla V. The neurochemistry of peripheral nerve regeneration. *Indian J Plast Surg*. 2017 Jan-

Apr;50(1):5-15. doi: 10.4103/ijps.IJPS_14_17. PubMed PMID: 28615804; PubMed Central PMCID: PMC5469235.

47. Rbia N, Shin AY. The Role of Nerve Graft Substitutes in Motor and Mixed Motor/Sensory Peripheral Nerve Injuries. *J Hand Surg Am.* 2017 May; 42(5):367-377. doi: 10.1016/j.jhsa.2017.02.017. PMID: 28473159.

48. Lui H, Vaquette C, Bindra R. Tissue Engineering in Hand Surgery: A Technology Update. *J Hand Surg Am.* 2017 Sep;42(9):727-735. doi: 10.1016/j.jhsa.2017.06.014. PMID: 28751113.

49. Sensharma P, Madhumathi G, Jayant RD, Jaiswal AK. Biomaterials and cells for neural tissue engineering: Current choices. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Aug;77:1302-15. doi: 10.1016/j.msec.2017.03.264. PMID: 28532008.

50. Wang EW, Zhang J, Huang JH. Repairing peripheral nerve injury using tissue engineering techniques. *Neural Regen Res.* 2015 Sep;10(9):1393-4. doi: 10.4103/1673-5374.165501. PMID: 26604891; PMCID: PMC4625496.

51. Gao Y, Wang YL, Kong D, Qu B, Su XJ, Li H, et al. Nerve autografts and tissue-engineered materials for the repair of peripheral nerve injuries: a 5-year bibliometric analysis. *Neural Regen Res.* 2015 Jun;10(6):1003-8. doi: 10.4103/1673-5374.158369. PMID: 26199621; PMCID: PMC4498331.

52. Jones S, Eisenberg HM, Jia X. Advances and Future Applications of Augmented Peripheral Nerve Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep;17(9). pii: E1494. doi: 10.3390/ijms17091494. Review. PubMed PMID: 27618010; PubMed Central PMCID: PMC5037771.

53. Jiang L, Jones S, Jia X. Stem Cell Transplantation for Peripheral Nerve Regeneration: Current Options and Opportunities. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan; 18(1): 94. doi: 10.3390/ijms18010094. PMID: 28067783; PMCID: PMC5297728.

54. Sullivan R, Dailey T, Duncan K, Abel N, Borlongan CV. Peripheral Nerve Injury: Stem Cell Therapy and Peripheral Nerve Transfer. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec;17(12):2101. DOI:10.3390/ijms17122101. PMID: 27983642; PMCID: PMC5187901.

55. Walsh S, Midha R. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus*. 2009 Feb;26(2):E2. doi: 10.3171/FOC.2009.26.2.E2. PMID: 19435443.

56. Culme-Seymour EJ, Davies JL, Hitchcock J, Mason J, Carpenter MK, Mason C. Cell Therapy Regulatory Toolkit: an online regulatory resource. *Regen Med*. 2015 Aug 15;10(5):531-4. doi: 10.2217/rme.15.33. PMID: 26237697.

57. Grochmal J1, Midha R. Recent advances in stem cell-mediated peripheral nerve repair. *Cells Tissues Organs*. 2015 May;200(1):13-22. doi: 10.1159/000369450. PMID: 25825283.

58. Hundepool CA, Nijhuis TH, Mohseny B, Selles RW, Hovius SE. The effect of stem cells in bridging peripheral nerve defects: a meta-analysis. *J Neurosurg*. 2014 Jul;121(1):195-209. doi: 10.3171/2014.4.JNS131260. PubMed PMID: 24816327.

59. Nijhuis TH, Bodar CW, van Neck JW, Walbeehm ET, Siemionow M, Madajka M, et al. Natural conduits for bridging a 15-mm nerve defect: comparison of the vein supported by muscle and bone marrow stromal cells with a nerve autograft. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013 Feb;66(2):251-9. doi: 10.1016/j.bjps.2012.09.011. PubMed PMID: 23063384.

60. Sverdlov ED, Mineev K. Mutation rate in stem cells: an underestimated barrier on the way to therapy. *Trends Mol Med*. 2013 May;19(5):273-80. doi: 10.1016/j.molmed.2013.01.004. Review. PubMed PMID: 23481596.

61. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, Zhang Q, Xu F, Yang Z, et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death & Disease*. 2013 Dec;4(12):e950. doi: 10.1038/cddis.2013.480.

62. Dąbrowska AM, Skopiński P. Stem cells in regenerative medicine – from laboratory to clinical application – the eye. *Cent Eur J Immunol*. 2017 Aug;42(2):173-180. doi: 10.5114/ceji.2017.69360. PMID: 28860936. PMCID: PMC5573891.

63. Hakki SS, Turaç G, Bozkurt SB, Kayis SA, Hakki EE, Şahin E, et al. Comparison of Different Sources of Mesenchymal Stem Cells: Palatal versus Lipoaspirated Adipose Tissue. *Cells Tissues Organs*. 2017 Aug;204(5-6):228-240. doi: 10.1159/000478998. Epub 2017 Aug 26. PubMed PMID: 28848084.

64. Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*. 2016 Jan;37(1):115-25. doi: 10.3892/ijmm.2015.2413. PMID: 26719857 PMCID: PMC4687432.

65. Macrin D, Joseph JP, Pillai AA, Devi A. Eminent Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Imminence. *Stem Cell Rev*. 2017 Aug; 13(6):741-756. doi: 10.1007/s12015-017-9759-8. PMID: 28812219.

66. Lynch K, Pei M. Age associated communication between cells and matrix: a potential impact on stem cell-based tissue regeneration strategies. *Organogenesis*. 2014 Dec;10(3):289-98. doi: 10.4161/15476278.2014.970089. Review. PubMed PMID: 25482504; PubMed Central PMCID: PMC4594597.

67. Chen J, Zhang D, Li Q, Yang D, Fan Z, Ma D, et al. Effect of different cell sheet ECM microenvironment on the formation of vascular network. *Tissue Cell*. 2016 Oct;48(5):442-51. doi: 10.1016/j.tice.2016.08.002. PubMed PMID: 27561623.

68. Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One*. 2011 Mar;6(3):e17899. doi: 10.1371/journal.pone.0017899. PubMed PMID: 21423756; PubMed Central PMCID: PMC3056777.

69. Liu G, Cheng Y, Guo S, Feng Y, Li Q, Jia H, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair. *Int J Mol Med*. 2011 Oct;28(4):565-72. doi: 10.3892/ijmm.2011.725. PubMed PMID: 21687931.

70. Jia H, Wang Y, Tong XJ, Liu GB, Li Q, Zhang LX, et al. Sciatic nerve repair by acellular nerve xenografts implanted with BMSCs in rats xenograft

combined with BMSCs. *Synapse*. 2012 Mar;66(3):256-69. doi: 10.1002/syn.21508. PubMed PMID: 22127791.

71. Mohammadi R, Azizi S, Delirez N, Hobbenaghi R, Amini K, Malekhetabi P. The use of undifferentiated bone marrow stromal cells for sciatic nerve regeneration in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 May; 41(5): 650-6. doi: 10.1016/j.ijom.2011.10.028. PMID: 22154576.

72. Nijhuis TH, Bodar CW, van Neck JW, Walbeehm ET, Siemionow M, Madajka M, et al. Natural conduits for bridging a 15-mm nerve defect: comparison of the vein supported by muscle and bone marrow stromal cells with a nerve autograft. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013 Feb;66(2):251-9. doi: 10.1016/j.bjps.2012.09.011. PubMed PMID: 23063384.

73. Nijhuis TH, Brzezicki G, Klimczak A, Siemionow M. Isogenic venous graft supported with bone marrow stromal cells as a natural conduit for bridging a 20 mm nerve gap. *Microsurgery*. 2010 Nov; 30(8): 639-45. doi: 10.1002/micr.20818. PMID: 20842703.

74. Salomone R, Bento RF, Costa HJ, Azzi-Nogueira D, Ovando PC, Da-Silva CF, et al. Bone marrow stem cells in facial nerve regeneration from isolated stumps. *Muscle and Nerve*. 2013 Sep;48(3):423-9. doi: 10.1002/mus.23768. PMID: 23824709.

75. Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev*. 2014 Apr;23(7):741-54. doi: 10.1089/scd.2013.0396. PMID: 24124760.

76. Lin L, Du L. The role of secreted factors in stem cells-mediated immune regulation. *Cell Immunol*. 2018 Apr;326: 24-32. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.07.010. PMID: 28778535.

77. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug;18(9): pii: E1852. doi: 10.3390/ijms18091852. PMID: 28841158.; PMCID: PMC5618501.

78. Петрова ЕС. Применение стволовых клеток для стимуляции регенерации поврежденного нерва. Цитология. 2012; 54(7):525-540.

79. Kerman BE, Kim HJ, Padmanabhan K, Mei A, Georges S, Joens MS, et al. In vitro myelin formation using embryonic stem cells. *Development*. 2015 Jun;142(12):2213-25. doi: 10.1242/dev.116517. PMID: 26015546.

80. Petrova ES, Isaeva EN, Korzhevskii DE. Differentiation of dissociated rat embryonic brain after allotransplantation into damaged nerve. *Bull Exp Biol Med*. 2013 Nov;156(1):136-8. PMID: 24319710. doi: 10.1007/s10517-013-2296-9.

81. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov; 282(5391):1145-7. PMID: 9804556. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.

82. Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med*. 2005 Jun;2(6):e161. DOI: 10.1371/journal.pmed.0020161. PMCID: PMC1160574; PMID: 15971941.

83. Li Y, Wang R, Qiao N, Peng G, Zhang K, Tang K, et al. Transcriptome analysis reveals determinant stages controlling human embryonic stem cell commitment to neuronal cells. *J Biol Chem*. 2017 Dec; 292(48):19590-19604. doi: 10.1074/jbc.M117.796383. PMID: 28972157; PMCID: PMC5712601.

84. Alić I, Kosi N, Kapuralin K, Gorup D, Gajović S, Pochet R, et al. Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP-16 are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology. *Neurosci Letter*. 2016 Nov;634:32-41. doi: 10.1016/j.neulet.2016.10.001.

85. Johnson TS, O'Neill AC, Motarjem PM, Nazzal J, Randolph M, Winograd JM. Tumor formation following murine neural precursor cell transplantation in a rat peripheral nerve injury model. *J Reconstr Microsurg*. 2008 Nov; 24(8): 545-50. doi: 10.1055/s-0028-1088228. PMID: 18819061.

86. Roche P, Alekseeva T, Widaa A, Ryan A, Matsiko A, Walsh M, et al. Olfactory Derived Stem Cells Delivered in a Biphasic Conduit Promote Peripheral

Nerve Repair In Vivo. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Oct; 6(10): 1894-1904. doi: 10.1002/sctm.16-0420. PMID: 28960910.

87. Batioglu-Karaaltin A, Karaaltin MV, Oztel ON, Ovali E, Sener BM, Adatepe T, et al. Human olfactory stem cells for injured facial nerve reconstruction in a rat model. *Head Neck.* 2016 Apr;38 (Suppl 1):E2011-20. doi: 10.1002/hed.24371. PubMed PMID: 26829770.

88. Kabiri M, Oraee-Yazdani S, Shafiee A, Hanaee-Ahvaz H, Dodel M, Vaseei M, et al. Neuroregenerative effects of olfactory ensheathing cells transplanted in a multi-layered conductive nanofibrous conduit in peripheral nerve repair in rats. *J Biomed Sci.* 2015 May;22:35. doi: 10.1186/s12929-015-0144-0. PMID: 25986461; PMCID: PMC4437686.

89. Guérout N, Duclos C, Drouot L, Abramovici O, Bon-Mardion N, Lacoume Y, et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration and functional recovery of peripheral nerve lesion in rats. *Muscle Nerve.* 2011 Apr;43(4):543-51. doi: 10.1002/mus.21907. PMID: 21305567.

90. Guo J, Guo S, Wang Y, Yu Y. Promoting potential of adipose derived stem cells on peripheral nerve regeneration. *Mol Med Rep.* 2017 Nov;16(5):7297-304. doi: 10.3892/mmr.2017.7570. PMID:28944869. PMCID:PMC5865858.

91. Ullah I, Park JM, Kang YH, Byun JH, Kim DG, Kim JH, et al. Transplantation of Human Dental Pulp-Derived Stem Cells or Differentiated Neuronal Cells from Human Dental Pulp-Derived Stem Cells Identically Enhances Regeneration of the Injured Peripheral Nerve. *Stem Cells Dev.* 2017 Sep;26(17):1247-57. doi: 10.1089/scd.2017.0068. PMID: 28657463.

92. Sanen K, Martens W, Georgiou M, Ameloot M, Lambrichts I, Phillips J, et al. Engineered neural tissue with Schwann cell differentiated human dental pulp stem cells: potential for peripheral nerve repair? *J Tissue Eng Regen Med.* 2017 Dec;11(12):3362-3372. doi: 10.1002/term.2249. PMID: 28052540.

93. Hei WH, Almansoori AA, Sung MA, Ju KW, Seo N, Lee SH, et al. Adenovirus vector-mediated ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells

(UCB-MSCs) promotes crush-injured rat sciatic nerve regeneration. *Neurosci Letters*. 2017 Mar;643:111-120. doi: 10.1016/j.neulet.2017.02.030. PMID:28215880.

94. Xiao B, Rao F, Guo ZY, Sun X, Wang YG, Liu SY, et al. Extracellular matrix from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a scaffold for peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res*. 2016 Jul;11(7):1172-9. doi: 10.4103/1673-5374.187061. PMCID: PMC4994464; PMID: 27630705.

95. Guo ZY, Sun X, Xu XL, Zhao Q, Peng J, Wang Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms. *Neural Regen Res*. 2015 Apr; 10(4):651-8. doi: 10.4103/1673-5374.155442. PMID: 26170829; PMCID: PMC4424761.

96. Cai S, Tsui YP, Tam KW, Shea GK, Chang RS, Ao Q, et al. Directed Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells to Fate-Committed Schwann Cells. *Stem Cell Reports*. 2017 2017 Oct; 9(4):1097-1108. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.004. PubMed PMID: 28890164; PubMed Central PMCID: PMC5639182.

97. Nijhuis TH, Brzezicki G, Klimczak A, Siemionow M. Isogenic venous graft supported with bone marrow stromal cells as a natural conduit for bridging a 20 mm nerve gap. *Microsurgery* 2010 Nov;30(8):639-45. doi: 10.1002/micr.20818. PMID: 20842703.

98. Wang Y, Jia H, Li WY, Tong XJ, Liu GB, Kang SW. Synergistic effects of bone mesenchymal stem cells and chondroitinase ABC on nerve regeneration after acellular nerve allograft in rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2012 Apr; 32(3):361-71. doi: 10.1007/s10571-011-9764-4. PMID: 22095068.

99. Ladak A, Olson J, Tredget EE, Gordon T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp Neurol*. 2011 Apr;228(2):242-52. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.01.013. PMID: 21281630.

100. Zarbakhsh S, Bakhtiyari M, Faghihi A, Joghataei MT, Mehdizadeh M, Khoei S, et al. The effects of schwann and bone marrow stromal stem cells on

sciatic nerve injury in rat: a comparison of functional recovery. *Cell J*. 2012 Spring;14(1):39-46. PubMed PMID:23626936; PubMed Central PMCID: PMC3635819.

101. Yang Y, Yuan X, Ding F, Yao D, Gu Y, Liu J, et al. Repair of rat sciatic nerve gap by a silk fibroin-based scaffold added with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2011 Sep;17(17-18):2231-44. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0633. PMID: 21542668.

102. Zheng L, Cui HF. Enhancement of nerve regeneration along a chitosan conduit combined with bone marrow mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Sep; 23(9):2291-302. doi: 10.1007/s10856-012-4694-3. PMID: 22661248.

103. de Luca AC, Fonta CM, Raffoul W, di Summa PG, Lacour SP. In vitro evaluation of gel-encapsulated adipose derived stem cells: Biochemical cues for in vivo peripheral nerve repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Mar;12(3):676-686. doi: 10.1002/term.2486. Epub 2017 Sep 25. PubMed PMID: 28556533.

104. Xie S, Lu F, Han J, Tao K, Wang H, Simental A, et al. Efficient generation of functional Schwann cells from adipose-derived stem cells in defined conditions. *Cell Cycle*. 2017 May;16(9):841-851. doi: 10.1080/15384101.2017.1304328. PubMed PMID: 28296571; PubMed Central PMCID: PMC5444349.

105. Семенова ВМ, Лисяный НИ, Стайно ЛП, Бельская ЛН, Егорова ДМ. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в условиях культивирования. *Український нейрохірургічний журнал*. 2014; 3: 24-9.

106. Abbas OL, Borman H, Uysal ÇA, Gönen ZB, Aydin L, Helvacioğlu F, et al. Adipose-Derived Stem Cells Enhance Axonal Regeneration through Cross-Facial Nerve Grafting in a Rat Model of Facial Paralysis. *Plast Reconstr Surg*. 2016 Aug;138(2):387-96. doi: 10.1097/PRS.0000000000002351. PubMed PMID: 27465163.

107. Klein SM, Vykoukal J, Li DP, Pan HL, Zeitler K, Alt E, et al. Peripheral Motor and Sensory Nerve Conduction following Transplantation of Undifferentiated Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells in a Biodegradable U.S. Food and Drug Administration-Approved Nerve Conduit. *Plast Reconstr Surg.* 2016 Jul;138(1):132-9. doi: 10.1097/PRS.0000000000002291. PubMed PMID: 27348645.
108. Sowa Y1, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Fushiki S. Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. *Stem Cells Dev.* 2012 Jul; 21(11):1852-62. doi: 10.1089/scd.2011.0403. PMID: 22150084.
109. Tomita K, Madura T, Mantovani C, Terenghi G. Differentiated adipose-derived stem cells promote myelination and enhance functional recovery in a rat model of chronic denervation. *J Neurosci Res.* 2012 Jul; 90(7): 1392-402. doi: 10.1002/jnr.23002. PMID: 22419645.
110. Erba P, Mantovani C, Kalbermatten DF, Pierer G, Terenghi G, Kingham PJ. Regeneration potential and survival of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in peripheral nerve conduits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010 Dec;63(12):e811-7. doi: 10.1016/j.bjps.2010.08.013. PubMed PMID: 20851070.
111. Sun F, Zhou K, Mi WJ, Qiu JH. Repair of facial nerve defects with decellularized artery allografts containing autologous adipose-derived stem cells in a rat model. *Neuroscie Lett.* 2011 Jul; 499(2): 104-8. doi: 10.1016/j.neulet.2011.05.043. PMID: 21651959.
112. Kappos EA, Engels PE, Tremp M, Meyer zu Schwabedissen M, di Summa P, Fischmann A, et al. Peripheral Nerve Repair: Multimodal Comparison of the Long-Term Regenerative Potential of Adipose Tissue-Derived Cells in a Biodegradable Conduit. *Stem Cells Dev.* 2015 Sep; 24(18):2127-41. doi: 10.1089/scd.2014.0424. PubMed PMID: 26134465.
113. di Summa PG, Kingham PJ, Campisi CC, Raffoul W, Kalbermatten DF. Collagen (NeuraGen®) nerve conduits and stem cells for peripheral nerve gap

repair. *Neurosci Lett*. 2014 Jun;572:26-31. doi: 10.1016/j.neulet.2014.04.029. PMID: 24792394.

114. di Summa PG, Kalbermatten DF, Raffoul W, Terenghi G, Kingham PJ. Extracellular matrix molecules enhance the neurotrophic effect of Schwann cell-like differentiated adipose-derived stem cells and increase cell survival under stress conditions. *Tissue Eng Part A*. 2013 Feb; 19(3-4): 368-79. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0124. PMID: 22897220; PMCID: PMC3542878.

115. Fairbairn NG, Randolph MA, Redmond RW. The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014 May;67(5):662-75. doi: 10.1016/j.bjps.2014.01.031. PMID: 24560801.

116. Gärtner A, Pereira T, Alves MG, Armada-da-Silva PA, Amorim I, Gomes R, et al. Use of poly(DL-lactide- ϵ -caprolactone) membranes and mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the umbilical cord for promoting nerve regeneration in axonotmesis: in vitro and in vivo analysis. *Differentiation*. 2012 Dec; 84(5): 355-65. doi: 10.1016/j.diff.2012.10.001. PMID: 23142731.

117. Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010 Sep;69(9):973-85. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181eff6dc. PubMed PMID: 20720501.

118. Cottle BJ, Lewis FC, Shone V, Ellison-Hughes GM. Skeletal muscle-derived interstitial progenitor cells (PICs) display stem cell properties, being clonogenic, self-renewing, and multi-potent in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Jul; 8(1): 158. doi: 10.1186/s13287-017-0612-4. PubMed PMID: 28676130; PubMed Central PMCID: PMC5496597.

119. Tamaki T, Hirata M, Soeda S, Nakajima N, Saito K, Nakazato K, et al. Preferential and comprehensive reconstitution of severely damaged sciatic nerve using murine skeletal muscle-derived multipotent stem cells. *PLoS One*. 2014 Mar;9(3):e91257. doi: 10.1371/journal.pone.0091257. eCollection 2014. PubMed PMID: 24614849; PubMed Central PMCID: PMC3948784.

120. Johnson TS, O'Neill AC, Motarjem PM, Amann C, Nguyen T, Randolph MA, et al. Photochemical tissue bonding: a promising technique for peripheral nerve repair. *J Surg Res*. 2007 Dec;143(2):224-9. PubMed PMID: 17543988. DOI: 10.1016/j.jss.2007.01.028.

121. Yoshikawa M, Nakasa T, Ishikawa M, Adachi N, Ochi M. Evaluation of autologous skeletal muscle-derived factors for regenerative medicine applications. *Bone Joint Res*. 2017 May; 6(5): 277-83. doi: 10.1302/2046-3758.65.BJR-2016-0187.R1. PMID: 28473335; PMCID: .PMC5457645.

122. Tamaki T, Hirata M, Nakajima N, Saito K, Hashimoto H, Soeda S, et al. A Long-Gap Peripheral Nerve Injury Therapy Using Human Skeletal Muscle-Derived Stem Cells (Sk-SCs): An Achievement of Significant Morphological, Numerical and Functional Recovery. *PLoS One*. 2016 Nov;11(11):e0166639. PubMed PMID: 27846318; PubMed Central PMCID: PMC5112878. doi: 10.1371/journal.pone.0166639.

123. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug; 126(4): 663-76. PMID: 16904174. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

124. Kang S, Chen X, Gong S, Yu P, Yau S, Su Z, et al. Characteristic analyses of a neural differentiation model from iPSC-derived neuron according to morphology, physiology, and global gene expression pattern. *Sci Rep*. 2017 Sep;7(1):12233. doi: 10.1038/s41598-017-12452-x. PubMed PMID: 28947763; PubMed Central PMCID: PMC5612987.

125. Ikeda M, Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Kazuki K, Tabata Y, et al. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. *J Biomed Mater Res A*. 2014 May;102(5):1370-8. doi: 10.1002/jbm.a.34816. PubMed PMID: 23733515.

126. Satarian L, Javan M, Kiani S, Hajikaram M, Mirnajafi-Zadeh J, Baharvand H. Engrafted human induced pluripotent stem cell-derived anterior specified neural progenitors protect the rat crushed optic nerve. *PLoS One*. 2013

Aug;8(8):e71855.doi:10.1371/journal.pone.0071855. PubMed PMID: 23977164; PubMed Central PMCID: PMC3747054.

127. Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, Okada M, Kazuki K, Ikada Y, et al. Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Mar; 419(1):130-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.154. PMID: 22333572.

128. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2011 Apr; 11(4): 268-77. doi: 10.1038/nrc3034.

129. Sieber-Blum M, Grim M, Hu Y, Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn*. 2004 Oct;231(2):258-69. doi: 10.1002/dvdy.20129. PMID: 15366003.

130. Цимбалюк ВІ, Молотковець ВЮ, Медведєв ВВ, Лузан БМ, Петрів ТІ. Ефективність зварного з'єднання ушкодженого периферичного нерва щура за даними оцінки функціонального індексу сідничного нерва. *Український неврологічний журнал*. 2017;(2):63-68.

131. Achilleos A, Trainor PA. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res*. 2012 Feb; 22(2): 288-304. doi: 10.1038/cr.2012.11. PMID: 22231630; PMCID: PMC3271580.

132. Mii S, Duong J, Tome Y, Uchugonova A, Liu F, Amoh Y, et al. Nestin-Expressing Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Promote Whisker Sensory-Nerve Growth in Long-Term 3D-Gelfoam® Histoculture. *Methods Mol Biol*. 2016 Jul;1453:39-47. doi: 10.1007/978-1-4939-3786-8_6. PubMed PMID: 27431245.

133. Цымбалюк ВІ, Медведєв ВВ. Нейрогенные стволовые клетки. Киев: Коваль; 2005. 596 с.

134. Hoffman RM. Introduction to Hair-Follicle-Associated Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2016 Jul;1453:1-5. doi: 10.1007/978-1-4939-3786-8_1. PMID: 27431240.

135. Hoffman RM. Nestin-expressing hair follicle-accessible pluripotent stem cells for nerve and spinal cord repair. *Cells Tissues Organs*. 2014 Jul; 200(1): 42-7. doi: 10.1159/000366098. PMID: 25766743.

136. Vasyliiev RG, Rodnichenko AE, Shamalo SN, Demidchouk AS, Labunets IF, Chaikovskii YuB, et al. Effects of Neural Crest-Derived Multipotent Stem Cells on Regeneration of an Injured Peripheral Nerve in Mice. *Neurophysiology*. 2015 Apr; 47(1): 80-3. doi:10.1007/s11062-015-9501-6.

137. Васильев РГ. Мультипотентные стволовые клетки из бульбарного региона волосяного фолликула со свойствами производных нервного гребня. *Проблемы криобиологии*. 2012; 22 (2):165-68.

138. Motohashi T, Yamanaka K, Chiba K, Aoki H, Kunisada T. Unexpected multipotency of melanoblasts isolated from murine skin. *Stem Cells*. 2009 Apr; 27(4):888-97. doi: 10.1634/stemcells.2008-0678. PMID: 19350691.

139. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr;102(15):5530-4. PubMed PMID: 15802470; PubMed Central PMCID: PMC556262. DOI: 10.1073/pnas.0501263102.

140. Najafzadeh N, Esmaeilzade B, Dastan Imchek M. Hair follicle stem cells: In vitro and in vivo neural differentiation. *World J Stem Cells*. 2015 Jun; 7(5):866-72. doi:10.4252/wjsc.v7.i5.866. PMID: 26131317; PMCID: PMC4478633.

141. Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Kawahara K, Sato Y, Katsuoka K, et al. Hoffman. Human and mouse hair follicles contain both multipotent and monopotent stem cells. *Cell Cycle*. 2009 Jan; 8(1):176-7. doi: 10.4161/cc.8.1.7342. PMID: 19106614.

142. Amoh Y, Hoffman RM. Hair follicle-associated-pluripotent (HAP) stem cells. *Cell Cycle*. 2017 Jul; 16(22):2169-2175. PMID: 28749199. doi: 10.1080/15384101.2017.1356513.

143. Amoh Y, Aki R, Hamada Y, Niiyama S, Eshima K, Kawahara K, et al. Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of

impinged peripheral nerve injury. *J Dermatol.* 2012 Jan;39(1):33-8. doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01413.x. PMID: 22098554.

144. Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Hamada Y, Kawahara K, Sato Y, et al. Human hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote regeneration of peripheral-nerve injury: an advantageous alternative to ES and iPS cells. *J Cell Biochem.* 2009 Aug;107(5): 1016-20. doi: 10.1002/jcb.22204. PMID: 19507228.

145. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Dec;102(49):17734-8. doi: 10.1073/pnas.0508440102. PubMed PMID: 16314569; PubMed Central PMCID: PMC1308908.

146. Lin H, Liu F, Zhang C, Zhang Z, Guo J, Ren C, et al. Pluripotent hair follicle neural crest stem-cell-derived neurons and schwann cells functionally repair sciatic nerves in rats. *Mol Neurobiol.* 2009 Dec;40(3):216-23. doi: 10.1007/s12035-009-8082-z. PMID: 19728182.

147. Yamazaki A, Obara K, Tohgi N, Shirai K, Mii S, Hamada Y, et al. Implanted hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells encapsulated in polyvinylidene fluoride membrane cylinders promote effective recovery of peripheral nerve injury. *Cell Cycle.* 2017 Oct; 16(20):1927-32. doi: 10.1080/15384101.2017.1363941. PMID: 28886268; PMCID: PMC5638363.

148. Цимбалюк ВІ, Молотковець ВЮ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Лузан БМ, винахідники; ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова НАМН України», патентовласник. Спосіб визначення функціонального індексу сідничного нерва у щурів. Патент України №118156, МПК: G09В 23/28. Заявка № u201701183; 2017 лип 25.

149. Sakaue M, Sieber-Blum M. Human epidermal neural crest stem cells as a source of Schwann cells. *Development.* 2015 Sep;142(18):3188-97. doi:10.1242/dev.123034. PubMed PMID: 26251357; PubMed Central PMCID: PMC4582175.

150. Sieber-Blum M. Human epidermal neural crest stem cells as candidates for cell-based therapies, disease modeling, and drug discovery. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2014 Sep; 102(3):221-6. doi: 10.1002/bdrc.21073. Review. PubMed PMID: 25228472.

151. Tsymbaliuk VI, Petriv TI, Molotkovets VY, Vasyliiev RG, Tatarchuk MM, Burkush II. Development of walking track device for functional recovery analysis after experimental sciatic nerve injury. *Світ медицини та біології*. 2017; 3(61): 157-160. DOI: 10.26724/2079-8334-2017-3-61-157-160.

152. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Васильєв РГ, Медведєв ВВ, Молотковець ВЮ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ. Відновлення функції сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину в експерименті. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2018;1(95):12-17.

153. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ, Васильєв РГ. Ефективність пластики дефекту периферичного нерва з використанням тканинно-інженерних провідників різних типів за даними електронеуроміографії: експериментальне дослідження. *Український нейрохірургічний журнал*. 2017;4:60-6.

154. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ЮВ, Кліменко ПП, Васильєв РГ, Татарчук ММ. Ранні результати відновлення морфологічної структури сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину в експерименті. *Травма*. 2018;2(19):5-12.

155. Цимбалюк ВІ, Молотковець ВЮ., Петрів ТІ., Медведєв ВВ, Лузан БМ. винахідники; Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця, патентовласник. Пристрій для проведення тесту “ходьби по доріжці”. Патент України №118157, МПК: G09B 23/28. Заявка № u201701184; 2017 лип 25.

ДОДАТОК А

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Цимбалюк ВІ, Молотковець ВЮ, Медведєв ВВ, Лузан БМ, Петрів ТІ. Ефективність зварного з'єднання ушкодженого периферичного нерва щура за даними оцінки функціонального індексу сідничного нерва. Український неврологічний журнал. 2017; 2: 63-8.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, розробці дизайну дослідження, модифікації пристрою для проведення функціонального тесту, участь у проведенні функціонального тесту та аналізі отриманих цифрових даних, написанні основного тексту статті)

2. Tsymbaliuk VI, Petriv TI, Molotkovets VY, Vasyliiev RG, Tatarchuk MM, Burkush II. Development of walking track device for functional recovery analysis after experimental sciatic nerve injury. Світ медицини та біології. 2017; 3: 157-160.

(Особистий внесок здобувача полягає у розробці дизайну дослідження, виконанні оперативних втручань, самостійному проведенні функціонального тесту та аналізі отриманих цифрових даних, написанні основного тексту та підготовці статті до друку).

3. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ, Васильєв Р.Г. Ефективність пластики дефекту периферичного нерва з використанням тканинно-інженерних провідників різних типів за даними електронеуроміографії: експериментальне дослідження. Український нейрохірургічний журнал. 2017; 4: 60-6.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, розробці дизайну дослідження, проведенні оперативних втручань, участі у проведенні електронеуроміографічного дослідження та аналізі отриманих цифрових даних, узагальненні результатів, написанні основного тексту та підготовці статті до друку).

4. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Васильєв РГ, Медведєв ВВ, Молотковець ВЮ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ. Відновлення функції сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину в експерименті. Міжнародний неврологічний журнал. 2018; 1 (95): 12-18.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, визначенні функціонального індексу сідничного нерва, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку)

5. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ЮВ, Кліменко ПП, Васильєв РГ, Татарчук ММ. Ранні результати відновлення морфологічної структури сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину в експерименті. Травма. 2018; 2 (19): 5-12.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, участі у проведенні морфологічних методів досліджень узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку)

6. Цимбалюк ВІ, Молотковець ВЮ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Лузан БМ, винахідники; Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця, патентовласник. Спосіб визначення функціонального індексу сідничного нерва у щурів. Патент України №118156, МПК: G09В 23/28. Заявка № u201701183; 2017 лип 25.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту)

7. Цимбалюк ВІ, Молотковець ВЮ., Петрів ТІ., Медведєв ВВ, Лузан БМ. винахідники; Національний медичний університет ім.О.О.Богомольця, патентовласник. Пристрій для проведення тесту “ходьби по доріжці”. Патент України №118157, МПК: G09В 23/28. Заявка № u201701184; 2017 лип 25.

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту)

8. Цимбалюк ВІ, Лісяний МІ, Петрів ТІ. Оцінка регенерації сідничного нерва під впливом адгезивної фракції жирової тканини функціональним методом у експерименті. В матеріали науково-практичної конференції “Інновації у нейрохірургії” в рамках IV Міжнародного медичного конгресу “Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров’я України” Тези доповідей; 2015 квіт 16; Київ. Київ: Задруга; 2015. С.7.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, виконанні експерименту, узагальненні результатів, підготовці тез до друку)

9. Цимбалюк ВІ, Лісяний МІ, Петрів ТІ, Молотковець ВЮ, Станецька ДМ, Козакевич РБ, Камінський АА. Оптимізація методики проведення тесту Walking track для вивчення функціонального відновлення сідничного нерва у експерименті. В: Матеріали конференції «Нові тенденції в нейрохірургії» з лекційним курсом ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» в рамках 24-ї міжнародної виставки «Охорона здоров’я». Тези доповідей; 2015 вер 30; Київ. Київ: Українська Асоціація Нейрохірургів; 2015. С. 29.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, виконанні експерименту, узагальненні результатів, підготовці тез до друку)

10. Kozakevych RB, Petriv TI, Medvediev VV, Rybachuk OA, Vasyliiev RG, Zienkiewicz-Strzalka M. Development of chitosan/gelatin-based scaffolds for nerve tissue engineering. In: Materials of the Neurology and rehabilitation international symposium "Peripheral nerve reconstruction after severe injures"; 2016 may 19-21; Kyiv. Kyiv: National Bogomoletz Medical University; 2016. С. 19-20.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, узагальненні результатів, написанні та підготовці тез до друку)

11. Kozakevych RB, Bolbukh YuM, Tertykh VA, Petriv TI, Medvediev VV, Rybachuk OA, et al. Development of chitosan/carbon nanotubes composites for neural tissue engineering. In: Proceedings of Ukrainian conference with

international participation "Chemistry, Physics and Technology of Surface", Workshop "Nanostructured biocompatible / bioactive materials"; 2016 may 17-18; Kyiv. Kyiv: Chuiko Institute of Surface Chemistry of NAS Ukraine; 2016. P. 172.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, узагальненні результатів, підготовці тез до друку)

12. Petriv TI, Vasyliiev RG, Kozakevych RB, Tsymbaliuk VI. Cytocompatibility of neural crest-derived multipotent stem cells and chitosan-based matrices for peripheral nerve tissue engineering. In: Ukrainian Neurosurgery Conference "Traumatic injuries of the central and peripheral nervous system"; 2016 sep 15-16; Kamianets-Podilskyi, Ukraine. Kyiv: Ukrainian Neurosurgical Assosiation; 2016. P.87.

(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, узагальненні результатів, підготовці тез до друку)

13. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Васильєв РГ, Медведєв ВВ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ. Вплив мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на регенерацію периферичного нерва при його травматичному ушкодженні в експерименті за даними ЕНМГ. В: Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю "Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині"; 2017 лист 9-10; Київ. Київ: НАМН України, ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України"; 2017. Клітинна та органна трансплантологія, 2017; 5(2), С. 244.

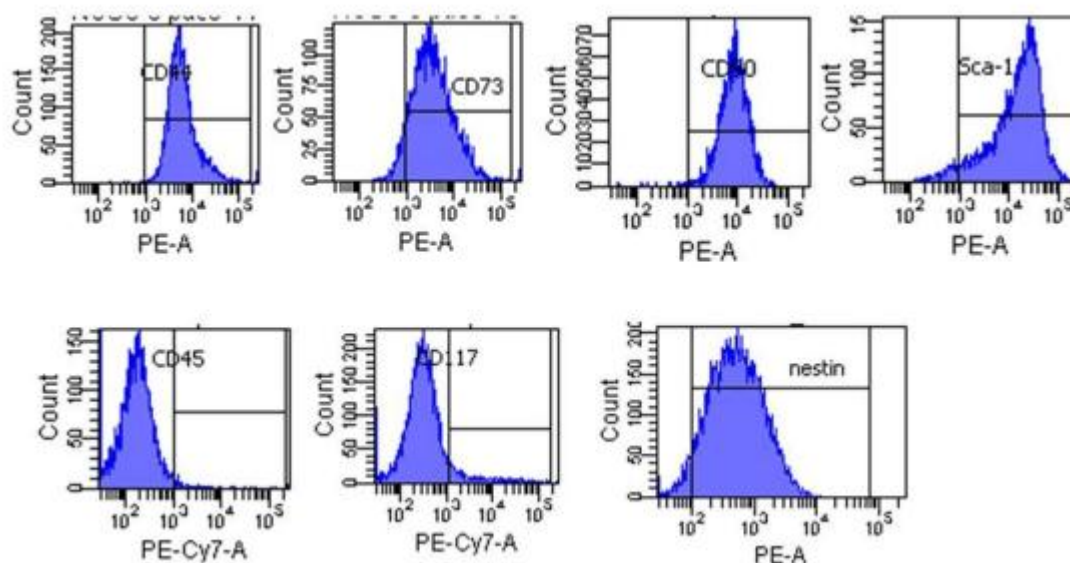
(Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, виконанні експерименту, узагальненні результатів, підготовці тез до друку)

ДОДАТОК Б

**Результати визначення імунофенотипових властивостей
стовбурових клітин нервового гребеня**

**Імунофенотип клітин культури СКНГ щура на P1 методом
проточної цитометрії**

Маркер	CD44	CD73	CD90	CD117 (c-kit)	Sca-1	nestin	CD45
Кількість позитивних клітин, % від загальної кількості клітин, $M \pm s$	98,92 $\pm$ 0,78	92,74 $\pm$ 4,78	99,51 $\pm$ 2,52	8,43 $\pm$ 1,86	95,52 $\pm$ 2,81	95,31 $\pm$ 2,34	0,21 $\pm$ 0,09



Імунофенотип культури постнатальних СКНГ щура на P1 методом проточної цитометрії. Репрезентативні гістограми експресії клітинами антигенів CD44, CD73, CD90, Sca-1, CD45, CD117 та нестину.

**Імунофенотип клітин культури постнатальних СКНГ щура на P5
методом проточної цитометрії**

Маркер	CD44	CD73	CD90	CD117 (c-kit)	Sca-1	nestin	CD45
Кількість позитивних клітин, % $M \pm s$	98,92 $\pm$ 0,78	92,74 $\pm$ 4,78	99,51 $\pm$ 2,52	8,43 $\pm$ 1,86	95,52 $\pm$ 2,81	95,31 $\pm$ 2,34	0,18 $\pm$ 0,11

За даними проточної цитометрії культури СКНГ на P1 містили більш ніж на 90% клітин, позитивних за маркерами стовбурових клітин (Sca-1 та нестін), та позитивних за класичними за маркерами мультипотентних МСК (CD44, CD73 та CD90). У культурі були відсутні CD45+ клітини, що свідчить про відсутність контамінації клітинами гемопоетичного походження. Імунофенотип СКНГ на п'ятому пасажі (P5) представлений у табл. 5.1.2, і не відрізняється від імунофенотипу СКНГ на P1.

Отже, отримані клітини в первинній культурі повністю відповідали описаним раніше критеріям для СКНГ із валика бруньки волосяного фолікула вібрисів щура за імунофенотипом та не змінювали вищевказаних характеристик під час пасажування.

ДОДАТОК В

Методика отримання стовбурових клітин нервового гребеня, що експерсують ген білка зеленої флюоресценції

День 0: клітини лінії Phoenix (комерційно доступна лінія клітин для збірки лентівірусних частинок, отримана на основі лінії HEK293) розсівали на чашки Петрі діаметром 10 см, покриті желатином (по 2 млн клітин на чашку). Для культивування використовували середовище: DMEM, 1мМ глутамін, 50ЕД / мл пеніцилін / стрептоміцин, 5% інактивованої нагріванням (60 хв, 56°C) ембріональної телячої сироватки (ETC).

День 1: клітини Phoenix трансфікували допоміжними плазмідами, що містять вірусні гени Rev (19% по масі від загальної кількості ДНК), RRE (37% по масі від загальної кількості ДНК), VSV-G (7% по масі від загальної кількості ДНК) і цільовою плазмідною, що несе ген GFP (LeGo-G2, комерційно доступний вектор, 37% по масі від загальної кількості ДНК), за допомогою трансфекційного агента Metafectene в пропорції 40 мкл Metafectene на 16 мкг ДНК на чашку Петрі діаметром 10см. Процедура трансфекції виконувалася по протоколу виробника трансфекційного агента Metafectene – Biontex.

Дні 3–5: починаючи з третього дня, кожні 24 години збирали вірусний супернатант, фільтрували його через 0.45мкм фільтр і заморожували в аліквотах по 1 мл при температурі — 70°C.

Інфікування клітин лентівірусами для визначення титру віруса.

За годину до інфікування в середовище для культивування до клітин Phoenix, що знаходиться в стані 20% — 80% моношару, додавали полібрен до концентрації 8 мкг/мл. Потім клітини інфікували вірусним супернатантом в різних розведеннях (1 : 1, 1 : 5, 1 : 25, 1 : 125, 1 : 625).

Визначення титру віруса.

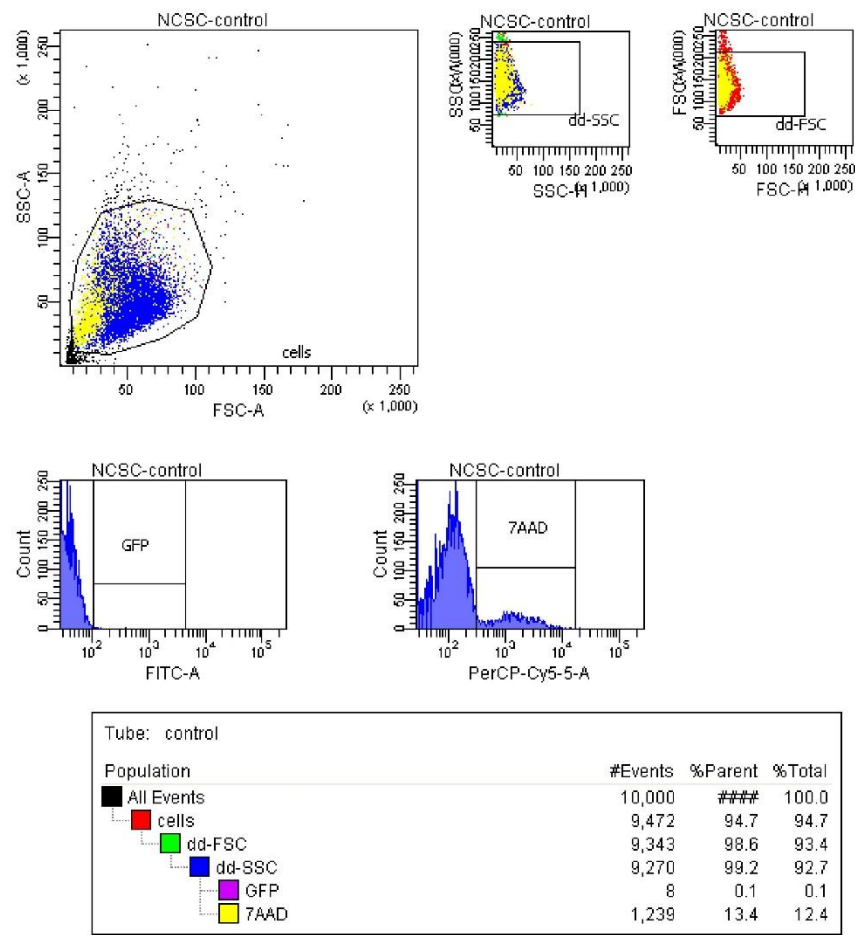
Через 48 годин після інфекції розраховували титр вірусу або MOI (multiplicity of infection). Титр для вірусу, який несе ген GFP, підраховували,

визначаючи відсоток флуоресціюючих клітин. На мікрофотографіях підраховували загальне число клітин і число клітин, що експресують трансген. За результатами підрахунку будували графіки залежності частки трансфікованих клітин від кількості вірусного супернатанта. Для тих розведень, частка трансфікованих клітин в яких була нижче 10%, тобто для точок, що знаходяться в ділянці лінійної залежності, ми припускали, що в кожную клітину потрапила одна вірусна частка. В такому випадку, число інфікованих клітин дорівнює числу доданих вірусних частинок у відомому обсязі.

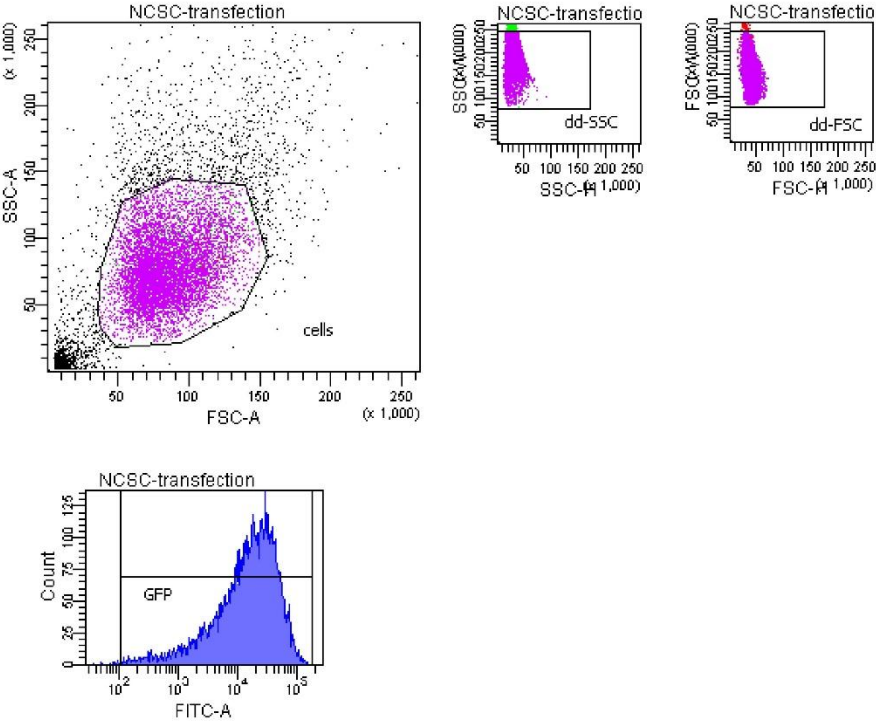
Трансдукція СКНГ і отримання клональних ліній СКНГ, трансгенних по GFP.

Для трансдукції по 0,5 млн СКНГ засівали в два покритих колагеном флакони T25 в повному поживному середовищі з інактивованої ETC і через 24 год проводили зміну середовища і додавали лентівірусний вектор з GFP з MOI=2, культивували до субконфлуентного стану, після чого пересівали по стандартному протоколу з паралельної оцінкою кількості GFP+ клітин методом проточної цитометрії. Для отримання клональних культур СКНГ трансгенних по GFP їх на наступному пасажі після трансдукції засівали у кількості 300 клітин на чашку Петрі діаметром 100 мм, культивували протягом 21 дня для формування клональних колоній, аналізували колонії за допомогою інвертованого флуоресцентного мікроскопа і відбирали 5 GFP+ колоній для отримань клональних культур. Подальшу експансію клональних колоній проводили за стандартним протоколом. Отримані клональні культури СКНГ аналізували методом проточної цитометрії на експресію GFP на цитофлюориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) на FITC-каналі. Також отримані клональні культури оцінювалися на експресію характерних маркерів СКНГ (Sox10, p75, Sox2 і nestin) за допомогою імуноцитохімічного аналізу і оцінювалася їх здатність до спрямованої диференціації в шванівські клітини.

Experiment_23112016 rat GFP P5



Experiment_23112016 rat GFP P5



Tube: transfection			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
cells	7,720	77.2	77.2
dd-FSC	7,659	99.2	76.6
dd-SSC	7,504	98.0	75.0
GFP	7,486	99.8	74.9