

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

ПЕТРІВ ТАРАС ІГОРОВИЧ

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

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

14.01.05 — нейрохірургія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Київ — 2019

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Роботу виконано в ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України».

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор, член-кореспондент НАН України, академік НАМН України **Цимбалюк Віталій Іванович**, Національна академія медичних наук України, президент.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук **Гайович Василь Васильович**, ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», старший науковий співробітник відділення мікрохірургії та реконструктивно-відновної хірургії верхньої кінцівки;

доктор медичних наук, професор **П'ятикоп Володимир Олександрович**, Харківський Національний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри нейрохірургії.

Захист відбудеться «09» липня 2019 року о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.557.01 в ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» за адресою: вул. П. Майбороди, 32, м. Київ, 04050.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» (вул. П. Майбороди, 32, м. Київ, 04050).

Автореферат розіслано «05» червня 2019 року

**Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
д-р мед. наук, старш. наук. співроб.**

О.Є. Скобська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 (Puzović V. et al., 2015; Torres R. et al., 2016). 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 (Puzović V. et al., 2015). Ушкодження периферичних нервів відзначають у 77% спостережень — при травмі верхньої кінцівки, у 23% — нижньої (Цимбалюк В.І. та ін., 2016).

В Україні кожного року травму периферичних нервів отримують 2,5–3 тис. потерпілих, з них у 60–75% встановлюють інвалідність (Цимбалюк В.І. та ін., 2017). У структурі травм опорно-рухового апарату ушкодження периферичних нервів становить від 1,5 до 6%, з них 90% — верхньої кінцівки (Rasulić L. et al., 2015). Під час військових дій цей показник складає 12% (Цимбалюк В.І. та ін., 2016), 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 (Цимбалюк В.І. та ін., 2017). 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 (Belanger K. et al., 2016). 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 (Hoffman R.M. et al., 2014; Najafzadeh N. et al., 2015). Тому використання стовбурових клітин нервового гребеня у відновному лікуванні ушкоджених периферичних нервів є раціональним (Lin H. et al., 2009; Sakaue M. et al., 2015).

Оптимальними для клінічного застосування є стовбурові клітини, які можна виділити у постнатальному періоді життя з мінімальною інвазивністю і застосувати аутологічно (Fairbairn N.G. et al., 2015; Jiang L. et al., 2017; Hakki S.S. et al., 2017).

Існування стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня (СКНГ), які присутні у постнатальному періоді життя, встановлено відносно недавно (Sieber-Blum M. et al., 2004).

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 (Sieber-Blum M., 2014).

Група вчених під керівництвом М. Sieber-Blum у 2004 році довели, що стовбурові клітини, які знаходяться у валику бруньки волосяного фолікула є стовбуровими клітинами (похідними) нервового гребеня (Sieber-Blum M. et al., 2004).

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) (Васильєв Р.Г. та ін., 2012, 2015).

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 (Amoh Y. et al., 2009; 2012; Amoh Y., Hoffman R.M., 2017).

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.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. 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 (похідних) 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 (похідних) 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 (похідних) 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.

Експерименти на тваринах проведені 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 №28 від схвалено Комітетом з біоетики ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» (протокол № 28 від 29.06.2018р.).

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 В.І. Цимбалюком 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, електронейроміографічних 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 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. 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». Розподіл лабораторних тварин на групи залежно від застосованих мікрохірургічних технік реконструкції представлений у табл. 1. 4 група тварин (псевдооперовані) використовувалися для отримання контрольних показників функціонального індексу СН. 3 тварини були відібрані для визначення функціональної активності СКНГ в складі тканинно-інженерного матрикса на 7 день.

Таблиця 1

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

Групи тварин	Тривалість експерименту			
	4 тижні		8 тижнів	
1. Аутонейропластика СН (n=14) (експериментальна група)	1А (n=7)		1В (n=7)	
	Еф	Гіст/ІГХ	Еф	Гіст/ІГХ
2. Пластика дефекту СН колагеновим матриксом, заповненим фібриновим гелем (n=15) (експериментальна група)	2А (n=7)		2В (n=8)	
	Еф	Гіст/ІГХ	Еф	Гіст/ІГХ
3. Пластика 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) (група порівняння)	4 (n=7)			
	Еф, Гіст/ІГХ			

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

Методика виділення та визначення імунофенотипу СКНГ. СКНГ виділялися методом експлантатів за М. Sieber-Blum та співавторами (Sieber-Blum M. et al., 2004) у модифікації Васильєва Р.Г. (Васильєв Р.Г., 2012) 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) щурів, виділялися волосяні фолікули вібрисів щурів. Після цього розсікали сполучнотканинну капсулу і витягували валик бруньки волосяного фолікула мікропінцетом. 3–5 експлантатів валика поміщали в покриту колагеном I 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 СВ 210 ("BINDER", Німеччина) при температурі 37°C у газовій суміші, що мала наступний склад: 90% N₂, 5% O₂ и 5% CO₂. Перший пасаж проводили на десяту добу в культуральний флакон 25 см². Наступні пересіви клітин здійснювали при досягненні культуурою субконфлуентного стану. 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».

Трансдукція і отримання СКНГ, трансгенних з геном білка зеленої флюоресценції. 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.

Методика виготовлення тканинно-інженерного матрикса на основі СКНГ та колагенової трубки. Тканинно-інженерний матрикс для пластики дефекту периферичного нерва виготовляли за двоетапною технікою. На першому етапі проводили імплантацію 200 тисяч СКНГ на внутрішню поверхню колагенового матрикса, що являв собою колагенову трубку довжиною 1,2 см. Для цього закривали один кінець трубки фрагментом фібрину, вносили суспензію клітин у поживному середовищі, та закривали другий кінець у такий же спосіб. Для рівномірного розподілу клітин матрикс поміщали у роллерну установку CellNest Roller D2 (SINO-BIOTOP, Китай), яка знаходилась у мультигазовому інкубаторі та культивували протягом 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 АСD-А ("Haemonetics", США) у співвідношенні 9:1 для отримання плазми збагаченої тромбоцитами (ПЗТ). Кров без антикоагулянту інкубували у термостаті при 37°C протягом години для її згортання. Потім центрифугували 20 хв при 4°C та 2300 g, відбирали супернатант (сироватка, що містить тромбін) та заморожували при - 80° С до використання. Кров за антикоагулянтом обробляли центрифугуванням для отримання ПЗТ. Потім ПЗТ піддавалась двом циклам заморожування-відтаювання і центрифугувалася 20 хв при 4°C та 2300 g. Супернатант (кріолізат ПЗТ) відбирався та зберігався при — 80°C до використання. Для формування фібринового розчину, клітини ресуспендували у 900 мкл кріолізату ПЗТ, додавали 100 мкл сироватки з активованим тромбіном (суміш 750 мкл сироватки з тромбіном з 250 мкл 10% розчину CaCl₂) та заповнювали цим розчином порожнину закритої з одного боку колагенової трубки, 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 протягом 24 годин.

Методика проведення хірургічних втручань. 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 СН зліва. За допомогою інструментів (затискач типу "москіт", пінцет хірургічний) тупо виділяли та мобілізували лівий СН. На відстані (20±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 атравматичною голкою з сертифікованою монофіламентною поліамідною ниткою №10/0 з використанням операційного мікроскопа (збільшення×12). У тварин групи 2 після формування дефекту 10±2 мм здійснювали негайну пластику зони діастазу СН з використанням колагенової трубки заповненої фібриновим матриксом шляхом епіневральної фіксації. У тварин групи 3 діастаз між кінцями СН усували аналогічним чином, проте, колагенову трубку попередньо заповнювали алогенними СКНГ у кількості 1×10⁶ клітин. У тварин групи 4 після проведення аналогічного хірургічного доступу до СН та його мобілізації рану пошарово ушивали без виконання невротомії. Після ретельного гемостазу в усіх групах тварин пошарове зашивання післяопераційної рани проводилося за допомогою 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 тварини усіх груп отримували однакове харчування та утримувались згідно норм віварію.

Проведення функціонального тесту відновлення СН. 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 (Johnson T.S. et al., 2007) у нашій модифікації (Цимбалюк В.І. та ін., 2017). Для отримання відбитків підшовних 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. 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 4о пальця. Всі показники визначали у міліметрах для експериментальної (E) та інтактної (N) кінцівок. SFI визначали за допомогою формули Bain-Mackinnon-Hunter (Bain J.R. et al., 1989):

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

Показник розраховували в усіх групах тварин протягом 8 тижнів щотижнево.

Проведення електрофізіологічного дослідження. ЕНМГ виконували у тварин усіх експериментальних груп через 4 та 8 тижнів після операції. Після загальної анестезії тварин шляхом внутрішньоочеревинного введення суміші розчинів ксилазину гідрохлориду з розрахунку 15 мг/кг і кетаміну гідрохлориду з розрахунку 70 мг/кг маси, вони фіксувалися на операційному столику у середньому фізіологічному положенні черевцем донизу. Вздовж хвоста фіксували електрод заземлення (металізована стрічка, змочена 0,9 % розчином натрію хлориду, шириною 20 мм, довжиною 100 мм), тупо виділяли СН від місця виходу з малого тазу до розподілу його на гілки на лівій (експериментальній) та правій (інтактній) задніх кінцівках. Для проведення ЕНМГ, нерв охоплювали платиновим гачкоподібним біпорлярним 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. Інтенсивність стимуляції підбиралася індивідуально, виходячи з того рівня, при якому досягали максимальної амплітуди М-відповіді (Амв) і становила в середньому 2,5±0,5 мА (3,0±0,5 мВ) Реєстрацію збудження проводили вказаним електронейроміографом за допомогою концентричного голкового електроду (довжина — 25 мм, діаметр — 0,3 мм, площа відведення — 0,015 мм²) у руховій точці литкового м’язу. Відстань між стимулюючими та реєструючим електродами становила ~30 мм. Аналіз функції нервово-м’язового апарату лабораторних тварин здійснювали на підставі Амв та латентного періоду М-відповіді (ЛПмв). Для аналізу відбирали тільки показники амплітуди максимальної М-відповіді, отримані у більшості випадків — при силі стимулюючого струму у 3 мА.

Проведення імуногістохімічного та морфологічного досліджень. Через 4 тижні після операції 7 тварин з першої групи, 7 тварин з другої групи та 8 тварин з третьої групи виводили з експерименту. Через 8 тижнів після операції виводили з експерименту 7 тварин першої групи, 8 тварин другої групи і 8 тварин 3 групи. Після загальної анестезії мобілізували СН тварин з обох сторін. Виведення вищевказаних тварин з експерименту відбувалося після проведення прямої стимулюючої ЕНМГ. Для гістологічного та імуногістохімічного дослідження використовувалися: у першій групі 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 матеріал фіксували у 10% нейтральному розчині формаліну впродовж до 48 год, із наступною стандартною парафіновою проводкою. Отримували зрізи товщиною 5 мкм на мікротомі. Потім зрізи депарафінізували у ксилолі та імпрегнували азотнокислим сріблом за Більшовським-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.

Для імуногістохімічного дослідження регенератів нерва використовували такі антитіла: кролячі поліклональні до S100 β (1 : 250, Invitrogen, США), p75 (CD271, LNGFR) (1 : 500, BioLegend, США), MBP (myelin basic protein, основний білок мієліну) (1 : 100, BioLegend, США), β -III-tubulin (β -тубулін III-го типу) (1 : 200, Sigma, США). Мікроскопію проводили на інвертованому флюоресцентному 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. Статистичну значущість відмінності між групами проводили за допомогою U-тесту Mann–Whitney та у межах кожної з груп на різних термінах спостереження з використанням парного тесту Вілкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test). У всіх випадках припущення щодо статистичної значущості отриманого результату вважали вірним, якщо ймовірність нульової гіпотези була меншою ніж 0,05 ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення. За даними функціонального тесту у групах 1 і 3 спостерігали динаміку SFI, яка характеризувалася двофазністю. Перша фаза включала практично лінійне зростання SFI від значення у — 70 на 1 тижні спостереження до — 35 станом на кінець 4 тижня спостереження. У групі 1 статистично значуще щотижневе збільшення 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 SFI. Третю фазу спостерігали на 8 тиждень: збільшення SFI групи 3 цій точці виявилось статистично значущим ($p=0,01$). Характерною для 2 групи була відсутність фази приросту SFI протягом 2 тижня спостереження. У подальшому, протягом 3–4 тижня виявляли достовірне збільшення SFI ($p<0,01$), стабілізацію (протягом 5–6 тижня), збільшення SFI на 7 тиждень ($p=0,036$), порівняно зі значенням SFI станом на 5 тиждень 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 поганий кінцевий морфофункціональний результат відновного процесу у цій групі обумовлений відсутністю динаміки відновного процесу протягом 1 і 2 тижнів 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 SFI 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. Порівняно з результатами тестування тварин групи 4 показники SFI груп 1, 2 і 3 виявилися значущо ($p < 0,05$) меншими протягом усього періоду експерименту. Лінійна динаміка значення SFI, виявлена у групах 1, 2 і 3, може опосередковано відображати приріст кількості нервових волокон, що реінервують м'язи паретичної кінцівки. Лінійне збільшення кількості волокон можливе за умови нерівномірності їх росту з існуванням конусів росту окремих волокон у товщі нерва. За таких умов, враховуючи сталу швидкість росту нервових волокон, однак нерівномірну ініціацію цього процесу серед регенеруючих волокон, ймовірно, досягають м'яза не всі конуси росту. У подальшому збільшення кількості волокон, що досягли м'яза, зростатиме зі сталою швидкістю, лінійно. У такій моделі регенераційна пауза протягом перших 2 тижнів у групі 2 свідчить про затримку проростання нервових волокон, чого нема у групах 1 і 3; після доростання нервових волокон до цілі швидкість їх росту в групі 2 стає аналогічною групам 1 і 3 (Рис.1).

Отже, у групах 1 і 3 існують більш сприятливі умови росту аксонів, і якщо у випадку аутонейропластики такі умови слід пов'язувати з тунельованою структурою сполучнотканинного каркаса аутотрансплантата, частково заповненого клітинами шваннівської глії, то у випадку імплантації тканинно-інженерного матрикса з СКНГ, швидший ріст волокон відбувається, ймовірно, через швидшу векторизацією порожнини матрикса за участю шваннівських нащадків імплантованих СКНГ, стимулюючим впливом цих клітин на ріст аксональних конусів у бік дистального кінця нерва, що доводить результативність імплантації тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ максимально наближеним до аутонейропластики, опосередковано, за даними функціонального тесту. Модифікований пристрій для визначення функціонального індексу СН дозволяє достовірно його оцінити, шляхом порівняння із групою псевдооперованих тварин.

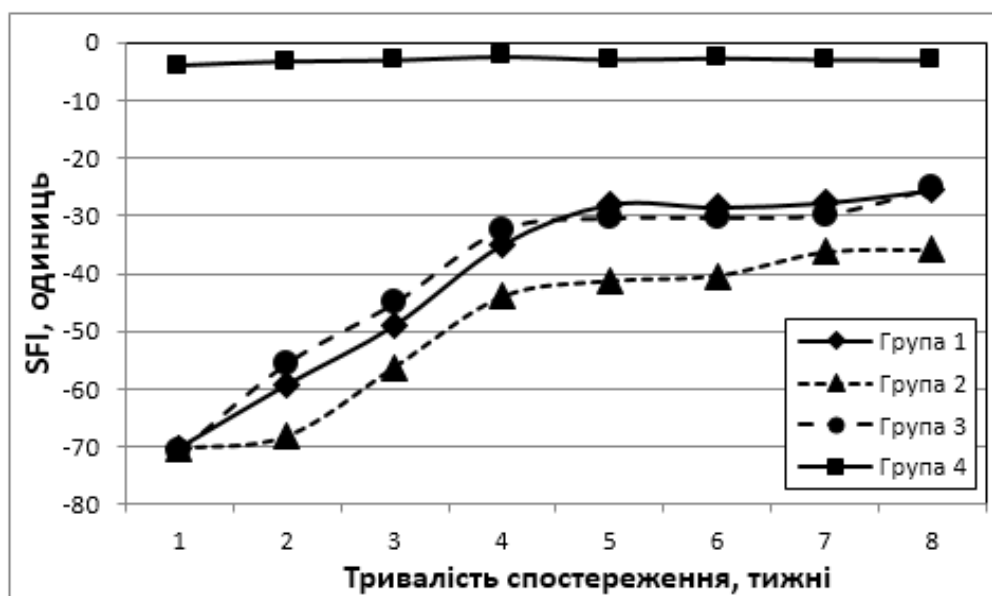


Рис. 1. Значення функціонального індексу СН (SFI) у експериментальних групах протягом 8 тижнів

За даними ЕНМГ показниками норми вважали показники Амв та ЛПмв інтактної кінцівки. Амв литкового м'яза оперованої кінцівки виражали у відсотках від Амв литкового м'яза інтактної кінцівки. Наприкінці 4 тижня спостереження у групі 1 Амв оперованої кінцівки (ОК) була статистично значущо ($p=0,018$) менша, ніж інтактної кінцівки (ІК) — відповідно $3,3\pm 0,5$ та $16,5\pm 2,3$ мВ і складала 27,9% від норми. У групах 2 і 3 відзначали статистично значуще ($p=0,018$) переважання Амв ІК: в групі 2 — $16,5\pm 2,3$ і $0,9\pm 0,2$ мВ; в групі 3 — $14,7\pm 2,2$ та $2,3\pm 0,2$ мВ; ($p=0,018$), що складало 14,24% і 18,3% від норми. При порівнянні досліджуваних груп між собою, наприкінці 4 тижня статистично значущих відмінностей показників ЕНМГ в ІК не було. Амв у групі 2 — $0,9\pm 0,20$ мВ статистично значущо менша, ніж в групі 1 — $3,3\pm 0,50$ мВ ($p=0,006$); в групі 3 — $2,3\pm 0,20$ мВ ($p=0,002$); в групі 4 — $16,6\pm 1,4$ мВ ($p=0,006$), а Амв у групах 1 і 3 статистично значущо менша, ніж в групі 4 ($p=0,004$). Наприкінці 8 тижня спостереження у групі 1 Амв ОК була статистично значущо ($p=0,017$) менша, ніж 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; $p=0,007$). Достовірна 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). Різниця значень аналогічного показника ІК виявлено не було.

Значення ЛПмв ОК у групі 2 ($4,09\pm 1,97$ мс) достовірно поступалося значенню у групі 1 ($1,26\pm 0,16$ мс; $p=0,009$), групі 3 ($1,86\pm 0,26$ мс; $p=0,002$) і групі 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, $p=0,045$) (Рис.2).

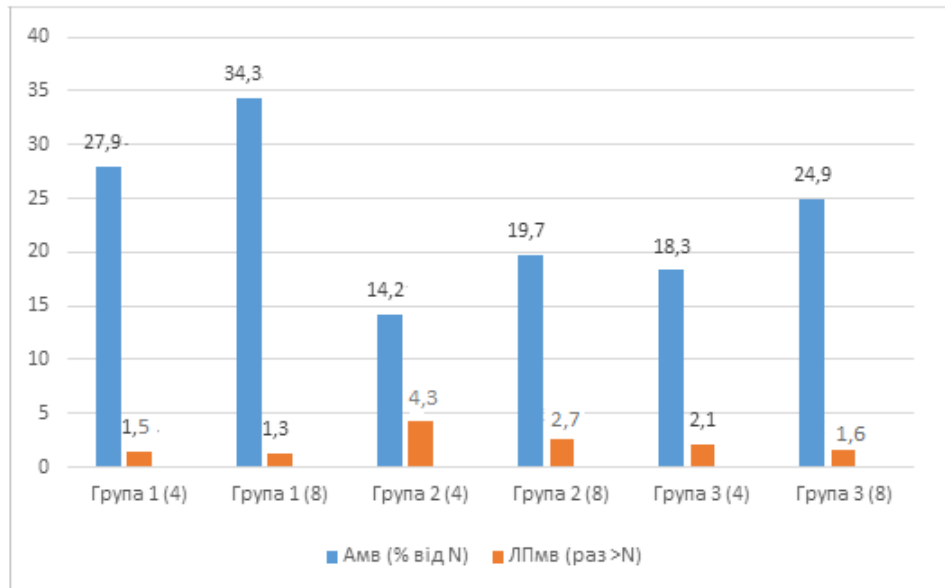


Рис. 2. Порівняльна характеристика показників амплітуди М-відповіді (Амв) та латентного періоду М-відповіді (ЛПмв) через 4 та 8 тижнів

Жодних статистично значущих відмінностей між показниками ІК експериментальних груп на зазначеному терміні спостереження не виявлено. Отже, після АНП протягом перших 4 тижнів опосередковано виявляли переважно проростання волокон великого діаметру (про що свідчать нижчі показники ЛПмв), чого не спостерігали при імплантації тканинно-інженерного матрикса, та відзначали меншою мірою — при імплантації тканинно-інженерного матрикса з СКНГ. На 2 місяці після імплантації тканинно-інженерного матрикса з СКНГ опосередковано, за даними ЕНМГ відзначали результативну реіннервацію м'яза переважно волокнами великого діаметру (через 8 тижнів ЛПмв не відрізнявся від такого в ІК). Результат реіннервації після АНП та імплантації тканинно-інженерного матрикса у поєднанні з СКНГ за показниками ЕНМГ у цілому співставний, відзначено статистично незначущу різницю електрофізіологічного спектру волокон, що реіннервували паретичний м'яз, що робить імплантацію тканинно-інженерного матрикса із вмістом СКНГ максимально наближеною до аутонейропластики за даними ЕНМГ.

За даними імуногістохімічного дослідження, на 7 добу експерименту у тканинно-інженерних матриксах із вмістом СКНГ виявляли експресію фактора p75, що дозволяє судити про наявність СКНГ. Вони підтримують життєдіяльність у тканинно-інженерному матриксі, про що свідчить забарвлення Hoechst 33342 та забарвлення GFP, яке свідчить, що саме ці клітини є трансплантованими СКНГ. Маркер p75 характерний для шванівських клітин, які перебувають на ранніх етапах диференціювання. Експресія білка S100b, що характерна для шванівських клітин, дозволяє припустити, що у тканинно-інженерному матриксі СКНГ набувають ознак шванівського фенотипу (Рис. 3).

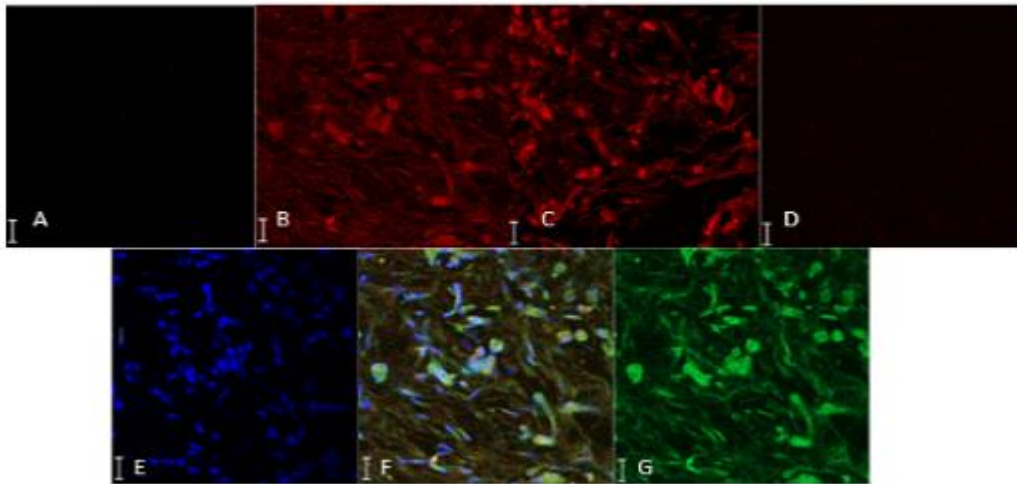


Рис. 3. Імуногістохімічний аналіз на 7 добу експерименту. експресії білків А-β-ІІІ-тубулін, В-р75, С-S100b, D-MBP, Е-ядра клітин Hoechst 33342, F-поєднане зображення, G-GFP. Збільшення $\times 200$

У зоні дефекту нервового стовбура значного розміру після імплантації тканинно-інженерних матриксів із СКНГ не виявляли експресії β -ІІІ-тубуліну, який є маркером нейрональної диференціації, а також основного білка мієліну, що свідчить про відсутність мієлінізованих нервових волокон у тканинно-інженерному матриксі на 7 день. Через 4 тижні у тканинно-інженерному матриксі зберігалася менш інтенсивна експресія р75, що вказує на присутність СКНГ, що втрачають мультипотентність (рис. 4). Через 8 тижнів експресія р75 у тканинно-інженерному матриксі відсутня, що опосередковано говорить про диференціювання СКНГ у зрілі шванівські клітини.

Експресія основного білка мієліну у тканинно-інженерних матриксах на 4 та 8 тижнях, дозволяє говорити про проростання мієлінізованих нервових волокон у порожнині матрикса (Рис. 5).

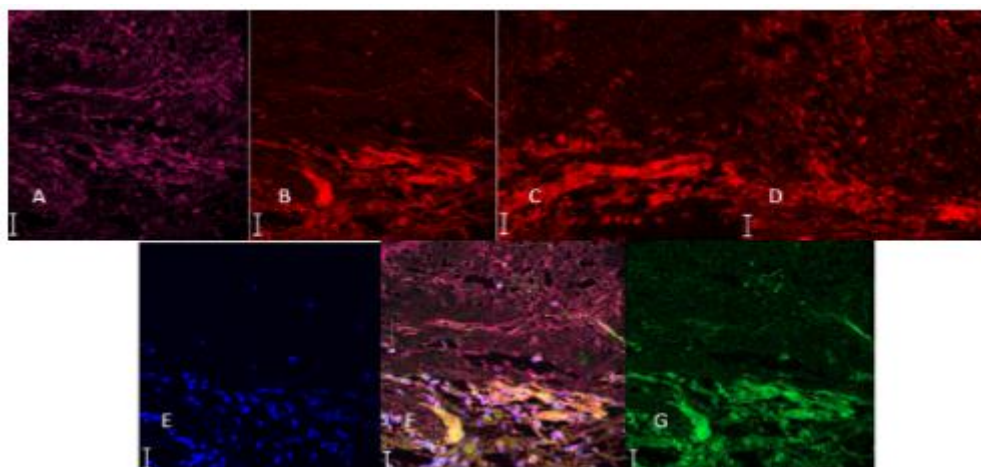


Рис. 4. Імуногістохімічний аналіз на 4 тиждень експерименту. експресії білків А-β-ІІІ-тубулін, В-р75, С-S100b, D-MBP, Е-ядра клітин Hoechst 33342, F-поєднане зображення, G-GFP. Збільшення $\times 200$

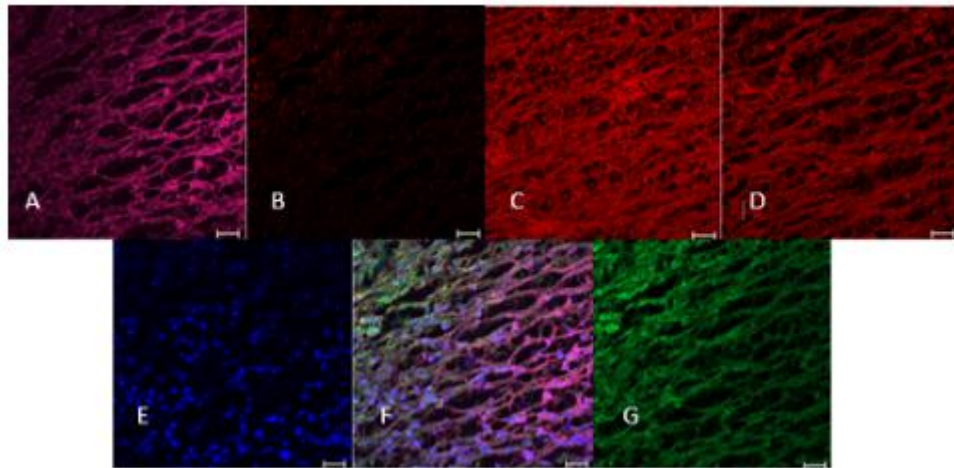


Рис. 5. Імуногістохімічний аналіз на 8 тижень експерименту. експресії білків А-β-III-тубулін, В-p75, С-S100b, D-MBP, Е-ядра клітин Hoechst 33342, F- поєднане зображення, G-GFP. Збільшення ×200

СКНГ зберігають функціональну активність до 8 тижня після трансплантації у складі імплантованого тканинно-інженерного матрикса і диференціюються у шванівські клітини, які здатні мієлінізувати нервові волокна.

Результати гістологічних методів дослідження. У групі 1 на 4 тижень на тлі посиленого розростання волокнистої сполучної тканини спостерігалось формування коротких тяжів нервових волокон, а також упорядковане їх розміщення. Товщина нервових волокон складала $0,002 \pm 0,0003$ мм. Щільність розташування аксонів складала $3566,8 \pm 598$ на 1 мм^2 . На 8 тижень експерименту подальше розростання волокнистої сполучної тканини не відбувалося. 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, через 4 та 8 тижнів експерименту є статистична різниця ($0,002 \pm 0,0003$ мм і $0,006 \pm 0,0004$ мм, $p=0,0003$). У той же час при порівнянні щільності розташування аксонів статистичної різниці не виявлено ($p=0,46$). У групі 2 на 4 тижень у серединній ділянці регенерату нерва відмічалось формування незначної кількості тонких, хаотично розташованих нервових волокон і слабо виражене формування пухкої сполучної тканини. Товщина нервових волокон складала $0,0061 \pm 0,004$ мм, Щільність розташування аксонів складала $1914,83 \pm 387,9$ на 1 мм^2 . При порівнянні товщини нервових волокон у групі 1 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 достовірної різниці не виявлено ($p=0,46$).

У групі 2 на 8 тижень відмічалось переважання у кількості нервових волокон у порівнянні із 4 тижнем ($1914,83 \pm 268,9$ на 1 мм^2 проти $2188 \pm 419,5$ на 1 мм^2). Різниця у щільності розташування аксонів у групі 2 в динаміці була статистично не достовірною ($p=0,46$). Також відмічалось посилене розростання сполучної тканини. Товщина волокон складала $0,009 \pm 0,002$ мм проти $0,008 \pm 0,001$ мм ($p=1,0$) і різниця між ними статистично недостовірна. При порівнянні щільності розташування аксонів у групах в динаміці, статистично достовірної різниці не було виявлено у жодній групі. У групі 1

3566,8±598 на 1 мм² і 3389±387,9 на 1 мм² на 4 та 8 тиждень відповідно (p=0,46). У групі 2 1914,83±268,9 на 1 мм² і 2188±419,5 на 1 мм² на 4 та 8 тиждень відповідно (p=0,43). У групі 3 3338,6±302,7 на 1 мм² і 3140,66±357 на 1 мм² на 4 і 8 тиждень відповідно (p=0,34). На 4 та 8 тижнях спостерігалася схожа динаміка при порівнянні груп 1 і 2, де статистично достовірно вищою щільність розташування аксонів була у групі 1 — 3566,8±598 на 1 мм² та 1914,83±387,9 на 1 мм² на 4 тиждень (p=0,02); 3389±387,9 на 1 мм² та 2188±419,5 на 1 мм² на 8 тиждень (p=0,02).

При порівнянні груп 2 та 3, також виявилася статистично значуща різниця на користь останньої групи: 1914,83±387,9 на 1 мм² та 3338,6±302,7 на 1 мм² на 4 тиждень (p=0,027); 2188±419,5 на 1 мм² та 3140,66±357 на 1 мм² на 8 тиждень (p=0,046).

Статистично недостовірною виявилася різниця між групами 1 та 3 як на 4 тиждень, так і на 8 тиждень: 3566,8±598 на 1 мм² та 3338,6±302,7 на 1 мм² (p=0,43) та 3389±387,9 на 1 мм² і 3140,66±357 на 1 мм² (p=0,24; 3140,66±357).

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

Слід зауважити, що для уточнення ефекту впливу СКНГ на регенерацію периферичного нерва доцільним є 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 Hoechst 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 (Патент України на корисну модель №118157) рекомендується для оцінки його за методикою “тесту з біговою доріжкою” (“Walking track test”). Спосіб визначення функціонального індексу сідничного нерва (Патент України на корисну модель №118156) пропонується для вивчення ступеня відновлення периферичного нерва за умов його дефекту великого розміру та оцінки ефективності реконструктивних нейрохірургічних операцій у експерименті.

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 РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Tymbaliuk 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).

2. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ, Васильєв Р.Г. Ефективність пластики дефекту периферичного нерва з використанням тканинно-інженерних матриксів різних типів за даними електронейроміографії: 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 електронейроміографічного дослідження та аналізі отриманих цифрових даних, узагальненні результатів, написанні основного тексту статті).

3. 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 вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, визначенні функціонального індексу сідничного нерва, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку).

4. 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).

5. 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, модифікації пристрою для проведення функціонального тесту, участь у проведенні функціонального тесту та аналізі отриманих цифрових даних, написанні основного тексту статті).

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: Задруга; 2015. С. 7.

(Особистий внесок здобувача полягає у виконанні експерименту, узагальнені результати).

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 виконанні експерименту, узагальнені результати, 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 виконанні експерименту, узагальнені результати, підготовці тез до друку).

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. Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», Київ, 2019 р.

Дослідження виконано на білих безпородних щурах різного віку і статі (n=55; 3 експериментальні групи). У якості моделі, адаптовано пластику нерва тканинно-інженерним матриксом на основі стовбурових клітин (похідних) нервового гребеня. Проведено функціональні, електрофізіологічні, культуральні, імуногістохімічні, гістологічні і статистичні дослідження. Протягом усього періоду спостереження між значеннями функціонального індексу сідничного нерва групи 1 (аутонейропластика) та групи 3 (імплантації тканинно-інженерного матрикса із вмістом стовбурових клітин нервового гребеня) вірогідних відмінностей не виявлено ($p > 0,05$). Негативні результати функціонального відновлення спостерігалися у групі 2 (імплантації тканинно-інженерного матрикса без стовбурових клітин), що свідчить про стимулюючий вплив стовбурових клітин на відновлення периферичного нерва та м'язово-суглобового апарату в експерименті. За даними ЕНМГ, показники амплітуди М-відповіді та латентного періоду М-відповіді литкового м'яза у групі 3 максимально наближені до показників у групі 1. Електрофізіологічні показники у групі 2 були нижчими. Через 4 тижні у тканинно-інженерному матрикса виявлялася експресія фактора p75, на відміну від 8 тижня, що опосередковано свідчить про морфогенез стовбурових клітин з фенотипом стовбурових клітин нервового гребеня у клітини з фенотипом шванівських до кінця цього періоду. Динаміка експресії β -Ш-тубуліну, S100b та MBP на 4 та на 8 тижнях говорить про проростання нервових волокон та їх мієлінізацію. Морфологія тканинно-інженерного матрикса за товщиною нервових волокон та щільністю розташування аксонів статистично достовірно не відрізнялася від ділянки нерва, відновленого шляхом аутонейропластики.

Можливе перспективне клінічне впровадження апробованих у дослідженні новітніх методів хірургічних втручань подолання дефектів периферичних нервів великого розміру за допомогою засобів тканинної інженерії сприятиме покращенню результатів лікування пацієнтів із травмами периферичних нервів та їх наслідками.

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

АННОТАЦИЯ

Петрив Т.И. Влияние трансплантации стволовых клеток нервного гребня на регенерацию периферического нерва при его травматическом повреждении в эксперименте. — Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.05 — нейрохирургия. Государственное учреждение «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины», Киев, 2019 г.

В диссертации на основании проведенного комплексного исследования представлены теоретическое обобщение и новый подход к решению научной проблемы преодоления больших дефектов периферических нервов, путем применения стволовых клеток, производных нервного гребня. Исследование выполнено на белых беспородных крысах-самцах весом 250 ± 50 г ($n=52$). Животные были разделены на 4 группы, 3 из которых, в свою очередь, разделяли на 2 подгруппы с временными промежутками наблюдения 4 недели и 8 недель. В качестве модели травмы периферического нерва использована модель пластики нерва ткане-инженерным проводником с стволовыми клетками нервного гребня в количестве 1×10^6 в одном матриксе. 4 группу животных (псевдооперированные) использовали для получения контрольных показателей функционального индекса седалищного нерва. Проведены функциональные, электрофизиологические, культуральные, иммуногистохимические, гистологические и статистические исследования.

По данным функционального теста в группах 1 и 3 наблюдали динамику SFI, которая характеризовалась двухфазностью. Первая фаза включала практически линейный рост показателя от значения в — 70 на 1 неделе наблюдения до — 35 состоянию на конец 4 недели наблюдения. В группе 1 статистически значимое еженедельное увеличение показателя регистрировали в течение 2–5 недели ($p < 0,05$), в группе 3 — в течение 2–4 недель. Вторая фаза длилась 6–7 и 5–7 недель в группе 1 и 3 соответственно и характеризовалась отсутствием изменений показателя. Характерной для 2 группы было отсутствие фазы прироста показателя в течение 2 недель наблюдения. В дальнейшем, в течение 3–4 недели проявляли достоверное увеличение показателя ($p < 0,05$), стабилизацию (в течение 5–6 недели), увеличение показателя в течение 7 недели ($p = 0,036$), по сравнению со значением по состоянию на 5 неделе наблюдения. Как и в группах 1 и 3, в случае имплантации ткане-инженерного проводника без СКНГ (группа 2), прирост SFI происходит в два этапа, длительность, а также продолжительность промежуточной фазы плато укорочена, результативность меньше. Полученные данные свидетельствуют о том, что конечный результат восстановительного процесса в этой группе обусловлен отсутствием положительной динамики в течение 2 недель наблюдения. В течение всего периода наблюдения между значениями SFI групп 1 и 3 достоверных различий не выявлено ($p > 0,05$). Худшие результаты функционального восстановления наблюдались в группе 2, что свидетельствует о стимулирующем влиянии стволовых клеток на восстановление периферических нервов и мышечно-суставного аппарата в эксперименте.

По данным ЭНМГ, показатели амплитуды М-ответа и латентного периода М-ответа в группе 3 максимально приближены к показателям в группе 1. После аутонейропластики в течение первых 4 недель происходило прораствание волокон большого диаметра (о чем свидетельствуют показатели ЛПмв), чего не наблюдалось при имплантации тканево-инженерного проводника, и отмечали в меньшей степени — при имплантации ткане-инженерного матрикса с СКНГ в группе 3. Электрофизиологические показатели в группе 2 были ниже. Результат реиннервации

после аутонейропластики и имплантации ткане-инженерного проводника в сочетании с СКНГ, по показателям ЭНМГ, в целом сопоставимый.

По данным иммуногистохимического анализа, через 4 недели в ткане-инженерном проводнике наблюдалась экспрессия фактора p75, в отличие от 8 недели, что говорит о дифференцировке стволовых клеток нервного гребня в зрелые шванновские клетки к концу этого периода. Экспрессия β -III-тубулина, S100b и МВР на 4 и на 8 неделе позволяет говорить о прорастании нервных волокон и их миелинизации. Гистоархитектоника нерва восстановленного путем пластики ткане-инженерным матриксом, по толщине нервных волокон ($0,0043 \pm 0,002$ мм на) 4 неделе и ($0,007 \pm 0,0001$ мм) на 8 неделе и плотность их расположения ($3338,6 \pm 302,7$ на 1 мм^2) на 4 неделе и ($3140,66 \pm 357$ на 1 мм^2) на 8 неделе статистически достоверно не отличаются от участка нерва, восстановленного путем аутонейропластики (толщина нейрофибрилл $0,029 \pm 0,0004$ мм на 4 неделе и $0,006 \pm 0,0004$ на 8 неделе, плотность их расположения $3566,8 \pm 598$ на 1 мм^2 на 4 неделе и $3389 \pm 387,9$ на 1 мм^2 на 8 неделе сутки, $p \leq 0,05$).

Клиническое внедрение апробированных в исследовании новейших видов преодоления больших дефектов периферических нервов с помощью средств тканевой инженерии будет способствовать улучшению результатов лечения пациентов с травмами периферических нервов и их последствиями.

Ключевые слова: травма, периферический нерв, стволовые клетки, фенотип нервного гребня, тканевая инженерия, эксперимент.

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 “Institute of neurosurgery named after. acad. AP Romodanov NAMS of Ukraine”, Kyiv, 2019.

In the dissertation on the basis of the conducted integrated research the theoretical generalization and a new approach to the decision of a scientific problem of restoration of large gaps of peripheral nerves, by application of neural crest stem cells is presented. The study was performed on white outbreed rats of mean weight 250 ± 50 (n=52).

As a model of peripheral nerve injury, a model of autografting is used by tissue-engineering scaffold on the basis of neural crest stem cells. All restorative microsurgical interventions are performed immediately after injury in the peripheral nerve gap area. Performed functional, electrophysiological, cultural, immunohistochemical, histological and statistical studies. During the entire period of observation between the values of the functional index of the sciatic nerve of the group 1 (autografting) and group 3 (implantation of the tissue-engineering scaffold with the contents of the neural crest stem cells), no probable differences were detected ($p > 0,05$). Poor results of functional recovery were observed in the group 2 (implantation of the tissue-engineering scaffold without stem cells), which indicates the stimulating effect of stem cells on the restoration of the muscle-

joint apparatus in the experiment. According to the EMG, the M-response amplitudes and the latency of the M-response in the group 3 are as close as possible to those of the 1 group. The electrophysiological parameters in the 2 group were worse. After 4 weeks, the tissue-engineering scaffold detected expression of the p75 factor, unlike the 8 week, indicating differentiation of the neural crest stem cells in mature Schwann's cells until the end of this period. Expression of β -III-tubulin, S100b and The MBP on the 4 and 8 weeks indicates of nerve fibers growth and their myelination. Morphology of the tissue-engineering scaffold in the thickness of the nerve fibers and the density of their location is statistically significantly different from the area of the nerve recovered by autograft.

Clinical implementation of the newest types of major defects restoration in the peripheral nerves with the help of tissue engineering techniques tested in the study will improve the treatment outcomes of patients with peripheral nerves injuries and their consequences.

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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Амв	—	амплітуда М-відповіді
АНП	—	аутонейропластика
ЕНМГ	—	електронеуроміографія
ІК	—	інтактна кінцівка
ЛПмв	—	латентний період М-відповіді
ОК	—	оперована кінцівка
СКНГ	—	стовбурові клітини з фенотипом нервового гребеня
СН	—	сідничний нерв
SFI	—	sciatic functional index (функціональний індекс сідничного нерва)