

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

*Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису*

ПАНТЕЛЕЙЧУК АНДРІЙ БОРИСОВИЧ

УДК 547.96:547.458:591.481.1:616-001-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ

**Застосування біополімерних (біодеградуючих)
матеріалів в експериментальній черепно-мозковій
травмі**

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22
Охорона здоров'я за спеціальністю 222 Медицина.

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

_____ Пантелейчук А.Б.

Науковий керівник:

д-р мед. наук

Каджая Микола Володимирович

Київ — 2022 р.

Перелік умовних скорочень.

ЧМТ – черепно- мозкова травма;

ЦНС – центральна нервова система;

СМР – спинномозкова рідина;

ТМО – тверда мозкова оболонка;

ПЖК–підшкірна жирова клітковина;

GAG (glucosaminoglycans)– глюкозаміноглікани;

ЧМП – черепно-мозкові поранення;

НДР – науково-дослідна робота;

ІЧ-спектроскопія – інфрачервона спектроскопія;

ІЧ – інфрачервоний;

ПЕО – поліетиленоксид;

пЧМТ – пенетраційна ЧМТ;

Г-Е – забарвлення гематоксилином і еозином;

ДТЧ – декомпресивна трепанація черепа;

PTFE (polytetrafluoroethylene) – політетрафторетилен;

FTIR (Fourier-transform infrared) spectroscopy –інфрачервона Фур'є-спектроскопія.

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| Анотація..... | 4 |
| Summary..... | 11 |
| Список публікацій за темою дисертації..... | 18 |
| Вступ..... | 21 |
| Розділ 1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..... | 35 |
| 1.1. Історія розвитку заміників ТМО, сучасний стан проблеми, перспективи її вирішення..... | 35 |
| 1.2. Принципи класифікації біополімерних заміників ТМО..... | 37 |
| 1.3. Перспективи розвитку заміників ТМО..... | 38 |
| 1.4. Біополімерні матеріали для виготовлення заміників ТМО..... | 42 |
| 1.4.1. Колаген..... | 42 |
| 1.4.2. Желатин..... | 45 |
| 1.4.3. Хітозан..... | 46 |
| 1.4.4. Поліетиленоксид (ПЕО)..... | 49 |
| 1.5. Вибір методів дослідження і експериментальної моделі черепно-мозкової травми..... | 50 |
| 1.5.1. Морфологічні методи..... | 50 |
| 1.5.2. Молекулярний аналіз біологічного матеріалу за допомогою інфрачервоної спектроскопії (ІЧ Фур'є-спектроскопія)..... | 52 |
| 1.5.3. Вибір експериментальної моделі черепно-мозкової травми..... | 53 |
| Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ..... | 56 |
| 2.1. Загальні положення..... | 56 |
| 2.2. Розподіл тварин на експериментальні групи..... | 56 |
| 2.3. Моделювання проникаючої ЧМТ (хірургічна частина експерименту).... | 57 |
| 2.4. Макроскопічна оцінка вираженості рубцево-спайкової тканини в зоні трепанаційного вікна..... | 67 |
| 2.5. Гістологічні методи..... | 68 |

| | |
|--|-----|
| 2.5.1. Світлооптична мікроскопія..... | 68 |
| 2.5.2. Конфокальна мікроскопія..... | 70 |
| 2.6. Інфрачервона спектроскопія..... | 71 |
| 2.7. Статистичні методи..... | 76 |
| Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ МАКРОСКОПІЧНОГО МЕТОДУ ДОСЛІДЖЕННЯ..... | 77 |
| Розділ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ГІСТОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ... | 94 |
| 4.1. Світлооптична мікроскопія..... | 94 |
| 4.2. Конфокальна мікроскопія..... | 129 |
| Розділ 5. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ВІДНОВЛЕНОЇ ТВЕРДОЇ ОБОЛОНИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ МЕТОДОМ ІНФРАЧЕРВОНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ..... | 139 |
| Розділ 6. КОРЕЛЯЦІЙНИЙ АНАЛІЗ | 150 |
| ОБГОВОРЕННЯ І ПІДСУМКИ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ..... | 154 |
| Висновки..... | 160 |
| Практичні рекомендації..... | 163 |
| Список використаних літературних джерел..... | 164 |
| Додатки..... | 186 |

АНОТАЦІЯ

Пантелейчук А.Б. Застосування біополімерних (біодеградуєчих) матеріалів в експериментальній черепно-мозковій травмі. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22 Охорона здоров'я за спеціальністю 222 Медицина. Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова Національної академії медичних наук України», Київ, 2022 р.

В дисертаційному дослідженні проведено комплексне вивчення впливу біополімерних біодеградуєчих плівкових матеріалів на регенерацію твердої мозкової оболони (ТМО) на моделі проникаючої черепно-мозкової травми (ЧМТ) з декомпресивною трепанацією черепа, доведена їх ефективність і безпечність використання. В дослідженні було застосовано наступні методи: експериментальний (відтворення в експерименті проникаючої ЧМТ з декомпресивною трепанацією черепа, трансплантація різних видів штучних оболонок), патоморфологічний макроскопічний (оцінка ступеню адгезії тканин за модифікованою шкалою Stryker; оцінка наявності чи відсутності ліквореї; оцінка ознак запалення), гістологічний метод в т.ч. конфокальна мікроскопія (оцінка резорбції матричного матеріалу, об'єктивна оцінка інтенсивності регенерації ТМО, об'єктивна оцінка кількості новоутворених колагенових волокон), морфометричний метод (вимірювання товщини відновленої ТМО), метод інфрачервоної спектроскопії (фізична молекулярна характеристика регенерованої ТМО), статистичний (визначення статистично значимих відмінностей між експериментальними групами).

Мета роботи - оцінити вплив біополімерних (біодеградуєчих) плівкових матеріалів (желатину, колагену і хітозану) на регенерацію ТМО після декомпресивної краніектомії на моделі проникаючої черепно-мозкової травми у щурів.

Дослідження виконано на 120 білих щурах-самцях масою 250-300 г, середній вік тварин 10-12 міс. Тварин було розділено на 6 груп (5 досліджуваних груп і група псевдооперованих тварин (контроль)) по 20 тварин у кожній групі: №1- проникаюча ЧМТ з аутопластикою ТМО, №2- проникаюча ЧМТ з пластикою ТМО хітозановою плівкою, №3- проникаюча ЧМТ з пластикою ТМО хітозановою плівкою в комбінації з желатиновою плівкою, №4- проникаюча ЧМТ з пластикою ТМО колагеновою плівкою, №5- проникаюча ЧМТ з пластикою ТМО колагеновою плівкою в комбінації з желатиновою плівкою, №6- група псевдооперованих тварин. Кожна з груп поділялася на дві підгрупи: для отримання результатів спостереження на 3 і 6 тижнів дослідження.

Біополімерні плівки на основі хітозану являють собою новий експериментальний композитний матеріал, з масовою часткою хітозану 70% і масовою часткою поліетиленоксиду (ПЕО) 30% - хітозан-ПЕО 70/30мас.%. Товщина плівок на основі хітозану 0,025 мм. Плівки розроблені і виготовлені у відділі хемосорбції і гібридних матеріалів Інституту хімії поверхні ім.О.О.Чуйка, Київ, Україна. Колагенові плівки, які були використані в дослідженні є комерційно доступними, являють собою натуральну девіталізовану сполучно-тканинну мембрану кінського походження. Середня товщина- близько 0,2 мм. Желатинові плівки також були розроблені і виготовлені у відділі хемосорбції і гібридних матеріалів Інституту хімії поверхні ім.О.О.Чуйка, Київ, Україна. Їх середня товщина близько 0,3 мм.

Усі хірургічні втручання виконували під загальним знеболенням, шляхом внутрішньом'язового введення суміші розчинів ксилазину (Sedazin, Biowet, Польща) з розрахунку 15 мг/кг і кетаміну (Calipsol, Gedeon Richter, Угорщина) з розрахунку 70 мг/кг маси.

Тваринам виконували краніотомію у правій тім'яній ділянці, розкривали ТМО і моделювали травму мозку з наступною пластикою ТМО різними видами полімерних плівок. Після видалення шерстистого покриву голови і дезінфекції розчином бетадину 10 % (Betadine, Egis, Угорщина) проводили

розріз по середній лінії і оголювали кістки склепіння черепа. Формували трепанаційний отвір розміром 4×7 мм в правій тім'яній ділянці за допомогою висошвидкісного дрилю. Кістковий клапоть відсепаровували від підлеглої ТМО і видаляли. ТМО обережно розсікали хрестоподібно від середини отвору до його кутів. Для цього під ТМО в центрі трепанаційного вікна заводилася голка розміром G 32, потім ТМО обережно підтягувалася, надсікалася скальпелем і далі розсікалася ножицями від середини до кутів трепанаційного вікна. Оголювали поверхню мозку і проводили penetрацію кори головного мозку голкою G 18 на глибину 2 мм, перпендикулярно до поверхні кори. Кровотечу з кіркових судин зупиняли за допомогою ватної кульки, яку потім видаляли. Таким чином було змодельовано вогнище геморагічного забою.

У тварин групи №1 після забезпечення гемостазу клапті твердої мозкової оболони уклалися на місце (з діастазом між краями) і рана ретельно ушивалася, при цьому кістковий клапоть на місце не укладався. Таким чином було змодельовано декомпресивну трепанацію черепа при тяжкій ЧМТ. Після забезпечення гемостазу рану ушивали шовним матеріалом вікріл №5 і повторно обробляли розчином бетадину. Проводили антибіотикопрофілактику (цефтріаксон внутрішньом'язово 20 мг/кг).

Для тварин групи №2 всі хірургічні маніпуляції проводилися аналогічно, але після penetрації мозку і укладання на місце клаптів твердої мозкової оболонки поверх них укладалася хітозанова плівка (за розміром, відповідним трепанаційному вікну).

Для тварин групи №3 всі хірургічні маніпуляції проводилися аналогічно, але після penetрації мозку і укладання на місце клаптів твердої мозкової оболонки поверх них укладалася хітозанова плівка (за розміром, відповідним трепанаційному вікну) і потім укладалася желатинова плівка (розміром 6×9 мм) поверх кісткового вікна. Таким чином зона трепанаційного отвору ізолювалася від тканин скальпа.

Для тварин групи №4 всі хірургічні маніпуляції проводилися аналогічно, але після penetрації мозку і укладання на місце клаптів твердої мозкової оболонки

поверх них укладалася колагенова плівка (за розміром , відповідним трепанаційному вікну).

Для тварин групи №5 всі хірургічні маніпуляції проводилися аналогічно, але після penetрації мозку і укладання на місце клаптів твердої мозкової оболонки поверх них укладалася колагенова плівка (за розміром , відповідним трепанаційному вікну) і потім укладалася желатинова плівка (розміром 6×9 мм) поверх кісткового вікна. Таким чином зона трепанаційного отвору ізолювалася від тканин скальпа.

Для тварин групи №6 хірургічна процедура обмежувалася лише введенням в наркоз і розрізом шкіри голови, оголенням кісток склепіння черепа з наступним ушиванням м'яких тканин. Також проводилася обробка рани бетадином і антибіотикопрфілактика (у тій же дозі). Краніотомія і моделювання травми не проводилися. Це пов'язано з необхідністю отримання інтактною ТМО (ТМО не може вважатися інтактною після від сепарування від неї кісткового клаптя).

Тварин виводили з експерименту на 3 і 6 тижні шляхом декапітації під наркозом кетаміном 0,1 % – 2 мл.

Результати проведених досліджень. Спільними ознаками усіх досліджуваних груп було: відсутність виражених запальних змін в зоні операції як макроскопічно, так і за даними гістологічних методів дослідження; відсутність ліквореї (герметизація субдурального простору підтверджена світлооптичною мікроскопією); у всіх оперованих тварин операційна рана загоїлася *per primum* і тварини добре перенесли операцію, що свідчить про гарну біосумісність обраних нами матеріалів.

Також результати демонструють, що в усіх оперованих тварин в зоні операції формуються рубцево-спайкові злуки ступінь вираженості яких і структурні характеристики залежать від застосованого пластичного матеріалу (або матеріалів). Тканини регенерованої ТМО в зоні операції також мали свої конкретні, характерні тільки для певної досліджуваної групи особливості.

Група №1 (аутопластика). За даними морфологічного гістологічного дослідження - найбільш інтенсивні процеси відновлення тканин відбуваються саме в цій досліджуваній групі (досягаючи на 6 тиждень $18,8 \pm 1,3$ балів), достовірно відрізняючись від інших досліджуваних груп і від групи контролю, $P < 0,05$). Одночасно з процесами відновлення нормальної структури ТМО відбуваються процеси утворення рубцево-спайкової тканини, яка є найбільш вираженою саме в цій групі ($3,6 \pm 0,2$ бали, достовірно відрізняючись від інших досліджуваних груп, крім групи колаген-желатин, $P < 0,05$). Товщина утвореного регенерату ТМО корелює з інтенсивністю аутофлюорисценції - за даними конфокальної мікроскопії. Дані ІЧ-спектроскопії підтверджують формування нормальної структури ТМО на початковій стадії дослідження і наявність помітного рубцювання в товщині регенерату ТМО у більш пізній строк.

Група №2 (пластика хітозаном). Виявлено, що регенерація ТМО відбувається в основному шляхом формування регенерованої тканини, морфологічно близької до нормальної, при цьому рубцево-спайкова тканина в зоні операції мало виражена: числові значення модифікованої шкали STRYKER для цієї групи є найменшими ($1,0 \pm 0,0$ бали); а гістологічно виявлено, що відбувається поступова біодеградація хітозанової плівки і утворення сполучної тканини, морфологічно найбільш близької до інтактної ТМО. В даній групі регенерат мав найбільшу товщину серед усіх досліджуваних груп, її незначно перевершувала лише група хітозан з желатином ($407 \pm 48,8$ і $529,7 \pm 68,0$ відповідно), хоча інтенсивність репаративних процесів в досліджуваних групах (крім аутопластики) є приблизно однаковою. Конфокальна мікроскопія дає можливість кількісно оцінити кількість колагенових волокон в позаклітинному матриксі; виявлено їх відносно невелику кількість, яка співставна за цим показником з групою аутопластики ($12,9 \pm 0,07$ і $17,3 \pm 0,64$ відповідно, для зеленого спектру, термін спостереження 6 тижнів). Результати застосування в дослідженні ІЧ

спектроскопії для даної групи є дуже показовими: на молекулярному рівні виявлено, що відбувається заміщення молекул хітозану (полісахариду) білковими молекулами новоутвореного колагену (виявлено статистично достовірну різницю в інтегральній інтенсивності ІЧ спектру щодо контрольної групи).

Група №3 (пластика хітозаном і желатином). Морфологічною особливістю регенерату є більш пухке, «рихле» розташування новоутворених волокон колагену, порівняно до групи хітозану. Поєднання хітозану і желатину незначно збільшувало кількість злук ($1,5 \pm 0,2$ і $1,6 \pm 0,2$ відповідно) і досторіно впливало на збільшення товщини регенерату, порівняно з групою хітозану ($407,1 \pm 48,8$ і $529 \pm 68,0$ відповідно).

Група №4 (пластика колагеном). Репараційні процеси в тканині ТМО за характером інтенсивності були подібними до процесів в групах №2 і №3 і достовірно поступалися групі №1 ($18,8 \pm 1,3$ для аутопластики і $14,4 \pm 1,5$ для колагену на 6 тижні спостереження). За даними світлооптичної мікроскопії в цій групі було виявлено найбільшу щільність колагенових пучків (що підтверджується даними конфокальної мікроскопії (інтенсивність флюоресценції $36,7 \pm 0,59$ в групі колагену і $17,3 \pm 0,64$ в групі аутопластики, для зеленого спектру, термін спостереження 6 тижнів). За даними морфологічних методів дослідження рубцево – спайковий процес в зоні операції виражений помірно ($1,8 \pm 0,4$ в групі колагену відносно групи аутопластики $3,6 \pm 0,2$), а в товщині самого регенерату ТМО за даними ІЧ спектроскопії на початковій стадії експерименту чітких рубцевих змін не виявлено, у пізній строк – виявлено безсумнівні ознаки рубцевих змін тканини регенерату.

Група №5 (пластика колагеном і желатином). Інтенсивність процесів регенерації була подібною до групи колагену (на 6 тижні спостереження $12,4 \pm 1,1$ для групи колагену і $13,2 \pm 2,1$ для групи колаген-желатин). Особливістю є формування особливої гістоархітекtonіки регенерату, яка безумовно спричинена дією желатину: сформована тканина мала вигляд

ніжної і пухкої сполучної тканини, а пучки новоутворених волокон мали характерне лише для цієї групи «мереживне» розташування. Рубцево-спайкові процеси в даній групі також мали особливі відмінності: за модифікованою шкалою STRYKER рубцево-спайкові тяжі були найбільш виражені з усіх досліджуваних груп, де застосовувалися біополімери, і за цим показником поступалася лише групі аутопластики ($2,6 \pm 0,4$ для групи колаген-желатин і $3,6 \pm 0,2$ для групи аутопластики на 6 тижні спостереження). Водночас за даними ІЧ спектроскопії в товщині регенерату ознак рубцювання виявлено не було ні на 3 тижень, ні на 6 тижень експерименту. Тобто спектральні особливості тканин регенерату є найбільш близькими до контрольної ТМО саме в цій досліджуваній групі.

Таким чином у дисертації наведено вирішення актуального завдання сучасної нейрохірургії, а саме покращення результатів лікування важкої проникаючої черепно-мозкової травми шляхом розробки нових ефективних біополімерних матеріалів для пластики твердої мозкової оболонки, методик їх застосування для повноцінного відновлення герметизації твердої мозкової оболонки та зменшення утворення небажаної рубцево-спайкової тканини. Експериментально обґрунтовано можливість застосування обраних біополімерних матеріалів для пластики ТМО, підтверджена їх ефективність і безпечність у використанні. Дослідження розширює і доповнює наукові дані щодо впливу біополімерних (біодеградуючих) матеріалів на регенерацію твердої мозкової оболони.

Наукова новизна одержаних результатів: розроблено нову експериментальну модель для оцінки регенерації ТМО при важкій проникаючій ЧМТ; в дослідженні для пластики ТМО було застосовано нові (отримані експериментально) плівки на основі хітозану і желатину; вперше застосовано нову шкалу об'єктивної оцінки інтенсивності регенерації ТМО; вперше застосовано нову шкалу об'єктивної макроскопічної оцінки вираженості рубцево-спайкового процесу в зоні трепанаційного вікна; вперше для об'єктивної оцінки кількості новоутворених колагенових волокон у

регенерованій ТМО застосовано метод лазерної конфокальної флюорисцентної мікроскопії; отримані нові наукові дані щодо можливостей ІЧ-спектроскопії для оцінки стану регенерованих тканин ТМО.

Практичне значення. Отримані результати дозволяють рекомендувати обрані матеріали для подальшого клінічного випробування і впровадження в клінічну практику. Їх застосування імовірно покращить результати лікування пацієнтів з проникаючими черепно-мозковими травмами.

Ключові слова: проникаюча черепно-мозкова травма, тверда мозкова оболонка, регенерація, біополімер, біодеградація, експеримент.

SUMMARY

Panteleichuk A.B. Biopolymer (biodegradable) materials application in experimental traumatic brain injury. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of philosophy in field of Study 22 Health care specialization 222 Medicine. The State Institution “Romodanov Neurosurgery Institute of National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv, 2022.

In the dissertation research a complex study of the influence of biopolymer biodegradable film materials on the regeneration of dura mater (DM) in the model of penetrating traumatic brain injury (TBI) with decompressive craniectomy was performed. The following methods were used in the study: experimental (reproduction in the experiment of penetrating trauma with decompressive craniectomy, transplantation of various types of artificial membranes), pathomorphological macroscopic (assessment of the degree of tissue adhesion and the degree of damage to the brain surface, assessment of the presence or absence of

cerebrospinal fluid, rough scars or necrotic changes in tissues, assessment of signs of inflammation-local edema, tissue redness), histological method, including confocal microscopy (assessment of resorption of matrix material, local tissue reaction, vascularization, rate of regeneration, assessment of the number of newly formed collagen fibers), morphometric method (measurement of the thickness of reduced DM), infrared spectroscopy (physical molecular statistical characteristics). between experimental groups).

The study was performed on 120 white male rats weighing 250-300 g, average age of animals 10-12 months. The animals were kept in the vivarium of the experimental animal clinic of the SI "Romodanov Neurosurgery Institute of National Academy of Medical Sciences of Ukraine". Animal feeding took place under the condition of free access to a balanced compound feed and water ad libitum. The lighting of the room changed according to the natural circadian rhythm. Animals were divided into 6 groups (5 study groups and 1 group of pseudooperated animals (control)) for 20 animals in each group: penetrating trauma with DM autoplasty, penetrating trauma with chitosan films duraplasty, penetrating traumatic brain injury gelatin films duraplasty, penetrating trauma with collagen films duraplasty, penetrating trauma with combined duraplasty with collagen and gelatin films, a group of pseudooperated animals. Each of the groups was divided into two subgroups: to obtain the results of observations on 3 and 6 weeks.

Biopolymer films based on chitosan are a new experimental composite material, with a mass fraction of chitosan 70% and a mass fraction of polyethylene oxide (PEO) 30% - chitosan-PEO 70 / 30mass.%. The thickness of the films based on chitosan is 0.025 mm. The films were developed and manufactured in the Department of Chemosorption and Hybrid Materials of the Chuiko Institute of Surface Chemistry National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine. The collagen films used in the study are commercially available and consist with natural devitalized connective tissue membrane of equine origin. The average thickness is about 0.2 mm. Gelatin films were also developed and manufactured in the Department of Chemisorption and Hybrid Materials of the Chuyko Institute of

Surface Chemistry National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine. Their average thickness is about 0.3 mm.

All surgeries were performed under general anesthesia, by intramuscular administration of a mixture of xylazine solutions (Sedazin, Biowet, Poland) at a rate of 15 mg / kg and ketamine (Calipsol, Gedeon Richter, Hungary) at a rate of 70 mg / kg body weight.

Animals underwent craniotomy in the right parietal area, opened DM and inflicted brain injury followed by duraplasty surgery with different types of polymer films. After removal of the hairy head and disinfection with a solution of betadine 10% (Betadine, Aegis, Hungary) made an incision along the midline and exposed the skull bones. A 4 × 7 mm craniotomy hole was formed in the right parietal area using a high-speed drill. The bone flap was separated from the underlying DM and removed. DM was carefully cut crosswise from the middle of the hole to its corners. To do this, a needle size G32 was moved under the DM in the center of the craniotomy window, then the DM was carefully pulled up, cut with a scalpel and then cut with scissors from the middle to the corners of the craniotomy window. The surface of the brain was exposed and the penetration of the cerebral cortex was performed with a G18 needle to a depth of 2 mm, perpendicular to the surface of the cortex. Bleeding from the cortical vessels was stopped with a cotton ball, which was then removed. Thus, the focus of hemorrhagic contusion was modeled.

In animals of group №1, after hemostasis performing, DM flaps were put in place (with diastasis between the edges) and the wound was carefully sutured, while the bone flap was not put in place. Thus, decompressive craniectomy in severe trauma was simulated. After hemostasis, the wound was sutured with suture material vicryl №5 and re-treated with betadine solution. Antibiotic prophylaxis was performed (ceftriaxone intramuscularly 20 mg / kg).

For animals of the group №2, all surgical manipulations were performed similarly, but after penetration of the brain and laying in place of the flaps of the dura mater on top of them laid chitosan film (the size corresponding to the craniotomy window).

For animals of the group №3, all surgical manipulations were performed similarly, but after penetration of the brain and laying in place of flaps of the dura mater on top of them laid chitosan film (the size corresponding to the craniotomy window) and then laid gelatin film (size 6×9 mm) on top of the bone window. Thus, the area of the craniotomy was isolated from the scalp tissues.

For animals of the group №4, all surgical manipulations were performed similarly, but after penetration of the brain and laying in place of the dura mater flaps, on top of them laid collagen film (the size corresponding to the craniotomy window).

For animals of the group №5, all surgical manipulations were performed similarly, but after penetration of the brain and laying in place of the flaps of the dura mater, on top of them laid collagen film (the size corresponding to the craniotomy window) and then laid gelatin film (size 6×9 mm) in bone window. Thus, the area of the craniotomy was isolated from the scalp tissues.

For animals of the group №6, the surgical procedure was limited to anesthesia and incision of the scalp, exposing the skull bones, followed by suturing of soft tissues. Betadine treatment of the wound and antibiotic prophylaxis (in the same dose) were also performed. Craniotomy and injury simulation were not performed. This is due to the need to obtain intact DM (DM can not be considered intact after separation of the bone flap from it).

Animals were removed from the experiment on 3 and 6 weeks by decapitation under adequate anesthesia with 0.1% ketamine - 2 ml.

After a comprehensive study data were obtained in each study group. Common features of all studied groups were: the absence of pronounced inflammatory changes in the area of operation, both macroscopically and histologically; absence of cerebrospinal fluid leakage (sealing of the subdural space confirmed by light optical microscopy); in all operated animals the surgical wound healed per primum and the animals tolerated the operation well, which indicates good biocompatibility of the materials.

Also, the results show that in all operated animals in the area of operation are formed cicatricial-adhesive scars, the severity of which and structural characteristics

depend on the applied plasty material (or materials). The tissues of regenerated DM in the area of operation also had their own specific characteristics only for a certain study group.

Group №1 (autoplasty). According to morphological examination - semi-quantitative assessment on 7 grounds - the most intensive tissue repair processes occur in this study group (reaching $18,8 \pm 1,3$ points on 6 weeks, significantly different from other study groups and the control group, $p < 0,05$). Simultaneously with the processes of restoration of the normal structure of DM there are processes of formation of scar-adhesive tissue, which is most pronounced in this group ($3,6 \pm 0,2$ points, significantly different from other study groups, except collagen-gelatin, $p < 0,05$). The thickness of the formed DM regenerate, correlates with the intensity of autofluorescence - according to confocal microscopy. Infrared (IR) spectroscopy data confirm the formation of a normal structure of DM at the initial stage of the study and the presence of noticeable scarring in the thickness of the regenerate DM at a later date.

Group №2 (chitosan plasty). It was found that the regeneration of DM occurs mainly by forming regenerated tissue, morphologically close to normal, with scar-adhesive tissue in the operation area is not very pronounced: the numerical values of the modified STRYKER scale for this group are the smallest ($1,0 \pm 0,0$, $P < 0,05$); and histologically it was found that there is a gradual biodegradation of chitosan film and the formation of connective tissue, morphologically closest to intact DM. In this group, the regenerate had the largest thickness among all study groups, it was slightly higher than only the chitosan group with gelatin ($407 \pm 48,8$ and $529,7 \pm 68,0$ respectively), although the intensity of reparative processes in the study groups (except autoplasty) is approximately the same. Confocal microscopy makes it possible to quantify the amount of collagen fibers in the extracellular matrix; relatively few of them were found, which is comparable in this indicator with the group of autoplasty ($12,9 \pm 0,07$ and $17,3 \pm 0,64$, respectively, for the green spectrum, the observation period is 6 weeks). The results of the use of IR

spectroscopy in this study are very significant: at the molecular level it was found that the replacement of chitosan molecules (polysaccharide) by protein molecules of newly formed collagen (found a statistically significant difference in the integrated intensity of the IR spectrum relative to the control group, $P < 0,05$).

Group №3 (chitosan and gelatin duraplasty). The morphological feature of the regenerate is a looser, "loose" location of the newly formed collagen fibers, compared to the chitosan group. The combination of chitosan and gelatin slightly increased the number of compounds ($1,5 \pm 0,2$ and $1,6 \pm 0,2$ respectively) And significantly affected the increase in the thickness of the regenerate, compared with the chitosan group ($407,1 \pm 48,8$ and $529 \pm 68,0$ respectively).

Group №4 (collagen duraplasty). The reparative processes in DM tissue were similar in intensity to the processes in groups №2 and №3 and were significantly inferior to group №1 ($18,8 \pm 1,3$ for autoplasty and $14,4 \pm 1,5$ for collagen at 6 weeks of follow-up, $P < 0,05$). According to light optical microscopy in this group was found the highest density of collagen beams (confirmed by confocal microscopy (fluorescence intensity 36.7 ± 0.59 in the collagen group and 17.3 ± 0.64 in the autoplastic group, for the green spectrum, the observation period 6 weeks, $P < 0,05$). TMO regenerate itself, according to IR spectroscopy, at the initial stage of the experiment no clear scar changes were detected, in the late period - undoubted signs of scarring of regenerate tissue were detected.

Group №5 (collagen and gelatin duraplasty). The intensity of regeneration processes was similar to the collagen group (at 6 weeks of observation $12,4 \pm 1,1$ for the collagen group and $13 \pm 2,1$ for the collagen-gelatin group). The peculiarity is the formation of special histoarchitectonics of the regenerate, which is definitely caused by the action of gelatin: the formed tissue had the appearance of soft and loose connective tissue, and bundles of newly formed fibers had a characteristic only for this group "lacy" location. Cicatricial-adhesive processes in this group also had special differences: according to the modified STRYKER scale, cicatricial-adhesive cords were the most pronounced of all studied groups where biopolymers were used,

and this indicator was second only to the autoplasmic group (2.6 ± 0.4 for the collagen group gelatin and 3.6 ± 0.2 for the autoplasty group at 6 weeks of follow-up). At the same time, according to IR spectroscopy, no signs of scarring were detected in the thickness of the regenerate either on 3 or 6 weeks of the experiment. That is, the spectral features of regenerated tissues are closest to the control dura matter in this study group.

Thus, the dissertation presents a solution of the actual problem of modern neurosurgery, namely improving the treatment of severe penetrating traumatic brain injury by developing new effective biopolymer materials for DM plasty, methods of their use to fully restore the sealing of the DM and reduce the formation of unwanted adhesive tissue. The possibility of using selected biopolymer materials for DM plasty has been experimentally substantiated, their efficiency and safety in use have been confirmed. The study expands and complements scientific data on the effect of biopolymer (biodegradable) materials on the regeneration of the dura mater.

Scientific novelty of the obtained results: a new experimental model was developed to assess the regeneration of DM in severe penetrating trauma; in the study for DM plasty, new (experimentally obtained) films based on chitosan and gelatin were used; a new scale of objective assessment of the intensity of DM regeneration was applied for the first time; a new scale of objective macroscopic assessment of the severity of the cicatricial-adhesive process in the area of the trepanation window was applied for the first time; the method of laser confocal fluorescence microscopy was used to objectively estimate the amount of newly formed collagen fibers in regenerated DM for the first time; new scientific data were obtained on the possibilities of IR spectroscopy to assess the condition of regenerated DM tissues.

Practical meaning. The obtained results allow to recommend the selected materials for further clinical trials and implementation in clinical practice. Their use is likely to improve the outcome of treatment of patients with penetrating traumatic brain injury.

Key words: penetrating traumatic brain injury, dura mater, regeneration, biopolymer, biodegradation, experiment.

Публікації, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Andriy B. Panteleychuk, Nikolay V. Kadzhaya, Anna A. Shmeleva, Tatyana A. Malysheva, Olena P. Hnatiuk, Galina I. Dovbeshko. (2019). Theoretical substantiation of the efficiency of biopolymers application in experimental TBI (literature review and own results). Ukr Neurosurg J, 25(4):64-71 doi: 10.25305/unj.184031. <https://doi.org/10.25305/unj.184031>).

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, розробці дизайну дослідження, проведенні хірургічної частини експерименту, відборі післяопераційного матеріалу, написанні основного тексту статті та підготовці статті до друку).

2. Panteleichuk A., Kadzhaya M, Biloschytsky V, Shmeleva A, Petriv T , Gnatiuk O, Dovbeshko G, Kozakevych R, Tyortyh V. Composite chitosan/polyethylene oxide film for duraplasty in traumatic brain injury model in rats. Композитна хітозан/поліетилен оксидна плівка для пластики твердої мозкової оболони на моделі черепно-мозкової травми у щурів. Cell Organ Transpl. 2020; 8(1):26-31. doi:10.22494/cot.v8i1.105

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, розробці дизайну дослідження, відборі плівкових матеріалів для хірургічної частини експерименту, проведенні хірургічної частини експерименту, відборі післяопераційного матеріалу, написанні основного тексту статті та підготовці статті до друку).

3. Panteleichuk, A. B.; Shmeleva, A. A.; Kadzhaya, M. V.; Hnatiuk, O. P.; Karakhim, S. I.; Dovbeshko, G. I.; Savosko, S. I. & Kozakevych, R. B. Quantitative evaluation of the regenerated dura mater in a decompressive skull trepanation model in rats. Int. J. Morphol., 39(6):1731-1736, 2021. doi.org/10.4067/S0717-95022021000601731

http://www.intjmorphol.com/wp-content/uploads/2021/11/art_34_396.pdf

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

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

4. Каджая М.В. , Пантелейчук А.Б. Доповідь : «Сучасний стан проблеми пластики ТМО». Науково-практична конференція нейрохірургів України з міжнародною участю «Організація та сучасні принципи надання спеціалізованої нейрохірургічної допомоги хворим на мозковий інсульт» у вересні 2018 р. Україна. Вінниця. С. 126.

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

5. Пантелейчук А.Б.«Досвід застосування біополімерних плівок на основі хітозану для пластики ТОГМ в експериментальній ЧМТ». Восьмий міжнародний медичний конгрес. Науково-практична конференція «Інноваційні технології в нейрохірургії» С . 87-88. 17-19 квітня 2019р. Україна.Київ.

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

6. Kozakevych R., Tertykh V., Panteleichuk A. «Preparation and characterization of biodegradable biopolymer film for Dural Substituans» International research and practice conferens «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2019) 27-30 August 2019 Lviv,Ukraine С. 232.

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

7. Olena Gnatiuk, Andrii Panteleichuk, Anna Shmeleva, Mykola Kadzhaya, Roman Kozakevych, Galina Dovbeshko «Chitosan and collagen as scaffold mathrics for dura mater healing studied by vibrational spectroscopy» . International Conferens Nanobiophysics : fundamental and appied aspects. October 1-4,2019.C. 46.

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

8. Пантелейчук А.Б., Каджая М.В., Шмельова А.А., Малишева Т.А. «Пластика дефектів твердої оболонки головного мозку біополімерними плівками на основі колагену в експериментальній черепно-мозковій травмі» Науково-практична конференція нейрохірургів України з міжнародною участю «Високі технології у підвищенні якості життя нейрохірургічних хворих» 23-25 жовтня 2019р . Київ. Україна. С. 12.

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

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

9. Пантелейчук А.Б., Каджая М.В., Шмельова А.А., Васлович В.В., Гнатюк О.П., Карахім С.О., Довбешко Г.І. «Можливості конфокальної мікроскопії для оцінки ефективності пластики твердої мозкової оболони в експерименті», VII з'їзд нейрохірургів України з міжнародною участю 11-18 травня 2021р. Сіде, Туреччина.

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

ВСТУП

Актуальність теми

Порушення цілісності ТМО після черепно-мозкової травми (ЧМТ) і/або нейрохірургічних втручань є причиною різноманітних порушень з боку ЦНС. Тому відновлення анатомічних співвідношень між тканинами в ділянці

нейрохірургічної операції є одним з головних чинників успіху втручання і запобігання післяопераційних ускладнень. Герметичність внутрішньочерепного простору і попередження витікання спинномозкової рідини (СМР) - лікворея, є важливою передумовою для запобігання розвитку інфекційних ускладнень [1]. Частота виникнення ліквореї після краніотомії, за даними різних авторів, сягає 7-10% [2, 3, 4]. Вважається, що герметичне закриття твердої мозкової оболони (ТМО) корелює із зниженням частоти ліквореї і з меншою кількістю інфекційних ускладнень [5, 6]. Досить часто, при гострій нейрохірургічній патології, яка супроводжується вираженим набряком головного мозку і підвищеним внутрішньочерепним тиском, також виникає необхідність проведення декомпресивних трепанацій черепа.

На сьогодні розроблено ряд девіталізованих або штучних плівок для пластики ТМО, які дозволяють закрити дефект та сприяють регенерації сполучної тканини ТМО. Колагенові плівки отримані з бичачого перикарда, дерми, ахілового сухожилка, незважаючи на те, що складаються з колагену, мають відмінності, пов'язані з фізико-механічними властивостями, поганою розчинністю, пористістю, і тому якість і динаміка відновлення ТМО може відрізнитись [4, 5]. Хітозан – біосумісний нетоксичний біополімер, який за структурою схожий до хітину, біодеградує в тканинах до N-ацетилглюкозаміну або глюкозаміну, сприяє адгезії клітин і має ранозагоювальну і гемостатичну дію [2]. Людська сполучна тканина не містить хітозан, але він має структурну схожість з глюкозаміногліканами (GAG), основними компонентами позаклітинного матриксу. Актуальним є виявлення найбільш ефективного матеріалу для відновлення ТМО. З огляду на вищевикладене, дисертаційна робота присвячена вивченню ефективності біополімерних (біодеградуючих) матеріалів в регенерації ТМО при експериментальній ЧМТ.

На сьогоднішній день декомпресивна трепанація черепа є ефективним нейрохірургічним методом у лікуванні пацієнтів з тяжкою черепно-мозковою травмою та підвищеним внутрішньочерепним тиском [7-11] та різними

видами цереброваскулярних захворювань [12, 13]. Особливо широко декомпресивна трепанація черепа застосовується у військових умовах [14, 15]. Дана обставина є надзвичайно актуальною для України, особливо зважаючи на збільшення кількості постраждалих цивільних осіб і військовослужбовців в зоні збройного конфлікту в Україні. Серед загальної кількості поранених госпіталізованих військовослужбовців за період 2014-2017рр. у 7,3% діагностовано бойові вогнепальні ЧМП, а серед них абсолютна більшість (71%) мали проникні (з пошкодженням ТМО) вогнепальні ЧМП, тобто потребували проведення декомпресивної трепанації черепа в перспективі [16]. Проведення такої операції з вилученням кісткового клаптя та широким розкриттям ТМО супроводжується порушенням нормального взаємного розташування між м'якими тканинами голови, ТМО і мозковою речовиною. Такий стан може супроводжуватися різними післяопераційними ускладненнями, як ранова лікворея та інфікування. Крім того, через утворення рубцево-спайкового процесу між м'якими тканинами голови, ТМО і мозковою речовиною, можуть виникнути ускладнення під час проведення наступної операції – краніопластики [17]. Можливими ускладненнями краніопластики можуть бути травма кори головного мозку, гнійно-запальні ускладнення, лікворні нориці, оболонкові та внутрішньомозкові крововиливи [18, 19]. При цьому, велика частина з цих ускладнень може бути пов'язана з труднощами, через утворення рубців між шкірно-апоневротично-м'язовим клаптем і тканиною головного мозку [20, 21]. Крім того необхідність в застосуванні заміника ТМО може виникнути під час субтенторіальних операцій і операцій на основі черепа, коли створюється дефект ТМО через те, що в результаті застосування біполярної коагуляції відбувається скорочення її тканин; при хірургічному лікуванні менінгіом з резекцією частини ТМО [22], в спінальній нейрохірургії [23]. З огляду на вище викладене, актуальним стає вивчення таких процесів, які дозволили б в післяопераційному періоді створити сприятливі умови для проведення процесу регенерації ТМО та зменшення

утворення рубця між м'якими тканинами голови, ТМО і мозковою речовиною, шляхом застосування біодеградуючих штучних оболонок.

В даний час є обмежена кількість досліджень, спрямованих на зменшення ускладнень, пов'язаних з краніопластиком [18]: застосування водонепроникної оболонки на основі політетрафлюороетилену (PTFE) з метою досягнення профілактики ліквореї [20], силіконоподібних субстратів для профілактики рубців між скроневим м'язом, шкірою голови та тканиною мозку [19, 24]. Через незадовільну біологічну ефективність (незадовільно забезпечують можливість регенерації ТМО, протимікробну стійкість, зменшення утворення рубців між тканинами в ділянці кісткового дефекту), виключені з клінічного використання десятки заміників ТМО від металевої фольги до різних синтетичних полімерних листків [25-28].

Використання в якості матеріалу для пластики власних тканин пацієнта є традиційним і займає значне місце в реконструктивній хірургії ТМО, воно має незаперечну перевагу: виключення імунної відповіді на трансплантат. Аутологічні донорські тканини наявні в тілі пацієнта і можуть бути використані в тому випадку, коли рішення приймається в ході операції. Але існує ціла низка загальних недоліків аутопластики: взяття власного трансплантату часто потребує окремого доступу, що збільшує час і складність операції; отриманої власної тканини може виявитись недостатньо або вона може бути недостатньо міцна; крім того власні тканини сприяють розвитку надмірного рубцювання і не позбавлені ризику інфікування (гнійно-запальних ускладнень); взяття власних тканин може бути не завжди косметично прийнятним для пацієнта. Крім того складність операції при отриманні ауто трансплантата може потребувати використання спеціального хірургічного інструментарію, що не завжди прийнятно [29, 30].

Переваги і недоліки окремих ауто трансплантатів наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

**Аутологічні матеріали, які можуть застосовуватися для пластики ТМО
склепіння і основи черепа [31, 32]**

| Аутологічний матеріал | Джерело | Переваги | Недоліки |
|---|--|---|---|
| 1. Широка фасція стегна (фасція широкого м'язу спини, фасція переднього зубчастого м'язу) | Зовнішня поверхня стегна (задня або бокова поверня грудної стінки) | Ідеальна сумісність, відносна доступність, міцність | Потреба в додатковому доступі, можливість некротизації, можлива недостатність матеріалу при значній площі дефекту |
| 2. Вільний клапоть підшкірної жирової клітковини (ПЖК) | Передня черевна стінка | Ідеальна сумісність, доступність, легко моделюється | Потреба в додатковому доступі, можливість інфікування і ліпоїдного менінгіту |
| 3. Сконева фасція | Сконева ділянка | Ідеальна сумісність | можлива недостатність матеріалу, потреба в додатковому розрізі |
| 4. Жирова клітковина орбіти | Орбітальна ділянка | Ідеальна сумісність | Доступність лише в зоні операції |

| | | | |
|---|---|--|--|
| | | | (при краніоорбітальних пухлинах) |
| 5. Окістя склепіння черепа | Лобна ділянка (при бікоронарному розрізі) | Ідеальна сумісність, міцність, основний матеріал для пластики дефектів ПЧЯ | Доступність лише в зоні операції |
| 6. Розщеплений листок ТМО (пластика за Бурденком-Брюнінгом) | Суміжна з зоною операції ділянка ТМО | Ідеальна сумісність | Складність техніки виконання , потреба в максимальній площі трепанації |
| 7. Клапоть ТМО серповидного відростка | Серповидний відросток ТМО | Ідеальна сумісність | Складність техніки виконання, потреба в додатковому доступі |

Перевагою аутопластики дефектів ТМО серповидним відростком головного мозку є ідеальна сумісність тканин, проте недоліками є технічна складність її виконання і необхідність у додатковому доступі. Крім того, це суто експериментальне анатомічне дослідження, яке через описані вище недоліки не знайшло впровадження у практику [33].

Такі аутологічні матеріали як вільний шкірно-м'язовий клапоть прямого м'язу живота на судинній ніжці або клапоть великого сальника на судинній

ніжці, а також аутологічні кісткові, хрящові і слизово-окісні клапті використовуються в реконструктивній хірургії при великих комбінованих дефектах склепіння черепа, його основи і скальпа і в контексті лише пластики ТМО нами не розглядаються.

Застосування алогенних матеріалів для пластики ТМО (ліофілізована, формалінізована або заморожена трупна ТМО, децелюляризована людська шкіра) обмежене, по-перше через можливість імунної відповіді на трансплантат, можливість передачі вірусних і пріонових інфекцій; по-друге через ряд юридичних і етичних обмежень, пов'язаних з відбором матеріалу. Крім того їх зберігання можливе тільки в певних спеціальних умовах і має обмежений строк зберігання (декілька місяців) [32, 34, 35]. Алогенні матеріали на основі амніотичної мембрани людини демонструють хороші результати при пластиці ТМО, але їх вивчення ще триває [36, 37].

Отже, у вирішенні проблеми пластики ТМО пріоритет мають штучно створені плівкові матеріали природного походження (біополімерні матеріали) або синтетичні матеріали неорганічного походження, які мають окремі переваги (синтетичні матеріали володіють більш широким діапазоном технологічних можливостей: архітектура матеріалу, механічні властивості, фізико-хімічні властивості тощо) [2, 22, 32, 38].

Спільні позитивні риси усіх штучних матеріалів: зникає потреба у препаруванні власних тканин (кількість і якість яких не завжди можуть бути задовільними); скорочується час операції; враховуючи, що біополімерна плівка перед хірургічним втручанням може бути підготовлена у достатній кількості це забезпечує найбільш надійне загоєння тканин ТМО, яка піддається пластиці; здатність біополімерних плівок до біодеградації забезпечує оптимальне анатомічне співвідношення між шарами м'яких тканин (ТМО, прилеглим мозком і шкірно-апоневротичним клаптем) [29, 38].

Застосування желатинової плівки епідурально сприяє зменшенню утворення спайок між тканинами ТМО, яка загоюється після пластики і шкірно-апоневротичним клаптем. Тому біополімерні плівки стають

альтернативою для пластики аутологічними і алогенними тканинами [39, 40]. Однак, наприклад, запропонований для пластики ТМО матеріал на основі природного полімеру – целюлози не знайшов поки що широкого застосування в практиці через неоднозначність його ефективності [41]. Існують дані як про позитивний, так і про негативний його вплив на регенерацію ТМО: хоча матеріал є нетоксичним і біодеградуєчим, він здатен викликати запальні і алергічні реакції; крім того за даними клінічних спостережень не було підтверджено його переваг перед аутопластикою [32, 42, 43].

Синтетичні матеріали неорганічного походження, наприклад виготовлений з політетрафторетилену (PTFE) або з поліестеруретану – не є біодеградуєчими, тому залишаються в порожнині черепа назавжди, це, в свою чергу, може викликати утворення гранульоми стороннього тіла, утворення спайок, підвищує ризик інфікування [32, 44].

Існує ряд синтетичних матеріалів, які здатні до біодеградації (полі(глюкози малат)метакрилат [45], або на основі легованих (зшитих) уретанових полієфірів [46] або на основі карбоксиметилцелюлози, модифікованої гіалуронатом натрію [47], але вони, як і синтетичні небіодеградуєчі полімери, не здатні стимулювати ріст і диференціацію клітин в тій же мірі, що біодеградуєчі матеріали природного походження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в межах НДР, що виконувалась в Державній установі «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова Національної академії медичних наук України» «Вивчити ефективність біополімерних (біодеградуєчих, біоіндукуєчих) матеріалів в регенерації твердої мозкової оболонки і супутніх клітинно-тканинних реакцій при експериментальній черепно-мозковій травмі» УДК 616.831.9-003.93:541.6:616.831-001-092.9. № держреєстрації 0117U004269.

Мета і завдання дослідження.

Мета дослідження – оцінити вплив біополімерних (біодеградуючих) плівкових матеріалів (желатину, колагену і хітозану) на регенерацію ТМО після декомпресивної краніектомії на моделі пенетруючої черепно-мозкової травми .

Завдання дослідження:

1. Розробити експериментальну модель проникаючої ЧМТ з декомпресивною трепанацією черепа.
2. Провести різні види пластики дефекту ТМО, в т.ч. - штучними біополімерними плівками і різними їх комбінаціями для порівняльного аналізу їх впливу на регенерацію тканин ТМО.
3. Вивчити морфологічні особливості регенерації ТМО при різних умовах її пластики.
4. Оцінити фізичні молекулярні характеристики формування рубцевої тканини і регенерату новоутвореної ТМО за показниками ІЧ-спектроскопії.
5. Провести порівняльний аналіз особливостей регенерації ТМО при різних умовах її пластики: при умові аутопластики і під впливом штучних плівкових матеріалів.

Об'єкт дослідження: ТМО і її регенерація при експериментальній важкій проникаючій ЧМТ з декомпресивною трепанацією черепа, в т.ч. із застосуванням біополімерних біодеградуючих матеріалів.

Предмет дослідження: експериментальна тяжка проникаюча черепно-мозкова травма.

Методи дослідження:

- експериментальний (відтворення в експерименті проникаючої ЧМТ з декомпресивною трепанацією черепа, трансплантація різних видів штучних оболонок);

- патоморфологічний макроскопічний (оцінка ступеню адгезії тканин і ступеню ушкодження поверхні мозку при роз'єднанні шкірно-апоневротичного клаптя, ТМО і поверхні мозку; оцінка наявності чи відсутності ліквореї; грубих рубців чи некротичних змін у тканинах; оцінка ознак запалення-місцевий набряк, гіперемія тканин);
- гістологічний метод, в т.ч. конфокальна мікроскопія (оцінка резорбції матричного матеріалу, місцева реакція тканин, васкуляризація, швидкість регенерації, оцінка кількості новоутворених колагенових волокон);
- морфометричний метод (вимірювання товщини відновленої ТМО);
- метод інфрачервоної спектроскопії (фізична молекулярна характеристика регенерованої ТМО);
- статистичний (визначення статистично значимих відмінностей між експериментальними групами).

Наукова новизна одержаних результатів.

В дисертаційному дослідженні розроблено нову експериментальну модель для оцінки регенерації ТМО при важкій проникаючій ЧМТ: модель відтворює усі три основні компоненти, які завжди присутні при клінічній ситуації, коли при ЧМТ виникає потреба в проведенні ДТЧ: вогнище геморагії, декомпресивне трепанаційне вікно і розсічена ТМО.

В дисертаційному дослідженні для пластики ТМО було застосовано нову (отриману експериментально) плівку на основі хітозану. Плівка є новим композитним матеріалом, до складу якого входять хітозан і поліетиленоксид (ПЕО) у співвідношенні 70/30 мас.%. Отримано переконливі наукові дані щодо ефективності даного матеріалу для пластики ТМО в експерименті.

Виявлено, що желатинова плівка, яка також є новим експериментальним матеріалом, модифікує вплив матричних матеріалів на регенерацію ТМО.

В дослідженні розроблено і вперше застосовано нову шкалу об'єктивної оцінки інтенсивності регенерації ТМО.

В дослідженні розроблено і вперше застосовано нову шкалу об'єктивної макроскопічної оцінки вираженості рубцево-спайкового процесу в зоні трепанаційного вікна.

Для оцінки властивостей регенерованої ТМО вперше було застосовано метод лазерної конфокальної флюорисцентної мікроскопії з цифровою обробкою отриманих даних. Це дозволило об'єктивно оцінити кількість новоутворених колагенових волокон в регенераті і т.ч. розширити наукові знання про закономірності їх утворення в регенераті ТМО при застосуванні різних біополімерів і їх комбінацій.

Отримані нові наукові дані щодо можливостей ІЧ-спектроскопії для оцінки стану регенерованих тканин ТМО, отримані характеристики ІЧ-спектроскопії інтактної ТМО, рубцево-спайкової тканини, регенеруючої ТМО в досліджуваних групах.

Практичне значення одержаних результатів.

Встановлені особливості і закономірності клітинно-тканинних реакцій у регенерації ТМО при застосуванні штучних оболонок при експериментальній ЧМТ, що є теоретичним обґрунтуванням у виборі штучних оболонок для відновлення пошкодженої ТМО. Доведено, що має місце герметичне закриття субдурального простору при дурупластиці біополімерами і покращення регенерації ТМО після застосування колагенових та хітозанових біополімерів

і їх комбінацій з желатином порівняно з аутопластикою ТМО. На основі експериментальних, морфологічних, спектроскопічних досліджень і конфокальної мікроскопії оцінено особливості регенерації ТМО і тканинних реакцій навколо різних видів штучних оболонок. Отримані нові наукові дані доводять ефективність впливу біополімерних біодеградуючих матеріалів на регенерацію ТМО (доведено здатність до регенерації сполучної тканини навколо біополімерів, їх інтеграцію у регенеруючу ТМО і, поряд з тим, - здатність до поступової біодеградації, коли замітник спершу бере на себе функцію по заміщенню нативної тканини, а потім резорбується, заміщуючись регенератом).

Таким чином експериментально обґрунтовано можливість застосування обраних біополімерних матеріалів для пластики ТМО, підтверджена їх ефективність і безпечність у використанні. Отримані результати дозволяють рекомендувати обрані матеріали для подальшого клінічного випробування і впровадження в клінічну практику. В перспективі це може покращити результати лікування пацієнтів з важкими проникаючими ЧМТ.

Особистий внесок здобувача.

Дисертація є власною завершеною науковою працею автора. Спільно з науковим керівником, д-р мед. наук, керівником відділення нейротравми Каджаєю М.В. сформовано тему, мету та завдання роботи, розроблено експериментальну модель тяжкої проникаючої ЧМТ та відтворено на лабораторних тваринах на базі ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова НАМН України». Здобувачем особисто проведено аналіз фахової літератури і проведено патентний пошук. Дисертант брав безпосередню участь в розробці і відборі біополімерних плівок на основі хітозану і желатину, особисто провів усі хірургічні втручання і особисто проводив відбір післяопераційного матеріалу для усіх методів досліджень, які були застосовані в даній науковій роботі. Обробка, узагальнення і підсумки результатів роботи,

статистичний аналіз, а також висновки щодо наукової новизни і практичного значення отриманих були проведені при безпосередній участі автора.

Розділи дисертації, статті у фахових наукових журналах та тези доповідей на конгресах, з'їздах і конференціях здобувачем підготовлено особисто.

Апробація результатів дисертації.

За основними результатами досліджень по науковій роботі здобувача були проведені доповіді :

1. Каджая М.В. , Пантелейчук А.Б. Доповідь : «Сучасний стан проблеми пластики ТМО». Науково-практична конференція нейрохірургів України з міжнародною участю «Організація та сучасні принципи надання спеціалізованої нейрохірургічної допомоги хворим на мозковий інсульт» у вересні 2018 р. Україна. Вінниця. С. 126.
2. Пантелейчук А.Б.«Досвід застосування біополімерних плівок на основі хітозану для пластики ТОГМ в експериментальній ЧМТ». Восьмий міжнародний медичний конгрес. Науково-практична конференція «Інноваційні технології в нейрохірургії» С . 87-88. 17-19 квітня 2019р. Україна.Київ.
3. Kozakevych R., Tertykh V., Panteleichuk A. «Preparation and characterization of biodegradable biopolymer film for Dural Substituans» International research and practice conferens «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2019) 27-30 August 2019 Lviv,Ukraine С. 232.
4. Olena Gnatiuk, Andrii Panteleichuk, Anna Shmeleva, Mykola Kadzhaya, Roman Kozakevych, Galina Dovbeshko «Chitosan and collagen as scaffold mathrics for dura mater healing studied by vibrational spectroscopy» . International Conferens Nanobiophysics : fundamental and appied aspects. October 1-4,2019.C. 46.

5. Пантелейчук А.Б., Каджая М.В., Шмельова А.А., Малишева Т.А. «Пластика дефектів твердої оболонки головного мозку біополімерними плівками на основі колагену в експериментальній черепно-мозковій травмі» Науково-практична конференція нейрохірургів України з міжнародною участю «Високі технології у підвищенні якості життя нейрохірургічних хворих» 23-25 жовтня 2019р . Київ. Україна. С. 12.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

6. Пантелейчук А.Б., Каджая М.В., Шмельова А.А., Васлович В.В., Гнатюк О.П., Карахім С.О., Довбешко Г.І. «Можливості конфокальної мікроскопії для оцінки ефективності пластики твердої мозкової оболони в експерименті», VII з'їзд нейрохірургів України з міжнародною участю 11-18 травня 2021р. Сіде, Туреччина.

Апробація дисертаційної роботи відбулась на фаховому семінарі від 04.05.2022 року, протокол №7.

Публікації. Результати дисертаційного дослідження були опубліковані у 9 наукових працях: 3 статті в наукових періодичних виданнях, які відповідають вимогам МОН (2 з них цитуються у міжнародній наукометричній базі даних Scopus) і 6 тез доповідей на конгресах, з'їздах, конференціях.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається з таких розділів: вступу, огляду літератури, 6 розділів результатів власних досліджень, обговорення і підсумків результатів дослідження, кореляційного аналізу, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, додатків. Робота викладена на 197 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 89 рисунками, містить 14 таблиць. Список використаних

літературних джерел містить 159 посилань, з них 7 — кирилицею, 152 — латиницею.

РОЗДІЛ 1

АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Історія розвитку заміників ТМО, сучасний стан проблеми, перспективи її вирішення.

Історія створення і застосування заміників ТМО пройшла тривалий, більше ніж віковий шлях. Інтерес до відновлення дефектів ТМО виник на початку 90-х років XIX століття при спробі мінімізувати або запобігти післяопераційним менінгоцеребральним спайкам. Вперше в 1890 р. були застосовані золота фольга (Beach), у 1898 році гумова тканина (Abbe) і оболонка яйця (Freeman) [32, 60]. Для пластики ТМО акцент робився на застосуванні найтонших листків металів: золота, срібла, платини [32]. Пізніше, як проблему, було визначено витікання ліквору після операції і необхідність для його запобігання застосування заміників ТМО. У 1924 році Penfield запропонував концепцію ідеального заміника ТМО, наголосивши на необхідності використання матеріалів, які розсмоктуються (можуть резорбуватися) після запобігання утворення спайок [32]. Було встановлено, що ушкодження м'якої і арахноїдальної оболони викликає утворення спайок незалежно від виду використовуваного заміника ТМО [2, 9, 32, 34]. Були запропоновані та оцінені численні типи матеріалів в пошуках ідеального заміника ТМО, вимоги до яких за цей час розширені і конкретизовані. Отже, «ідеальний заміник» ТМО повинен: забезпечувати водонепроникність, відповідати фізичним властивостям ТМО людини, бути легким для маніпуляцій під час операції при намочуванні фізіологічним розчином, механічні властивості матеріалу повинні полегшувати накладання швів і / або склеювання, забезпечувати надійну герметизацію швів і анастомозів, мінімізувати місцеве запалення тканин, для запобігання утворення небажаного фіброзу або кортикальних спайок, переважно стимулювати на різних етапах інфільтрацію клітинами (макрофагами, фібробластами) і служити матриксом,

щоб прискорити відновлення цілісності нативної ТМО, забезпечувати надійний гемостаз, сприяти розвитку судинної системи, сприяти скороченню часу операції, не мати цитотоксичного ефекту; не викликати контактного некрозу тканин; знижувати ризик інфікування рани, бути економічно вигідним [38 – 45, 48].

Були сформовані 5 головних вимог до імплантату, відповідність до яких дозволить створити "ідеальний замітник" ТМО: по-перше, імплантат повинен тимчасово або постійно брати на себе функцію нативної тканини, яку він замінює, відокремлюючи і герметизуючи субдуральний простір від епідурального простору; по-друге, імплантат повинен індукувати клітини хазяїна, щоб диференціювати і відновити / замінити дефіцит тканини ТМО (менінготеліальна індукція); по-третє, імплантат повинен сприяти інфільтрації фібробластів (менінготеліальна провідність), що є функціональним показником тривимірної структури трансплантата; по-четверте, бажано щоб імплантат містив компоненти, здатні регенерувати нативну тканину (менінготеліогенез); по-п'яте, потрібно враховувати такі дві характеристики імпланта: пластичність – здатність відповідати хірургічному дефекту без деформації навколишніх тканин, і міцність на розтягнення – від чого залежить здатність трансплантата утримувати шов під натягом. Таким чином, узагальнюючи вищевикладені вимоги до замітника ТМО, він повинен забезпечити виконання двох головних умов: досягнення герметичності відновлення ТМО для виключення витікання ліквору, що вимагає міцності імпланту і, з іншого боку, здатність до біодеградації імплантату з рівномірним відновленням цілісності нативної ТМО [48].

На сьогоднішній день досліджуються окремі біоматеріали, які лише частково відповідають вимогам «ідеальної оболонки». Найбільш перспективними виявилися імплантати створені на основі ксеногенного колагену, хітозану і желатину. Колагенові імплантати сприяють регенерації ТМО, проте малоефективні щодо зменшення утворення рубця, оболонка на основі желатину може бути ефективною в запобіганні утворення рубців і

адгезії тканин [49]. Багато досліджень присвячено хітозановій оболонці яка відрізняється водонепроникністю і антибактеріальними властивостями [50].

Таким чином, вивчення можливості регенерації ТМО і зменшення утворення рубцево-спайкового процесу в експерименті з кожним біоматеріалом окремо, і в їх комбінації дозволить надалі рекомендувати їх ефективно застосування в клінічних умовах.

1.2. Принципи класифікації біополімерних замінників ТМО.

Не існує уніфікованої класифікації замінників ТМО, тому їх можна класифікувати за походженням і способом отримання, хімічними і біологічними характеристиками. За походженням і способу отримання замінники ТМО класифікуються на чотири основні групи: ауто-, ало-, ксено- та синтетичні трансплантати [32, 48]. Цю класифікацію можна розширити додавши п'яту групу - комбінацію з попередніх груп [50]. Слід зазначити, що в деяких роботах синтетичні замінники розглядаються в групі алотрансплантатів [51]. Узагальнюючи, замінники ТМО можна розподілити за принципом біологічного (ауто-, ало-, ксенотрансплантати) або небіологічного (синтетичного) походження, з яких також можна виділити групу з біоміметичною конструкцією [52]. Такий поділ має значення щодо потенціалу розвитку запальних та алергічних реакцій.

Також замінники ТМО можуть бути розділені на групи: такі, що розсмоктуються, і на ті, що не розсмоктуються; одно- або двох-, тришарові трансплантати [53, 54] в залежності від створення тільки водонепроникного шару або також і матриксу для новоствореної ТМО та іншого шару для попередження утворення спайок між шкірно-окісно-м'язовим компонентом з ТМО і мозковою речовиною. Шаруватість імплантата показала свої переваги

під час повторної операції, в зв'язку з багатофункціональністю і менш вираженим спайковим процесом в ділянці операційної рани; зменшується крововтрата і ризик пошкодження поверхні мозку, скорочується час хірургічного втручання [55-57]. Тому такі замітники ТМО можна рекомендувати в випадках, коли передбачається повторна операція. Щоб мінімізувати адгезію ТМО відзначено користь створення біодеградуючого замітника з антиадгезивними властивостями [58]. На даному етапі розробок заміників ТМО основна увага приділяється біодеградуючим полімерам, які ділять на дві великі підгрупи: біологічного і синтетичного походження, а також вказують на комбіновані (гібридні) синтетичні і біологічні полімери. У деяких випадках полімери можуть бути одночасно біологічного і синтетичного походження. Біологічно отримані полімери далі можуть бути класифіковані на пептиди і білки: колаген, желатин, еластин, кератин, шовк, протеоглікани; полісахариди: целюлоза, крохмаль, альгінат, гелланова камідь, глікозаміноглікани, хітозан; полігідроксиалканоати, полінуклеотиди. Синтетично отримані полімери можуть бути класифіковані на: аліфатичні поліефіри – полігліколева, полімолочна кислота і їх кополімери, полікапролактон, полі (п-діоксанон), полі (ортоефіри); поліуретани; поліангідріди; поліфосфазени; поліамінокислоти і псевдополіамінокислоти [59]. Узагальнюючи вищезазначене, можна зробити заключення про те, що біополімери природного походження, які біодеградують, є найбільш близькими до уявлень про «ідеальний замітник» ТМО.

1.3. Перспективи розвитку заміників ТМО.

Системний і міждисциплінарний підходи внесли нові можливості в парадигму розвитку біотехнології і тканинної інженерії, що стосується і розробок замітника ТМО. Якщо у двадцятому столітті біосумісність матеріалу в значній мірі ототожнювалася з пасивною інертністю та відсутністю

шкідливої, несприятливої відповіді з боку реципієнта [60], то в 21 столітті вимогою стала здатність біоматеріалу до ініціювання таких клітинних і тканинних реакцій, які сприяють загоєнню або регенерації власної тканини пацієнта.

Концепція медичного імплантату майбутнього полягає в наявності тканинного каркаса, який інтегрується з навколишньою здоровою тканиною і сприяє регенерації пошкодженої тканини. Один з можливих шляхів реалізації цієї концепції є створення тканинних каркасів з біологічно активних полімерів, що мають форму пористих структур. Така будова сприяє успішній колонізації даного каркасу клітинними популяціями, призводячи до регенерації бажаної тканини [61].

Будь-який штучний «інертний» матеріал, поміщений в тіло пацієнта викликає клітинну відповідь [62]. Тому існує думка, що біоматеріал повинен взаємодіяти з тканиною прийнятною клітинною відповіддю шляхом включення біологічно активних компонентів в конструкцію біоматеріалів [63].

Одним з основних позитивних характеристик матеріалу є можливість його біодеградації. Мета застосування біодеградуючих полімерів полягає у відновленні або ремоделюванні нативної тканини і тому не потрібна довготривала стабільність матеріалів в живому організмі. Таким чином зменшується вірогідність розвитку хронічної імунної реакції, інкапсуляції матеріалу в довгостроковій перспективі [64].

Одним з можливих підходів відновлення функцій органу – це створення матеріалів, що відтворюють властивості відповідної тканини. ТМО в основному складається з жорсткої сполучної тканини, яка покрита епітелієм на його внутрішній поверхні [65]. Така будова ТМО визначає доцільність підходу заміщення її плівками, що складаються з колагенових фібрил з відповідною гістоструктурою.

Імплантація біоматеріалів часто ініціює гострі запальні реакції, які іноді можуть бути причиною хронічної запальної відповіді. Вимірювання інтенсивності та тривалості імунних реакцій проти імплантованих

біоматеріалів важливо для оцінки біосумісності. Реакція тканини на імплантовані біоматеріали залежить від структури і складу біоматеріалу, місця, де він імплантується [61-64]. Мікрооточення імплантату після деякого часу змінюється, тому визначення імунологічної відповіді після імплантації засноване на вимірі рівня виділення прозапальних цитокінів та антитіл, моніторингу зміни популяції імунних клітин [63]. Колагеновий матрикс, наприклад, інфільтруються, в основному, гігантськими клітинами, які фагоцитують і сприяють деградації пучків колагену, поки матеріал повністю не резорбується. Ця хронічна запальна реакція триває до повного руйнування матеріалу, після чого зникають клітини, що беруть участь в цьому процесі [64, 66].

Публікації останніх років вказують на відсутність повного вирішення проблеми, пов'язаної з імплантатом ТМО. Основними недоліками пептидів і білків в якості біоматеріалів для виготовлення медичного імплантату є погана розчинність і обмеження можливості застосування традиційних промислових методів обробки полімерів, імуногенність, обмежені фізичні властивості: а) висока варіабельність однорідності суміші через складні процедури їх отримання, б) ризик забруднення пірогенами або патогенами, в) незадовільна міцність, пластичність, тривалість терміну придатності, а також їх висока вартість.

Біологічно отримані полімери мають важливі переваги перед синтетичними матеріалами щодо зниження токсичності, оскільки вони складаються з молекул, які природним чином зустрічаються в організмі і здатні природним чином руйнуватися в фізіологічних умовах і можуть мати передбачувані біологічні властивості і бажану біологічну активність, тобто вони здатні викликати специфічні клітинні відповіді. Колаген, наприклад, через його біологічну активність, здатний викликати такі специфічні відповіді як підтримка, прикріплення, ріст і диференціювання клітин [67]. Однак, у зв'язку з тими недоліками, які були перераховані вище, все більш широко застосовуються у виробництві заміників ТМО синтетичні біодеградуючі

полімери. Синтетичні матеріали володіють ширшим діапазоном технологічних властивостей (полімерна композиція, архітектура, механічні властивості тощо), але не здатні стимулювати ріст і диференціювання клітин у тій же мірі, що і біологічні полімери [32, 68]. Для усунення цих недоліків запропоновано поєднання біологічно отриманих полімерів з синтетичними матеріалами. Тобто призначенням таких гібридних матеріалів є поєднання біологічної активності біополімерів з задовільними технологічними і фізичними властивостями синтетичних матеріалів.

Для високоефективної дії імплантату необхідна біоміметичність його будови. Біоміметичні матеріали – це синтетичні (штучні) матеріали, які імітують натуральні матеріали або слідуєть дизайну характерною послідовністю молекул. Біоміметичні полімери в основному володіють кращими властивостями, ніж їх природні еквіваленти, які, крім того, їх можна модифікувати шляхом хімічного зшивання [69].

Для передбачуваного застосування біоматеріалу він повинен мати відповідний діапазон фізико-механічних властивостей, швидкості біодеградації і володіти задовільною біосумісністю. Повинна бути технологічна можливість створення бажаного тканинного каркаса відповідної форми економічно ефективними методами виготовлення. Має важливе значення спосіб стерилізації замітника, так як більшість методів стерилізації можуть змінити фізико-хімічні та біологічні характеристики імплантату і зменшити ефект біосумісності [70]. Розмір, орієнтація пор і структура волокон також є важливими характеристиками в конструкції тканинних каркасів. Розроблено кілька методів для формування чітко визначених матриць з синтетичних і біологічно отриманих полімерів, з варіацією фізичних характеристик цих матриць, щоб оптимізувати взаємодії тканин, які регенерують, з біоматеріалом [71, 72].

Таким чином, для досягнення мети необхідно: створення біополімера, що резорбується з передбачуваними і корисними клітинними реакціями; поєднання унікальних властивостей синтетичних полімерів з біологічними

властивостями природних матеріалів; комбінування кількох біополімерних плівкових матеріалів з окремими позитивними властивостями.

1.4. Біополімерні матеріали для виготовлення замінників ТМО.

1.4.1. Колаген.

Колаген є одним з ключових структурних білків позаклітинної матриці в багатьох сполучних тканинах у ссавців, що становлять 25-35% всього білкового вмісту тіла. Колаген в основному зустрічається в волокнистих тканинах, таких як сухожилля, зв'язки та шкіра (близько половини всього колагену тіла), а також в рогівці, хрящах, кістках, кровоносних судинах, кишечнику і міжхребцевих дисках. Основними продуцентами колагену у сполучних тканинах є фібробласти. Відомо, що активність фібробластів зростає у травматично пошкоджених тканинах. Ідентифіковано і описано 29 колагенових типів [73].

Людська ТМО складається переважно з колагену першого типу [74]. Колаген вперше був використаний в якості біоматеріалу в хірургії в кінці XIX століття. Він знайшов широке медичне застосування в якості ранових пов'язок, гемостатичних засобів, в серцево-судинній, пластичній хірургії та нейрохірургії. Найчастіше в медичних цілях використовується колаген типу I. Виробництво колагену не є складним, виконується у водному середовищі без застосування високих температур, в результаті чого утворюються різноманітні матричні форми. Крім того, властивості колагену можуть бути адаптовані до бажаних вимог шляхом додаткового зшивання [75, 76].

Колаген легко виділяється і очищується, володіє добре відомими структурними, фізичними, хімічними та імунологічними властивостями, є біодеградуючим, біосумісним, не є цитотоксичним, має здатність підтримувати ріст клітин, може бути перероблений і отриманий в різній формі: у вигляді плівок, листків, гранул, сітки, волокон, губки [77]. Однак деякі властивості колагену: низька стабільність розмірів через його набухання; погана механічна міцність, низька еластичність, можливість антигенної відповіді [78] через залишкові альдегідні зшиваючі агенти, змінність в кінетиці вивільнення, неефективність в тактиці лікування інфікованих місць [79] негативно впливають на його використання.

Виділений колаген характеризується слабкою термічною стабільністю, механічною міцністю і вологонепроникністю через руйнування природних поперечних зв'язків і структурного об'єднання в процесі екстракції. Для підвищення їх міцності і стійкості до ферментів, підтримки стабільності при імплантації колагенові матриці повинні стабілізуватися прошиванням молекул колагену різними методами: хімічним, ферментативним або фізичним [80]. Прошивання також дозволяє знизити антигенність колагену, зменшити його кальцифікацію [81].

Біоматеріали на основі колагену (а також желатину), використовуються в якості будівельної структури для відновлення тканин в формі гелів, губки, сітки і вони повинні резорбуватися в організмі після досягнення регенерації тканин. Деградація колагену в організмі відбувається послідовно за участю декількох ферментів і хімічних реакцій [82]. Імпланти колагену інфільтровані клітинами запалення (фібробласти, макрофаги, нейтрофіли), які є причиною скорочення імпланту і секреції колаген-деградуючих ферментів, активаторів, інгібіторів і регуляторних молекул. Виразність інфільтрації залежить від таких властивостей імпланту, як тип колагену, форма, пористість і ступінь зшивання, місце імплантації, індивідуального рівня ферментів [80-82]. Колаген деградується ендопептидазами з чотирьох основних класів: металопротеази, серинові, цистеїнові і аспарагінової протеази. Механізм неферментативної

деградації, наприклад, гідроліз, також бере участь у розщепленні колагену [82]. Сполучна тканина розщеплюється шляхом взаємодії між чотирма різними класами протеїназ, які або зберігаються в клітинах, або виділяються при необхідності, тоді як для деградації позаклітинного матриксу головним чином відповідальні металопротеази [83]. Механізм деградації колагену металопротеазами в повному обсязі не вивчений. Одна з гіпотез полягає в тому, що колаген фактично розмотується металопротеазами. Колагенази руйнують потрійну спіральну структуру перед гідролізом пептидних зв'язків. Крім колагеназ, желатинази також відіграють важливу роль в деградації колагену. Рівень желатинази вважаються хорошим показником наявності запалення, оскільки високі концентрації доступні тільки в разі порушення нормального процесу ремоделювання [84]. Експресія металопротеаз індукується різними цитокінами (напр. інтерлейкін-1) і факторами росту [85].

Додавання до колагенових і желатинових структур матеріалів на основі глікозаміногліканів (гіалуронану і хондроїтинсульфату) призводило до посилення міграції клітин, адгезії, проліферації і диференціювання клітин і збереження диференційованих станів клітин [86], а також для контрольованого вивільнення антибактеріальних агентів [87]. Додавання колагену до керамічної структури може забезпечити безліч додаткових переваг для хірургічних застосувань: контроль форми, просторова адаптація, гемостатичні властивості і стабілізація [88]. В даний час використовуються (представлені на ринку) колагенові замінники ТМО, що мають різне походження і технологію виготовлення: це хімічно зшита оброблена висушена колагенова піна, отримана з сухожилків великої рогатої худоби; колаген, отриманий з хімічно обробленого (зшитого) бичачого перикарда; колаген з дерми плода великої рогатої худоби, є натуральною тканиною, при виробництві не проходив стадію хімічного зшивання. Хоча кожен з цих імплантів складається з колагену, однак конкретні відмінності, пов'язані з фізико-механічними властивостями замінника, пористістю і можливістю зшивання, впливають на їх біологічні характеристики та ремоделювання в

організмі, а також впливають на зручність хірургічної роботи з ними [80-85, 89, 90].

1.4.2. Желатин.

Ще одним цікавим матеріалом біомедичного призначення є желатин. Желатин як біоматеріал застосовується з 1970-х років і в останні роки має широкий діапазон застосування. Крім харчової промисловості і косметології він знаходить широке застосування у фармацевтичній промисловості як речовина для виготовлення мазей і капсул; у регенеративній медицині – для створення матриксів (плівок, нанотрубок, наночастинок) для культивування стовбурових клітин, поверхневих покриттів біоматеріалів, гідрогелів; в хірургічній сфері желатин в основному використовується у вигляді гемостатичної губки і перев'язочного матеріалу [91-93]. Його отримують термічною денатурацією колагену, виділеного зі шкіри тварин, кісток і риб'ячої шкіри. Желатин добре розчинний у воді за температури вище 40°C з утворенням в'язкого розчину. Під час охолодження розчину желатину до 20°C формуються спіралі, хоча і не дуже довгі, і тільки у тій частині матеріалу, що утворює драгли. Желатин має добрі фізичні властивості та термостабільність. Використання тваринного желатину у складі біосумісного покриття, в основному, активно вивчається у фармацевтичній сфері. Властивості і здатність желатину до утворення плівки безпосередньо пов'язані з молекулярною масою, тобто, чим вище середня молекулярна маса, тим краще якість плівки. Желатин є перспективною сировиною для виготовлення біосумісних плівок через його доступність і відносно невелику вартість [94-97].

1.4.3. Хітозан.

Хітозан – природний полісахарид (за хімічною будовою цей полімер належить до класу аміноцукрів, макромолекули якого складаються з випадково-зв'язаних β -D-глюкозамінових ланок і N-ацетил-D-глюкозаміну). Хітозан штучно отримується шляхом дезацетилювання хітину, що є головним складовим компонентом зовнішнього покриву комах, павукоподібних і ракоподібних [98, 99]. Залежно від походження і способу хімічної обробки, хітозан може мати різну молекулярну масу (від 300кД до 1000кД) і ступінь дезацетилювання (від 35% до 95%). Ступінь дезацетилювання є надзвичайно важливою характеристикою хітозану, так як від цього залежить його здатність до біодеградації: чим вищий ступінь дезацетилювання, тим довше відбувається процес біодеградації. В експерименті на щурах з підшкірною імплантацією плівкових матеріалів було показано, що хітозан зі ступенем дезацетилювання від 69% до 74% повністю розсмоктується через чотири тижні; хітозан зі ступенем дезацетилювання від 74% до 90% деградує за вказаний строк лише частково, а повна його біодеградація може тривати декілька місяців; якщо ступінь дезацетилювання хітозану складає 95% і більше, то він не є біодеградуєчим і повністю нерозчинний у водному середовищі, як *in vivo*, так і *in vitro* [100, 101].

Аспекти застосування матеріалів на його основі обумовлені хіміко-біологічними властивостями даного полімеру [102]. Це біосумісний полімер, який біодеградує в організмі до N-ацетилглюкозаміну або глюकोзаміну; має імуномодулюючу, протимікробну, фунгістатичну, протипухлинну, протизапальну, ранозагоюючу, гіполіпідемічну, гемостатичну дію і при цьому не є токсичним. Безпечність хітозану доведена лабораторними дослідженнями СМР у кролів після дурупластики в експерименті [103].

Наведені в літературі [104, 105] дослідження свідчать, що хітозан зберігає ту ж кристалічну решітку, як і хітин, але меншу впорядкованість розміщення макромолекул. Хітозан малорозчинний у воді, слабких і концентрованих розчинах лугів, органічних розчинниках, але добре розчиняється навіть у слабких мінеральних і органічних кислотах. При

розчиненні хітозану в кислому середовищі відбувається протонування аміногрупи, що забезпечує розгортання глобул, тобто загалом лінійну конформацію. Гідрокси-, карбокси- та аміногрупи, що входять до структури хітозану, в свою чергу, можуть служити місцями приєднання неуглеводних сполук, таких як залишки органічних і неорганічних кислот (з утворенням ацетатів, сульфатів, фосфатів і інших), піровиноградної кислоти, метанолу. Саме наявність у хітозані вільних аміногруп обумовлює його фізико-хімічні і, як наслідок, біологічні властивості: завдяки надлишковому позитивному (тобто катіонному) заряду його молекули легко вступають у взаємодію з негативно зарядженими молекулами [106, 107] мають добрі сорбційні і іонообмінні властивості, тому хітозан є хімічно і біологічно високоактивним біополімером. Також наявність аміногрупи надає хітозану ще однієї цікавої функціональної властивості: саме завдяки внутрішньомолекулярній взаємодії карбоксильних груп та аміногруп забезпечується спіральна конформація молекули хітозану [108].

З хімічних реакцій хітозану, як представника полісахаридів, важливе значення має гідроліз глікозидних зв'язків під дією розведених мінеральних кислот, що дозволяє отримати моносахариди, що входять до складу полісахаридів. На відміну від олігосахаридів, відновлюючі властивості у полісахаридах проявляються слабо через їхню велику молекулярну масу. Високий вміст гідроксильних груп дозволяє проводити реакції алкілювання або ацетилювання, що має важливе значення для встановлення будови полісахариду та його практичного використання [109].

Хітозан, завдяки своїй катіонній природі, може сприяти клітинній адгезії, діяти як модулятор клітинної морфології, її диференціації, рухів, синтезу і функції. Повідомляється, що хітозан індукує фібробласти для вивільнення інтерлейкіну-8, який бере участь в міграції і проліферації фібробластів і ендотеліальних клітин, однак також сприяє поверхневому тромбозу і емболізації, що обмежує його застосування у біоматеріалах, що містять елементи крові [110, 111].

Останнім часом хітозан розглядається як один з перспективних матеріалів при створенні полімерних матеріалів як каркасів для тканинної інженерії. Істотною перевагою використання хітозану є те, що завдяки своїй хімічній природі він має значну спорідненість до клітинної мембрани. Тому надзвичайно корисною властивістю хітозану є можливість його використання у роботі з клітинними культурами (кератоцитами, хондроцитами, шванівськими клітинами та іншими) без будь-якої цитотоксичності [112].

Людські сполучні тканини не містять хітозан, але його хімічна структура має схожість до глікозаміногліканів – основних компонентів позаклітинного матриксу [113, 114].

Матрикси колаген/хітозан [115], а також желатин / хітозан [116] були представлені в якості перспективного біоматеріалу у тканинній інженерії, як основу для доставки лікарських засобів, ранових пов'язок, швів, трубок для тубажу нерва. Додавання хітозану покращує механічні властивості желатину і впливає на швидкість біодеградації. Хітозан з більш високим ступенем дезацетилювання, модифікований желатином, сприяє більш високій пластичності клітин, підсилює проліферацію і зменшує апоптоз клітин. З іншого боку, м'який желатиновий комплекс з жорстким хітозаном послаблює адгезію через нейтралізацію катіонних ділянок хітозану з відповідними негативними зарядами, які переносяться желатином, і, як наслідок, продукт желатину/хітозану демонструє поліпшену мобільність клітин, міграцію [117]. Таким чином, структури, що складаються з желатину і хітозану мають відмінну здатність трансформуватися в пористі структури з хорошою клітинною сумісністю [118,119].

1.4.4. Поліетиленоксид (ПЕО).

Для покращення структурно-механічних властивостей хітозанових, колагенових та інших біополімерних матеріалів перспективними є дослідження, які спрямовані на розробку різноманітних композитних систем. Зокрема для плівкових матеріалів на основі хітозану, дуже перспективним матеріалом є поліетиленоксид (ПЕО). Ряд робіт присвячених цьому напрямку показують можливість регулювання в широкому діапазоні гідрофільних властивостей і механічних характеристик матеріалу [120], від чого залежить зручність хірургічної роботи з ним [117, 121].

ПЕО є хімічним продуктом полімеризації оксиетилену. Ефект від довжини ланцюга полімеру визначає його основні фізико-хімічні властивості [122]. Завдяки гарній прядильності він має властивість полегшувати технічну обробку хітозану при створенні нановолоконних і плівкових матеріалів. Крім того він малотоксичний, має антибактеріальні властивості і здатний до біодеградації. Управління по контролю за продуктами і ліками США (Food and Drug Administration) дозволяє його використання в якості носія в лікарських системах [123]. Вивчення застосування ПЕО в кріоконсервації препаратів крові підтверджує його незначну токсичність, порівняно з диметилсульфоксидом (який проникає у клітину і є токсичним); його вплив на клітини крові при даному виді консервації є позитивним – він дозволяє значно збільшити стійкість клітин до процесів заморожування-розморожування і зберегти їх структурно-функціональні показники на високому рівні [124]. В хірургічній практиці ПЕО використовуються у лікуванні гнійно-запальних процесів і ран шкірних покривів, де були відмічені їх бактерицидні властивості та позитивний вплив на тканинне мікрооточення, стимуляцію процесів загоєння ран. ПЕО є хорошим носієм водорозчинних іммобілізованих ферментів для виготовлення лікарських форм у вигляді мазей, емульсій, лініментів для застосування у хірургії, пульмонології, гінекології та офтальмології [125]. Молекули ПЕО в організмі не піддаються біотрансформації (тобто не утворюють метаболітів), виділяючись парентеральним шляхом у незміненому вигляді [126].

1.5. Вибір методів дослідження і експериментальної моделі черепно-мозкової травми.

1.5.1. Морфологічні методи.

Методика оцінки ефективності замітника ТМО у різних експериментальних дослідженнях *in vivo* передбачала: клінічне спостереження за піддослідними тваринами, оцінка їх фізикального і неврологічного статусу; лабораторні дослідження- загальний і біохімічний аналіз крові, загальний аналіз СМР [103, 127].

Морфологічні методики: макроскопічна оцінка є загальноприйнятою для оцінки наявності ліквореї, запальних змін, загоєння операційної рани, наявності оболонкових гематом і ступеню адгезії між шарами операційної рани; гістологічне дослідження (світлооптична мікроскопія з забарвленням препаратів гематоксиліном-еозином і трихромом за Масоном) дає можливість оцінити ступінь і швидкість біодеградації замітника ТМО, заміщення його новоутвореними колагеновими волокнами, оцінити на мікроскопічному рівні локальну клітинну відповідь, інфільтрацію фібробластами, васкуляризацію, нейтрофільну інфільтрацію і зміни в прилеглий тканині головного мозку [128, 129].

Для оцінки реакції тканини мозку (іритації) застосовувався імуногістохімічний метод з визначенням гліального фібрилярного кислого протеїну (glial fibrillar acid protein, GFAP) [127, 130]. Метод конфокальної мікроскопії дає можливість суттєво розширити інформативність гістологічних даних. Флуоресцентна (конфокальна) мікроскопія використовується для отримання зображення бактерій та органел клітини, а також для візуального підтвердження 3D особливостей зразків. Це завдання розв'язується за рахунок

використання потужних джерел світла, таких як лазери, які можуть бути сколімовані у вузький пучок дуже точно. Фокусування виконується пошарово, рівень за рівнем. Подальше покрокове співставлення отриманих сканів дає змогу візуалізувати 3D структуру досліджуваного об'єкту [131, 132].

Найважливішою перевагою оптичного конфокальної мікроскопії є те, що випромінювані фотони фокусуються об'єктивом на малій (~50 мкм) щілині детектора, який послаблює флуоресцентний сигнал від ділянок, які знаходяться не в фокусі. Однак головною перевагою конфокального мікроскопа є не збільшення роздільної здатності, яка лише в 1,4 рази перевищує звичайну оптичну мікроскопію, а суттєве зростання контрасту при формуванні зображення [133, 134].

Відомо, що ТМО переважно складається з колагенових волокон, які організовані в пучки (вважається, що така її будова сприяє загальній міцності стінки черепа). Визначено, що механічні властивості ТМО (особливо міцність на розрив і опір розриву) зумовлені механічними властивостями власне колагенових волокон і їх взаємної орієнтації. Колагенові волокна мають унікальну здатність до аутофлуоресценції – тобто здатність колагенових волокон випромінювати світло під впливом збуджуючого променя певної довжини, без застосування спеціальних флуорохромних барвників. Було доведено, що колагенові волокна зберігають здатність до аутофлуоресценції навіть у фіксованих гістологічних препаратах. Тому дослідження післяопераційного матеріалу з допомогою сучасних цифрових конфокальних мікроскопів (і відповідне програмне забезпечення) дозволяють отримати об'єктивні числові показники аутофлуоресценції досліджуваних зразків [135-137]. Таким чином вивчення структури і властивостей колагенових волокон в новоутвореній тканині ТМО (в зоні регенерації) є визначальним для оцінки успішності її пластики. Конфокальна мікроскопія дозволяє оцінити не лише морфологію волокон (довжину, товщину, звивистість, взаємне розташування, впорядкованість), але і фізичні властивості (аутофлуоресценція), які

обумовлені переважно кількістю і щільністю волокон в позаклітинному матриксі.

1.5.2. Молекулярний аналіз біологічного матеріалу за допомогою інфрачервоної спектроскопії (ІЧ Фур'є-спектроскопія).

Відомо, що для встановлення складу речовин використовують хімічні методи, однак дати відповідь на питання про просторову структуру речовини можна лише оптичними методами. Взаємодія речовини зі світлом в широкому спектральному діапазоні включає електронну, коливальну спектроскопію, рентгеноструктурний аналіз, ядерний магнітний резонанс та інші методи. В даній роботі використаний метод коливальної спектроскопії – інфрачервона спектроскопія. Частоти та інтенсивності смуг в коливальних спектрах дають інформацію про конформацію молекул та про наявність тих чи інших молекулярних груп.

При взаємодії ІЧ випромінювання з речовиною відбувається його поглинання на частотах, що відповідають деяким власним частотам коливань молекул чи кристалічної ґратки. В ІЧ спектрах поглинання спостерігають лише на тих типах коливань, на яких в процесі коливання ядер відбувається зміна дипольного моменту молекулярної групи. Інфрачервоний спектр поглинання кожної молекули є ніби її відбитком пальців, оскільки є характеристичним тільки і виключно для даної молекули. Тому інфрачервона спектроскопія є потужним аналітичним інструментом для широкого кола наукових і прикладних задач. Якщо представити двохатомну молекулу у вигляді гармонічного осцилятора, то можна визначити частоту коливання такого осцилятора. Частота буде залежати від природи зв'язку між атомами, маси атомів, взаємодії з навколишнім середовищем [138].

У випадку багатоатомної молекули частота кожного нормального коливання також визначається цим співвідношенням, проте буде складною функцією мас, координат атомів і силових констант для всіх хімічних зв'язків

і кутів. Число нормальних коливань залежить від кількості атомів в молекулі, а їх активність в спектрах комбінаційного розсіяння та ІЧ-поглинання визначається симетрією кристалу [139].

Коливально-обертальні переходи між рівнями молекули пов'язані зі зміною дипольного моменту молекули і таким чином, зміна спектральних параметрів смуг поглинання свідчить про зміну дипольних моментів відповідних переходів або про зміну кількості поглинаючих центрів [127, 128].

ІЧ Фур'є-спектроскопія є модернізованим методом ІЧ-спектроскопії, який полягає у тому, що формування спектрального контуру відбувається не завдяки прямому встановленню певної ширини щілини, швидкості сканування та інших фізичних параметрів, а потребує застосування певних математичних операцій, які виконуються обчислювальною технікою. Це дає змогу отримати вищу роздільну здатність приладу та отримати швидке перетворення даних. Фур'є-спектрометрами називають спектральні прилади, в основу роботи яких покладено принцип розрахунку реального спектру з інтерферограми за допомогою перетворення Фур'є [140-143].

1.5.3. Вибір експериментальної моделі черепно-мозкової травми.

Залежно від мети дослідження різних аспектів патогенезу черепно-мозкової травми і реакції мозку на травму були запропоновані ряд експериментальних моделей та їх модифікацій: рідинно-перкусійна травма мозку, травма контрольованого кіркового ушкодження, травма інерційного прискорення, ЧМТ в результаті падіння вантажу, ударного прискорення, вибухової ЧМТ, легкої ЧМТ, пенетруюча ЧМТ [144-147]. Вищезазначені моделі експериментальної травми мозку викликають вогнищеві або дифузні пошкодження мозку.

Останні дослідження показують, що вибір моделі може мати величезне значення в уточненні патогенезу ЧМТ. В даний час відсутнє повне розуміння

того, які патологічні процеси, викликані ЧМТ є загальними для всіх форм травми мозку і які є специфічними для того чи іншого виду травми. Виявлено ряд патернів генної регуляції, характерних для типу пошкодження [148]. Наприклад, гени, пов'язані з нейрогенезом, пригнічувалися в гіпокампі після вибухової ЧМТ, але не після ротаційної або проникаючої ЧМТ [149]. Проникаюча ЧМТ (але не вибухова або з ротаційним механізмом ЧМТ) викликала збільшення активності генів, пов'язаних з метаболічною функцією, таких як система цитохрому р450. Крім того, проникаюча і ротаційна ЧМТ викликають дві різні форми набряку: при першій периваскулярний набряк і при другому виді ЧМТ внутрішньоклітинний набряк [150 - 153].

Модель пенетраційної черепно-мозкової травми (пЧМТ) для гризунів з'явилася в 2005 році, коли була опублікована стаття про модель проникаючого балістичного ураження головного мозку [154]. У цій моделі невеликий надувний зонд вводиться в мозок щурів під наркозом і, контролюючи тиск, швидко надувається. Дана модель була розроблена для відтворення тимчасової порожнини, утвореної при проникненні високошвидкісного заряду в тканину мозку. Така модель менш підходить для моделювання травматичної дії і її впливу на мозкові оболонки, кровоносні судини і череп.

Були запропоновані моделі не фатальних пЧМТ для гризунів, де травма викликається високошвидкісним проникненням в мозок сталевого зонда через пристрій, що дозволяє регулювати швидкість зонда і глибину проникнення [155]. Дана модель пЧМТ для гризунів викликала великі руйнування тканини і крововилив в вогнище ураження, з утворенням порожнини з перебігом часу, масивний астро- і мікрогліоз, загибель нейронів і порушення гематоенцефалічного бар'єру. Після травми у тварин спостерігався руховий дефіцит. Автори рекомендують використовувати дану модель при вивченні, наприклад вибухової ЧМТ і викликаними в зв'язку з цим летючими уламками, що пошкоджують мозок (так звана третинна вибухова ЧМТ) [156].

У нашому дослідженні головний акцент приділяється оцінці взаємодії між біополімерами (колагенова, желатинова, хітазанова), ТМО і шкірно-

апоневротичним комплексом, та підлеглою корою головного мозку. Тому нами була обрана модель пенетраційної травми головного мозку, модифікована під окремі задачі нашого дослідження – вивчення насамперед впливу плівкових біополімерних матеріалів на регенерацію пошкодженої ТМО при проникаючій ЧМТ. Така модель експериментального пошкодження тканини головного мозку початково була запропонована для вивчення експериментальної черепно-мозкової травми у мишей і порушення мозкового кровообігу у щурів [157]. В подальшому така модель знайшла застосування для вивчення нейробіохімічних змін мозкової тканини в осередку травматичного ураження [158, 159].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальні положення.

Дане дослідження виконано на 120 білих щурах-самцях масою 250-300 г, середній вік тварин 10-12 міс. Утримання тварин відбувалося у віварії клініки експериментальних тварин ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України». Харчування тварин відбувалося за умови вільного доступу до збалансованого комбінованого корму і води *ad libitum*. Освітлення приміщення змінювалося відповідно до природного добового ритму.

Проведення експерименту схвалене Комітетом з біоетики ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України (протокол № 18 від 10.06.2016 р.). При цьому враховані принципи біоетики, які регламентуються Законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006) і Директивою 2010/63/ЄС «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» (2010).

2.2. Розподіл тварин на експериментальні групи.

Тварин було розділено на 6 груп (5 досліджуваних груп і 1 група псевдооперованих тварин(контроль)) по 20 тварин у кожній групі:

1. Моделювання ЧМТ з аутопластикою ТМО (n=20).
2. Моделювання ЧМТ з пластикою ТМО хітозановою плівкою (n=20).
3. Моделювання ЧМТ з пластикою ТМО хітозановою плівкою в комбінації з желатиновою плівкою (n=20).
4. Моделювання ЧМТ з пластикою ТМО колагеновою плівкою (n=20).
5. Моделювання ЧМТ з пластикою ТМО колагеновою плівкою в комбінації з желатиновою плівкою (n=20).

6. Група псевдооперованих тварин (n=20).

Кожна з груп поділялася на дві підгрупи: для отримання результатів спостереження на 3 і 6 тижднів.

2.3. Моделювання проникаючої ЧМТ (хірургічна частина експерименту).

Усі хірургічні втручання виконували під загальним знеболенням, шляхом внутрішньом'язового введення суміші розчинів ксилазину (Sedazin, Biowet, Польща) з розрахунку 15 мг/кг і кетаміну (Calipsol, Gedeon Richter, Угорщина) з розрахунку 70 мг/кг маси.

Біополімерні плівки на основі хітозану являють собою новий експериментальний композитний матеріал, з масовою часткою хітозану 70% і масовою часткою поліетиленоксиду (ПЕО) 30% - хітозан-ПЕО 70/30мас.%. *Примітка: тут і далі під словосполученням «хітозанова плівка» або «плівка на основі хітозану» слід розуміти плівковий матеріал хітозан-ПЕО 70/30мас.%. Товщина плівок на основі хітозану 0,025 мм. Плівки розроблені і виготовлені у відділі хемосорбції і гібридних матеріалів Інституту хімії поверхні ім.О.О.Чуйка, Київ, Україна. Колагенові плівки, які були використані в дослідженні є комерційно доступними, являють собою натуральну девіталізовану сполучно-тканинну мембрану кінського походження. Середня товщина- близько 0,2 мм. Желатинові плівки також були розроблені і виготовлені у відділі хемосорбції і гібридних матеріалів Інституту хімії поверхні ім.О.О.Чуйка, Київ, Україна. Їх середня товщина близько 0,3 мм.*

Тваринам виконували краніотомию у правій тім'яній ділянці, розкривали ТМО і наносили травму мозку з наступною пластикою ТМО різними видами полімерних плівок. Після видалення шерстистого покриву голови і дезінфекції розчином бетадину 10 % (Betadine, Egis, Угорщина) проводили розріз по середній лінії і оголювали кістки склепіння черепа. Формували трепанаційний отвір розміром 4×7 мм в правій тім'яній ділянці за допомогою

висошвидкісного дриллю. Кістковий клапоть відсепаровували від підлеглої ТМО і видаляли. ТМО обережно розсікали хрестоподібно від середини отвору до його кутів. Для цього під ТМО в центрі трепанаційного вікна заводилася голка розміром G 32, потім ТМО обережно підтягувалася, надсікалася скальпелем і далі розсікалася ножицями від середини до кутів трепанаційного вікна. Оголювали поверхню мозку і проводили penetрацію кори головного мозку голкою G 18 на глибину 2 мм, перпендикулярно до поверхні кори. Кровотечу з кіркових судин зупиняли за допомогою ватної кульки, яку потім видаляли. Таким чином було змодельовано вогнище геморагічного забою.

Після забезпечення гемостазу у тварин першої групи клапті твердої мозкової оболони укладалися на місце (з діастазом між краями) і рана ретельно ушивалася, при цьому кістковий клапоть на місце не укладався. Таким чином було змодельовано декомпресивну трепанацію черепа при тяжкій ЧМТ. Після забезпечення гемостазу рану ушивали шовним матеріалом вікріл №5/0 і повторно обробляли розчином бетадину. Проводили антибіотикопрофілактику (цефтріаксон внутрішньом'язово 20 мг/кг).

Для тварин другої групи всі хірургічні маніпуляції проводилися аналогічно, але після penetрації мозку і укладання на місце клаптів твердої мозкової оболони поверх них укладалася хітозанова плівка (за розміром, відповідним трепанаційному вікну).

Для тварин третьої групи всі хірургічні маніпуляції проводилися аналогічно, але після penetрації мозку і укладання на місце клаптів твердої мозкової оболонки поверх них укладалася хітозанова плівка (за розміром, відповідним трепанаційному вікну) і потім укладалася желатинова плівка (розміром 6×9 мм) поверх кісткового вікна. Таким чином зона трепанаційного отвору ізолювалася від тканин скальпа.

Для тварин четвертої групи всі хірургічні маніпуляції проводилися аналогічно, але після penetрації мозку і укладання на місце клаптів твердої

мозкової оболонки поверх них укладалася колагенова плівка (за розміром , відповідним трепанаційному вікну).

Для тварин п'ятої групи всі хірургічні маніпуляції проводилися аналогічно, але після penetрації мозку і укладання на місце клаптів твердої мозкової оболони поверх них укладалася колагенова плівка (за розміром , відповідним трепанаційному вікну) і потім укладалася желатинова плівка (розміром 6×9 мм) поверх кісткового вікна. Таким чином зона трепанаційного отвору ізолювалася від тканин скальпа.

Для тварин шостої групи хірургічна процедура обмежувалася лише введенням в наркоз і розрізом шкіри голови, оголенням кісток склепіння черепа з наступним ушиванням м'яких тканин. Також проводилася обробка рани бетадином і антибіотикопротекція (у тій же дозі). Краніотомія і моделювання травми не проводилися. Це пов'язано з необхідністю отримання інтактною ТМО (ТМО не може вважатися інтактною після від сепарування від неї кісткового клаптя).

Тварин виводили з експерименту на 3 і 6 тижнях шляхом декапітації під наркозом кетаміном 0,1 % – 2 мл. Детальний опис хірургічних процедур і задачі вирішення описано у таблиці 2.1. Фотоматеріали з коротким описом послідовності хірургічних процедур наведено на рисунках 2.1-2.10.

Після декапітації наступним етапом було відокремлення зони трепанації від решти кісток склепіння черепа: для цього від кожного краю трепанаційного вікна на відстані 2,5-3мм з допомогою циркулярної фрези робилися перпендикулярні один до одного пропили , так щоб сформувався прямокутник розміром 9×12 мм з трепанаційним вікном в його середині. Решта кісток склепіння черепа відділялася від його основи і видалялася. Після цього оцінювалася макроскопічна картина стану мозкових оболонок і внутрішньої поверхні черепа в зоні трепанації, відбиралися зразки тканин для молекулярного дослідження.



Рис. 2.1. Операційне поле. Розрізом по середній лінії оголюється череп.
Права парієтальна ділянка.



Рис.2.2. Трепанаційне вікно на етапі формування 4 x 7 мм. Контроль розміру.



Рис. 2.3. Сформоване трепанаційне вікно у правій тім'яній ділянці за допомогою високооборотистого дриллю.



Рис. 2.4. ТМО перед розсіченням. Під ТМО обережно , щоб не пошкодити мозок, заводилася голка від інсулінового шприцу.



Рис. 2.5. Розсікання ТМО. Оболона припіднімалася і розсікалася хрестоподібно від середини отвору до його кутів



Рис. 2.6. ТМО після розсічення, один з клаптів піднятий.



Рис.2.7. Нанесення травми (пенетрація мозку) кори голкою розміром G 18 на глибину 2 мм.

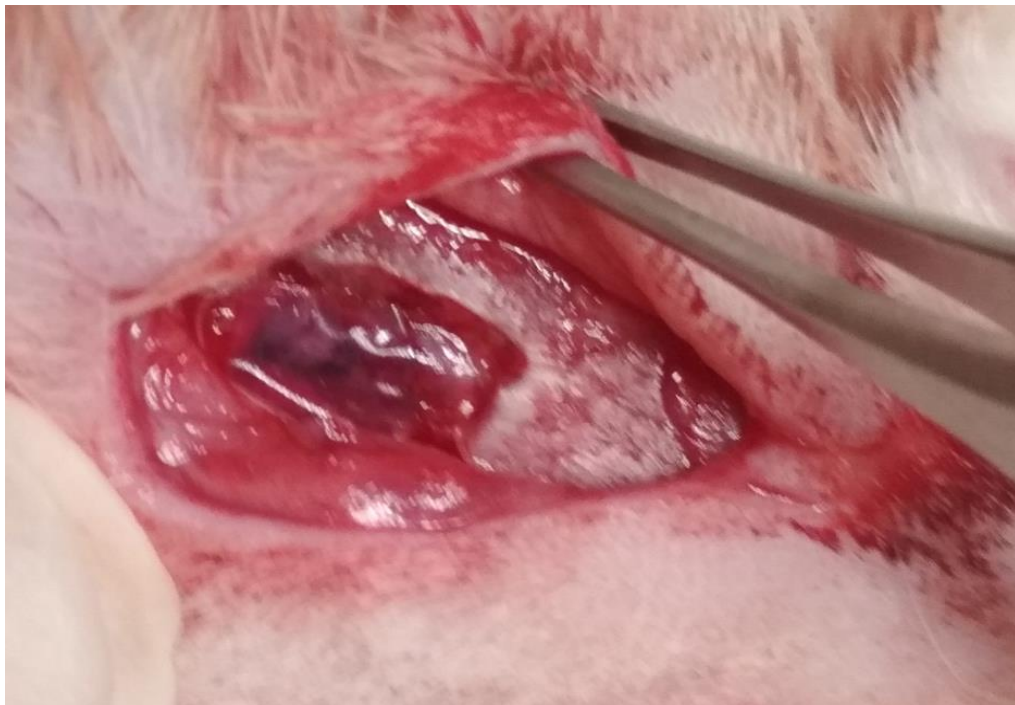


Рис.2.8 Плівка (хітозан) укладена поверх клаптів ТМО.



Рис. 2.9. Плівка (колаген) укладена поверх клаптів ТМО.



Рис. 2.10. Желатинова плівка , укладена поверх трепанаційного вікна (епідурально і над кісткою)

Групи експериментальних тварин

| Група | Описання | Яка задача вирішується |
|-------|---|---|
| 1 | Розсічення шкіри, сепарування апоневрозу, формування кісткового вікна , хрестоподібно розсікається ТМО , проводиться травма мозку шляхом penetрації, потім клапті ТМО укладаються на місце без ушивання | Вивчення регенерації ТМО природнім шляхом в умовах ушкодженого мозку (група аутопластики). |
| 2 | Розсічення шкіри, сепарування апоневрозу формування кісткового вікна, розсічення | Вивчення регенерації ТМО під впливом даного матричного матеріалу, особливості і відмінності формування рубця, |

продовження таблиці 2.1

| | | |
|---|---|--|
| | ТМО, проводиться травма мозку шляхом penetрації, укладається матричний матеріал (хітозан). | можливість профілактики ліквореї, запальні зміни, васкуло- і ангиогенез. |
| 3 | Розсічення шкіри, сепарування апоневрозу, формування кісткового вікна, формування дефекту ТМО, проводиться травма мозку шляхом penetрації, укладається матричний матеріал (хітозан) з доповненням желатиноюю плівкою поверх кісткового вікна. | Додатково досліджується можливість позитивного впливу желатину на зменшення кровотечі, запалення, зменшення утворення надмірного спайкоутворення між ТМО, шкірно-апоневротичним клаптем і між ТМО і поверхнею мозку. |

| | | |
|---|---|---|
| | | |
| 4 | Розсічення шкіри, сепарування апоневрозу, формування кісткового вікна, хрестоподібно розсікається ТМО, укладається матричний матеріал (колаген). | вивчення регенерації ТМО під впливом даного матричного матеріалу, особливості і відмінності формування рубця, можливість профілактики ліквореї, запальні зміни, васкуло- і ангиогенез. |
| 5 | Формування кісткового вікна, розсічення ТМО, проводиться травма мозку шляхом пенетрації, укладається матричний матеріал (колаген) з доповненням желатиноюю плівкою поверх кісткового вікна. | Вивчення регенерації ТМО під впливом матричного матеріалу, особливості і відмінності формування рубця, можливість профілактики ліквореї, запальні зміни, васкуло- і ангиогенез при умові ушкодженого мозку. |

продовження таблиці 2.1

| | | |
|---|---|--|
| | | Додатково досліджується можливість позитивного впливу желатину на зменшення кровотечі, запалення, зменшення утворення надмірного спайкоутворення між ТМО, шкірно-апоневротичним клаптом і між ТМО і поверхнею мозку. |
| 6 | Розсічення шкіри, сепарування апоневрозу, формування кісткового вікна не проводиться, рана пошарово ушивається. | Група псевдооперованих тварин. Отримання інтактної ТМО. |

2.4. Макроскопічна оцінка вираженості рубцево-спайкової тканини в зоні трепанаційного вікна.

Формування адгезії оцінювали на основі макроскопічних ознак стану рубцевої тканини (спайок) між корою мозку та кістками склепіння черепа, по центру та периферії трепанаційного вікна. За основу було взято шкалу адгезії "Stryker" US [159]. Але при оцінці за шкалою "Stryker" не враховується топографо-анатомічні характеристики сформованих рубцево-спайкових тяжів (злук), тому нами було розроблено модифікацію даної шкали для морфологічної оцінки рубцевих змін у зоні трепанаційного вікна. Загальна сума балів, які були нараховані, відповідала вираженості рубцево-спайкової тканини (табл .2.2).

Оцінка вираженості рубцево-спайкової тканини в зоні трепанаційного вікна Таблиця 2.2

| Описання модифікованих ознак | Периферія (основна оцінка) | Центр (додаткова оцінка) |
|---|----------------------------|--------------------------|
| Відсутні спайки | 0 | 0 |
| Одиничні тонкі, нитковидні, легко відділяються від підлеглих тканин | 1 | 1 |
| Помірно виражені, займають менше $\frac{1}{4}$ периметру трепанаційного вікна | 2 | 2 |

| | | |
|--|---|---|
| Широкі грубі злуки, відділення від прилеглої ТМО викликає її розрив (і/або кори мозку), займають не менше ¼ периметру трепанаційного вікна | 3 | 3 |
| Min 0, Max 6 балів | | |

Примітка: додаткові ознаки служать для урахування топографо-анатомічних особливостей рубцево-спайкових процесів в центрі трепанаційного вікна. Спочатку проводиться оцінка злук по периметру трепанаційного вікна з присудженням додаткових балів від 0 до 3, потім після розділення злук оцінюється наявність злук (рубцево-спайкових тяжів) в центрі вікна. При наявності таких нараховуються додаткові бали за тим же принципом (від 0 до 3).

2.5. Гістологічні методи.

2.5.1. Світлооптична мікроскопія.

Після виведення тварин з експерименту імплантовані плівки разом головним мозком єдиним блоком фіксували у розчині нейтрального формаліну (послідовно 5-7-10%, 24 години), зневоднювали у етанолі, толуолі і ущільнювали у парафіні (Thermo Scientific Richard-Allan Scientific, Paraffin type 6 REE 8336, Kalamazoo, USA). На мікротомі HM430 (Microm, Germany) одержували зрізи товщиною 7 мкм, забарвлювали гематоксиліном та еозином, пікросіріусом червоним (Direct Red 80, Magnacol Ltd, UK) і заключали у бальзам (Thermo Scientific Richard-Allan Scientific Cytoseal 60, REF 8310-16, Kalamazoo, USA). Мікропрепарати досліджували на мікроскопі Axiophot (Carl Zeiss, Germany). Морфометричне дослідження товщини ТМО проведено за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss software (AxioVision SE64 Rel.4.9.1, Germany).

Мікроскопічна оцінка інтенсивності регенерації тканини ТМО.

На рівні трепанаційного вікна оцінювали стан і динаміку формування регенеруючої тканини ТМО на основі загальноморфологічних характеристик щільності фібробластів, колагенових волокон і судин у мікропрепаратах регенеруючої ТМО. Принцип методу полягає у присвоєнні балу від одного до трьох за кожну з ознак (1 бал-слабко виражена ознака, 2 бали- середня вираженість ознаки, 3 бали- виражена ознака), яку наведено у таблиці 2.3, на кожен з досліджуваних зразків.

Таблиця 2.3

Шкала мікроскопічної оцінки інтенсивності регенерації тканини ТМО

| Морфологічний показник | Бал |
|------------------------------------|-----|
| Товщина волокон колагену | 1-3 |
| Організованість волокон в пучки | 1-3 |
| Кількість волокон у полі зору | 1-3 |
| Звивистість волокон | 1-3 |
| Кількість фібробластів у полі зору | 1-3 |
| Кількість фіброцитів у полі зору | 1-3 |

продовження таблиці 2.3

| | |
|-----------------------------|-----|
| Кількість судин у полі зору | 1-3 |
| Min 7, Max 21 бали | |

2.5.2. Конфокальна мікроскопія.

Для конфокальної мікроскопії тканини зони операції єдиним блоком заливали у парафін за вищеописаною методикою. На мікротомі HM430 (Microm, Germany) одержували зрізи товщиною 7 мкм, забарвлювали гематоксиліном та еозином і заключали у середовище (Thermo Scientific Richard-Allan Scientific Cytoseal 60, REF 8310-16, Kalamazoo, USA). На

конфокальному мікроскопі Carl Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss, Germany) досліджували аутофлюоресценцію білкового матриксу у регенератах ТМО (об'єктиви Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr, фотокамера Zeiss AxioCam). Люмінесцентні зображення отримані при збудженні лампою UV HBO 100 зеленим (Fset10 wf), та червоним (Fset20 wf) фільтрами, а також при збудженні лазерами з довжинами хвиль 488 нм (зелений) і 543 нм (червоний). У програмному забезпеченні Zeiss LSM Image Version 4.0.0.241 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) зображення розділяли за каналами (збудженні лазерами відповідної довжини хвилі).

Зображення, які одержані після збудження лазером 488 нм (зелений) і 543 нм (червоний), оцінено за використання програмного забезпечення ImageJ 2.2.0/1.53c; 64-bit Java 1.8.0_172. Наступні математичні та статистичні операції проводили із значенням вимірювання (Mean gray value), яке відповідає рівню інтегральної щільності (integrated density) на одиницю площі (area). Результатом вимірювань є значення інтегральної щільності позитивного випромінювання на одиницю площі (результат додатково представлений у формі гістограм). Обмеження методу: еритроцити мають яскраву аутофлюоресценцію, яка вносить похибку у оцінку показника на великих регіонах, тому перед вимірюваннями еритроцити видаляли із зображення у ImageJ шляхом функції “freehand selection” і “delete”.

2.6. Інфрачервона спектроскопія.

Методом ІЧ-спектроскопії досліджували зразки ТМО об'ємом до 0,5 мм³ у 5 точках від кожної тварини. Для аналізу ІЧ спектрів поглинання були зроблені тонкі зрізи тканин післяопераційного матеріалу, які висушені при кімнатній температурі між двома пластинками CaF₂ (флюоритове скло, прозоре в ІЧ області). Далі отримані плівки на підложках були поміщені в кюветну камеру приладу для реєстрації спектрів поглинання. Спектри були зареєстровані на спектрометрі Bruker INVENIO-R (Germany) в широкому спектральному

діапазоні (від 3800 до 800 cm^{-1}) при кімнатній температурі і вологості порядку 60% в кюветній камері.

Досліджуваний зразок встановлювали в одному з плечей інтерферометра, або на його виході в змішаних пучках. Для того, щоб отримати спектр пропускання, виконано такі дії: 1) спочатку реєструється інтерферограма вільного каналу (без зразка). Після перетворення Фур'є отримуємо спектр порівняння $R(\nu)$; 2) потім встановлюємо в каналі досліджуваний зразок і реєструємо інтерферограму зі зразком. Після перетворення Фур'є отримуємо спектр зразка $S(\nu)$. Він виглядає схожим на $R(\nu)$, але має меншу інтенсивність в областях поглинання зразка; 3) вихідний спектр пропускання $T(\nu)$ визначається як відношення $T(\nu)=S(\nu)/R(\nu)$.

Для аналізу спектральних даних була використана програма OPUS 4.2 (Bruker Corp., Germany). Всім спектрам була проведена корекція базової лінії методом ламаної лінії по 10-15 точках, а також нормалізація за поглинанням в області 1650 cm^{-1} (смуга Амід I) для того, щоб привести до однакового значення кількість поглинаючих центрів.

В ІЧ-спектрах білків і поліпептидів основними є смуги поглинання амідної групи, тобто пептидного зв'язку – CO – NH –. Існує 9 форм таких коливань: аміди А, В, I – VII . Частоти цих коливань наведені в Таблиці 2.4. ІЧ-смуги амідів I та II чутливі до водневих зв'язків, наявність яких викликає значні пониження частот і збільшення напівширини смуг.

Таблиця 2.4

Характеристики коливань амідних груп

| <i>Смуга</i> | <i>Частота, cm^{-1}</i> | <i>Характер коливання</i> |
|--------------|---|--|
| Амід А | 3300 | N - H (ν) валентне |
| Амід В | 3100 | |
| Амід I | 1600-1700 | C=O (ν)валентне |
| Амід II | 1500-1600 | - NH (δ)деформаційне, C - N (ν)валентне |
| Амід III | 1200-1300 | C – N (ν)валентне, - NH (δ)деформаційне |

| | | |
|----------|---------|---|
| Амід IV | 600-750 | O=C – N (δ) деформаційне |
| Амід V | 650-800 | - NH (δ) деформаційне |
| Амід VI | 500-600 | - CO (δ) деформаційне |
| Амід VII | 200 | Крутильне коливання навколо - C – N зв'язку |

Смути амідної групи, зокрема амід I і амід II, виявляються характеристичними і мають чітко визначені частоти для α -спіралі, β -форми і неупорядкованої форми поліпептидного ланцюга, що дає можливість провести конформаційний аналіз вторинної структури білка (табл. 2.5).

Смути амід A і амід B та їх зміни при утворенні водневого зв'язку є важливими для дослідження, вони відповідають валентним коливанням груп NH (зв'язаних водневим зв'язком) і проявляються в області 3300 і 3100 cm^{-1} відповідно. Плече в області 3400 cm^{-1} відповідає валентним водневопов'язаним коливанням молекулярних груп OH. Ці смуги є конформаційно чутливими та чутливими до зміни вологості досліджуваних зразків, зокрема при переході нативний колаген – денатурований колаген відбувається низькочастотний зсув максимуму. Положення смуг валентних коливань CH_2 (2921 та 2851 cm^{-1}) та CH_3 (2956 та 2873 cm^{-1}) є дуже стабільними, однак може різко змінюватись їх відносна інтенсивність, що може свідчити про перебудову у вторинній структурі досліджуваних зразків.

Таблиця 2.5

Віднесення положень смуги амід I до вторинної структури білка у водному розчині

| Вторинна структура | Положення смуги амід I у H_2O , cm^{-1} | |
|--------------------|--|------------|
| | Середнє значення | Екстремуми |
| α -спіраль | 1654 | 1648-1657 |
| | 1633 | 1623-1641 |

| | | |
|----------------------|------|-----------|
| β-форма | 1684 | 1674-1695 |
| Повороти | 1672 | 1664-1686 |
| Невпорядкована форма | 1654 | 1642-1657 |

При утворенні водневого зв'язку смуга амід I (в основному, валентне коливання C=O) зміщується у низькочастотну область, а саме з 1670-1700 см⁻¹, що відповідають коливанням вільних груп C=O, до 1630-1680 см⁻¹. Для білків і поліпептидів у твердому стані згідно з розрахунками значення $\nu_0(\text{C}=\text{O})$ складає 1658 см⁻¹. Цю частоту спостерігають лише для невпорядкованої конформації у твердому стані. Для впорядкованих конформацій смуга 1658 см⁻¹ внаслідок специфічної взаємодії між сусідніми пептидними групами розщеплюється на кілька складових з різними частотами та інтенсивності. Для антипаралельної β-складчастої структури найінтенсивніша складова спостерігається при 1632 см⁻¹, а найслабша – при 1685 см⁻¹. Для α-спіралі характерні сильна смуга при 1650 см⁻¹ і слабка смуга при 1646 см⁻¹. Важливо зазначити, що ці зміщення зумовлені зміною геометрії та вторинною структурою молекули, а не зміною довжини зв'язку.

Смуга Амід I теж є конформаційно чутливою. В цю область вносять вклад коливання валентні C=O (80%), валентні C-N (10%), деформаційні N-H (10%) При утворенні водневого зв'язку положення смуги Амід I зміщується у низькочастотну область, а саме з 1670-1700 см⁻¹, що відповідають коливанням вільних груп C=O, до 1630-1680 см⁻¹. Внаслідок специфічної взаємодії між сусідніми пептидними групами Амід I розщеплюється на кілька складових з різними частотами та інтенсивностями. Методом розкладу цієї смуги на компоненти можна розрахувати вклад різних конформацій білка. Конформаційний склад смуги Амід I можна визначити як [6]: α-спіраль (1650 см⁻¹), β-шари (1679, 1626 см⁻¹), β-повороти (1,691 1669 см⁻¹), потрійна спіраль (1637 см⁻¹), бокові ланцюги (1608 см⁻¹), невпорядкована структура (1647 см⁻¹).

Коливання амід II та амід III складніші. У поліпептидах і білках з впорядкованою структурою ці смуги можуть давати розщеплення, аналогічне амиду I. Частота смуги амід V (неплоске деформаційне коливання NH) також значно зростає при утворенні водневого зв'язку, крім цього відбувається розширення смуги. У системах з водневими зв'язками ця смуга дуже широка і дифузна. Внаслідок того, що коливання амід V не є коливанням окремого зв'язку, а його частота сильно змінюється при конформаційних переходах.

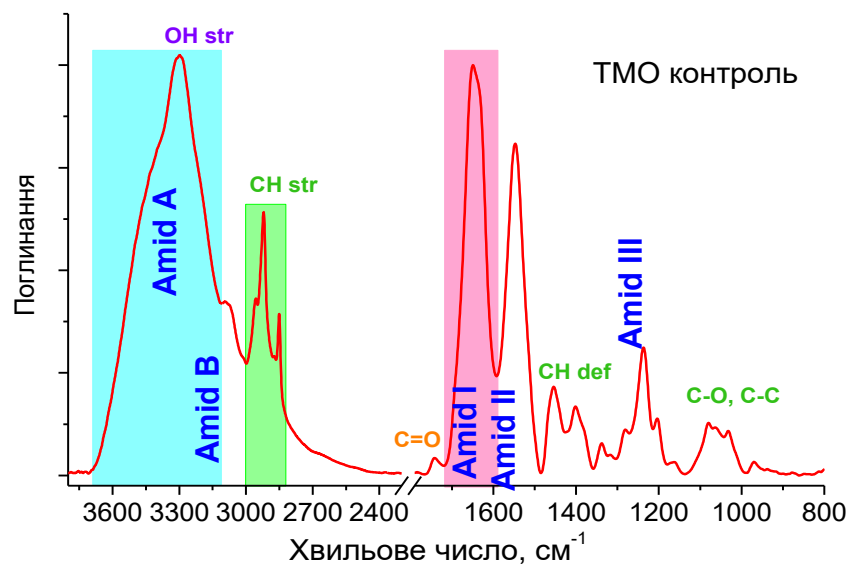


Рис. 2.11. Схематичне зображення FTIR спектру білкової молекули (контрольна ТМО).

Отже, вивчення водневих зв'язків у невеликих модельних сполуках, а також у поліпептидах і білках методом інфрачервоної спектроскопії дозволяє визначити основні аспекти структури білка. Це відкрило широкі перспективи для дослідження геометрії конформацій молекул з водневими зв'язками між групами CONH, які відповідають за утворення вторинної структури в білках.

В якості прикладу інтерпретації ІЧ-спектроскопії на рисунку 3.2. представлено графік FTIR спектру хітозану. ІЧ спектр чистого (нативного) хітозану має характерні смуги поглинання в області 3400 см^{-1} , що відносяться

до ОН водневопов'язаних молекулярних груп, валентні коливання СН в області 2900-2800 см^{-1} . Поглинання в області 1658 см^{-1} відноситься до С=О валентних коливань разом з незначним вкладом деформаційних коливань NH_2 , а смугу в області 1584 см^{-1} відносимо до NH_2 см^{-1} деформаційних коливань. Область 1400-1300 см^{-1} є характерною для деформаційних коливань молекулярних груп СН. Область 1200-800 см^{-1} відноситься до поглинання молекулярних груп С-О, С-С.

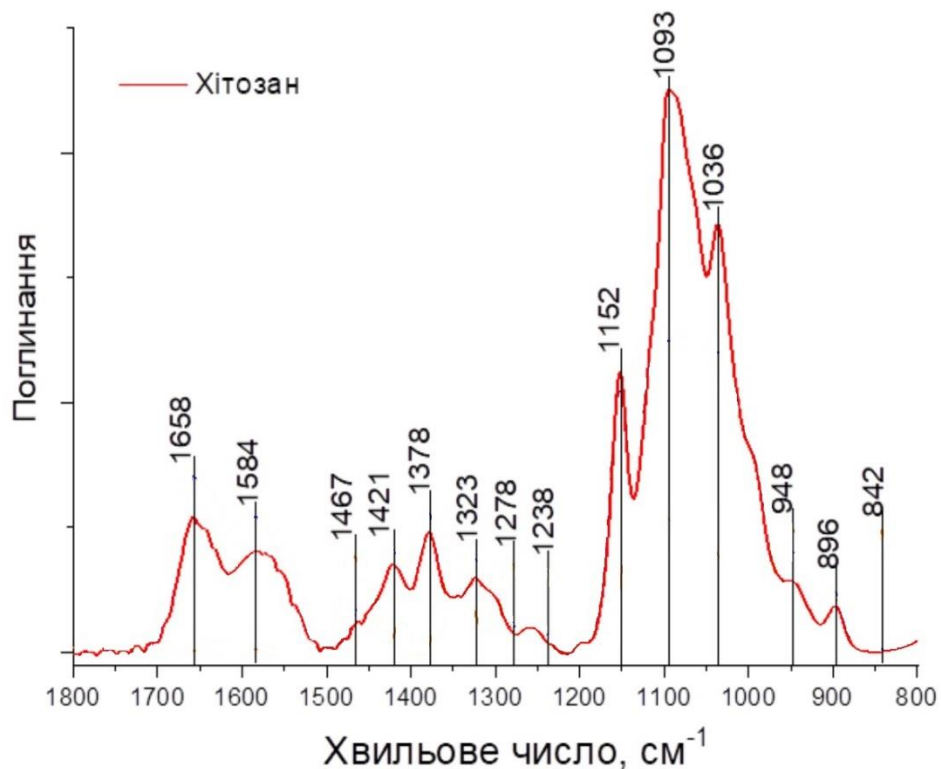


Рис. 2.12. FTIR спектри хітозану.

Кількісна оцінка ІЧ спектрів полягала у вимірюванні площі окремих смуг під кривою поглинання і загальної площі під кривою в діапазоні 1800-800 см^{-1} , як інтегральну інтенсивність коливань у ІЧ спектрі.

2.7. Статистичні методи

Статистичну обробку даних проведено за допомогою програмного забезпечення StatPlus 5.9.9.4/Core v6.7.3 (AnalystSoft Inc., США). Гіпотезу

нормального розподілу у вибірках даних перевіряли за критерієм Колмогорова-Смирнова. Міжгрупові відмінності даних досліджували за використання одностороннього дисперсійного аналізу з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test) та непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні. Використано метод лінійної кореляції Пірсона. Усі дані представлено як середнє значення \pm стандартна похибка середнього значення ($M \pm m$). Різницю вважали достовірною при $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ МАКРОСКОПІЧНОГО МЕТОДУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Тварини були виведені з експерименту на 3 і 6 тиждень (кетамін 0,1%, 2 мл) і оцінено макроскопічні зміни в кожній групі. Розсікалася шкіра по середній лінії голови і відділялася від кісток склепіння черепа, зона операції в ділянці трепанаційного вікна макроскопічно оцінювалася (у групі n=5) на предмет наявності зрощень між шкірою і поверхнею новоутвореної сполучної тканини в просвіті трепанаційного вікна. Таких зрощень (спайок, рубців) в жодній групі тварин виявлено не було. Ділянка дефекту черепа у тварин усіх груп була заповнена сполучною тканиною еластичної або щільно-еластичної консистенції, блискуча і частково прозора на вигляд, при цьому рівномірно заповнювала весь просвіт трепанаційного вікна (рис 3.1).



Рис. 3.1. Трепанаційне вікно на 3 тиждень після моделювання проникаючої ЧМТ і аутопластики. Примітка: ← контур трепанаційного вікна. Макропрепарат.

Разом з тим звертає на себе увагу, що у тварин груп 3 і 5 відзначалися залишки желатинової плівки і наявність пухкої сполучної тканини в зоні навколо трепанаційного вікна. Для тварин досліджуваної групи 3 (хітозанова плівка в комбінації з желатиновою плівкою) були характерними наявність залишків желатину у вигляді жовтої субстанції в проекційній зоні трепанаційного вікна (рис 3.2).

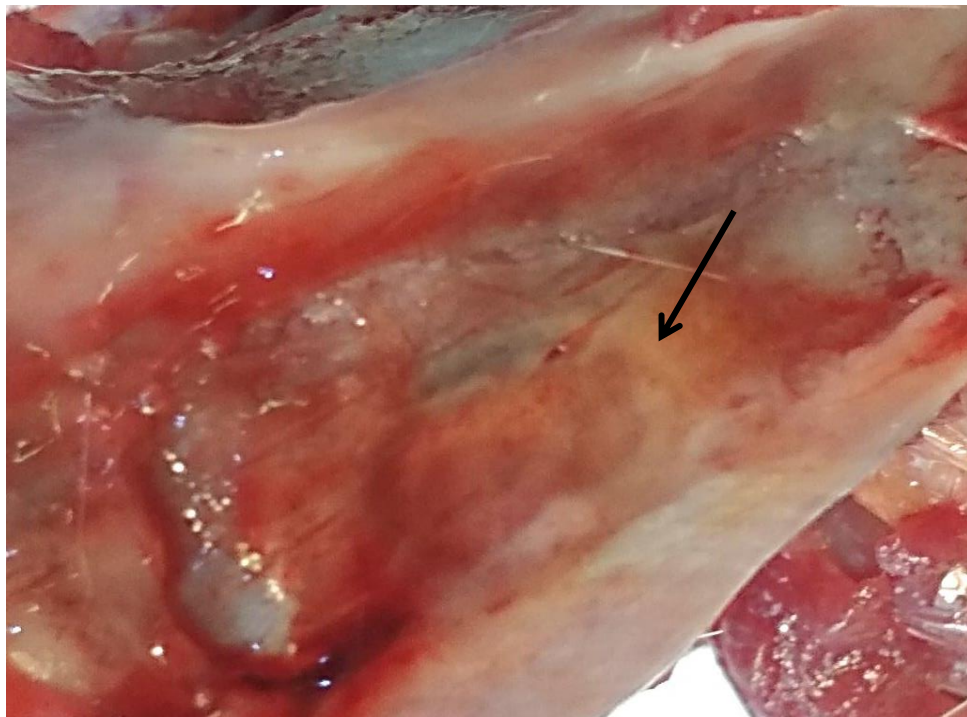


Рис. 3.2. Склепіння черепа з зоною операції і застосуванням хітозану і желатину (група 3) на 3 тиждень після моделювання ЧМТ. В ділянці трепанаційного вікна візуально добре помітні залишки желатинової плівки (жовта субстанція) і пухка сполучна тканина навколо зони операції. Примітка: ← залишки желатину у трепанаційному вікні. Макропрепарат.

Для тварин групи 5 (колагенова плівка в комбінації з желатиновою плівкою) у всіх тварин були виявлені більше або менше виражені утворення пухкої сполучної тканини над і навколо зони трепанації (рис. 3.3); але, як було

зазначено вище, помітних зрощень (злук) з тканинами скальпа вони не утворювали.

Наступним етапом було відокремлення зони трепанації від решти кісток склепіння черепа: для цього від кожного краю трепанаційного вікна на відстані 2,5-3,0 мм з допомогою циркулярної фрези робилися перпендикулярні один до одного пропили, так щоб сформувався прямокутник розміром 9×12 мм з трепанаційним вікном в його середині. Решта кісток склепіння черепа відділялася від його основи і видалялася. Після цього кістковий фрагмент обережно піднімався і оцінювалася макроскопічна картина стану мозкових оболонок і внутрішньої поверхні черепа в зоні трепанації (за шкалою STRYKER, див. далі). Після завершення макроскопічної оцінки проводився відбір шматочків тканин регенерату ТМО і рубцево-спайкових утворень спектроскопічних досліджень.

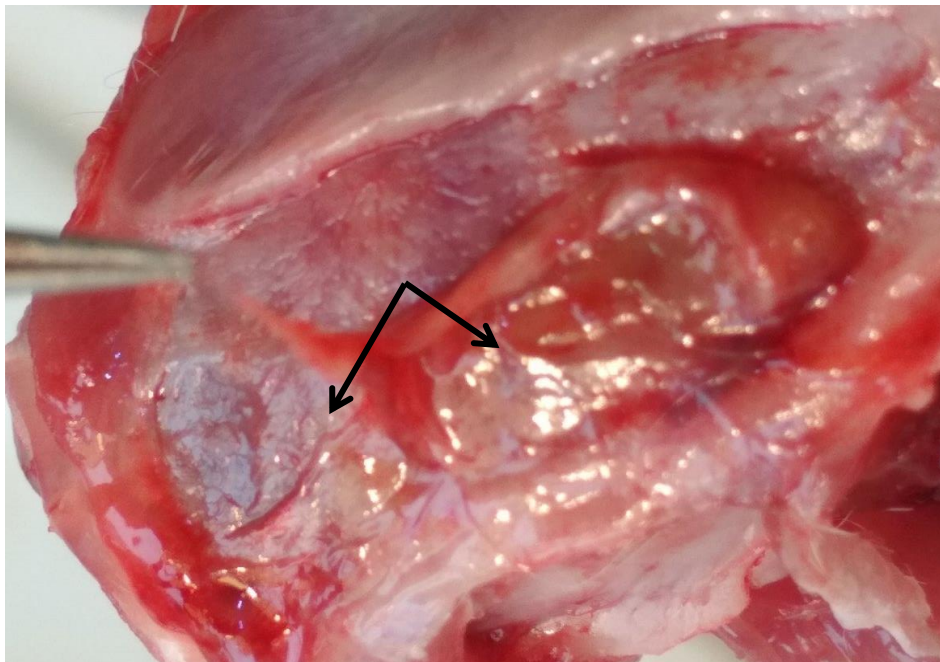


Рис. 3.3. Склепіння черепа з зоною операції і застосуванням колагену з желатином (група 5) 3 тиждень після моделювання ЧМТ. Примітка: ← пухка сполучна тканина у місці укладання желатину. Макропрепарат.

При цьому у тварин з аутопластикою (група 1) візуально були виявлені грубі широкі зрощення по периферії кісткового вікна (між кістковими краями і поверхнею ТМО), а також спайки (поодинокі, у вигляді тонких тяжів) мали місце і безпосередньо в просвіті трепанаційного вікна (Рис. 3.4 і 3.5).

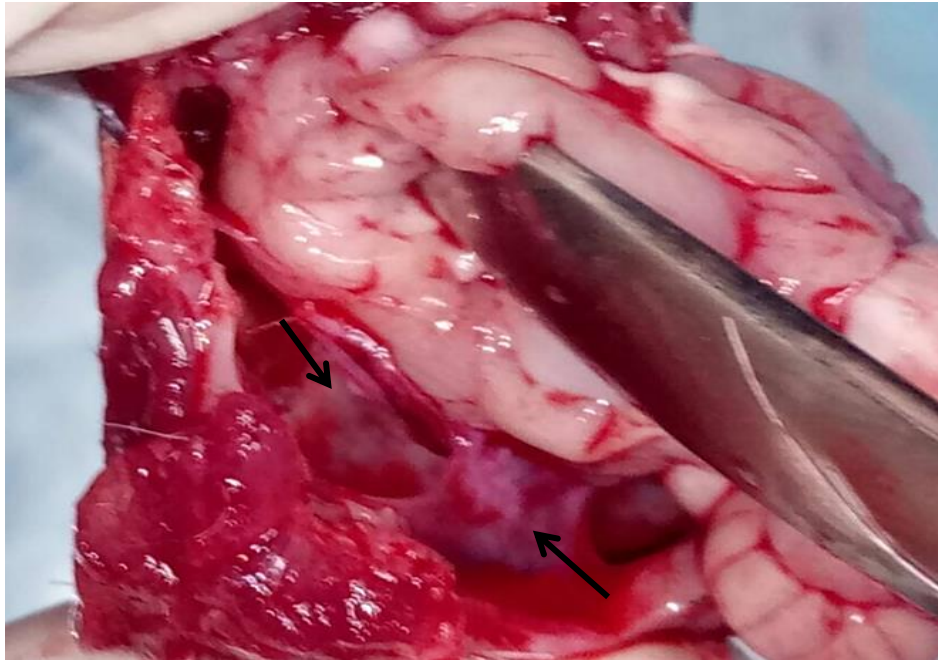


Рис. 3.4. Виражені грубі широкі спайки в зоні трепанаційного вікна. Термін спостереження 3 тиждень. Примітка: ← рубцево-спайкова тканина. Макропрепарат.

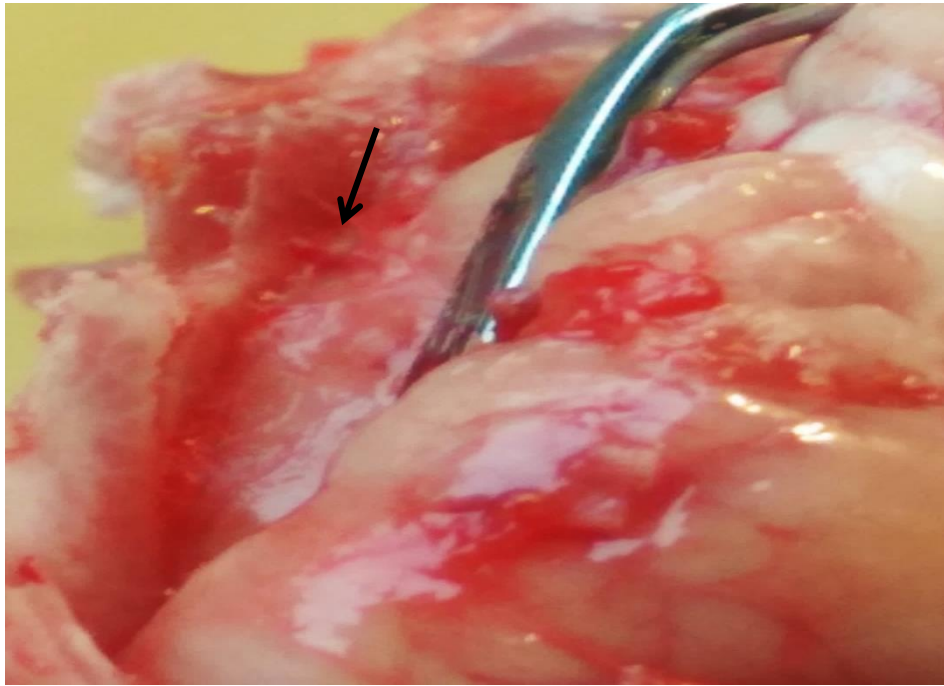


Рис. 3.5. Візуально визначаються ниткоподібні спайки (злуки) в проекції кісткового вікна (спайки по периферії вікна попередньо відпрепаровані). Вигляд знизу. Термін спостереження 3 тижні. Примітка: ← рубцево-спайкова тканина. Макропрепарат.

Після застосування хітозану (група 2) візуально залишки плівки не виявлялися, ділянки регенерату ТМО в зоні операції візуально були подібними до материнської ТМО поза зоною операції, на вигляд блискучі, м'якої консистенції (поверхня ТМО в зоні і поза зону трепанації візуально майже не відрізнялися), відзначалися зрощення по периферії кісткового вікна (менше виражені ніж у тварин першої групи), зрощень в просвіті трепанаційного вікна виявлено не було (рис. 3.6).

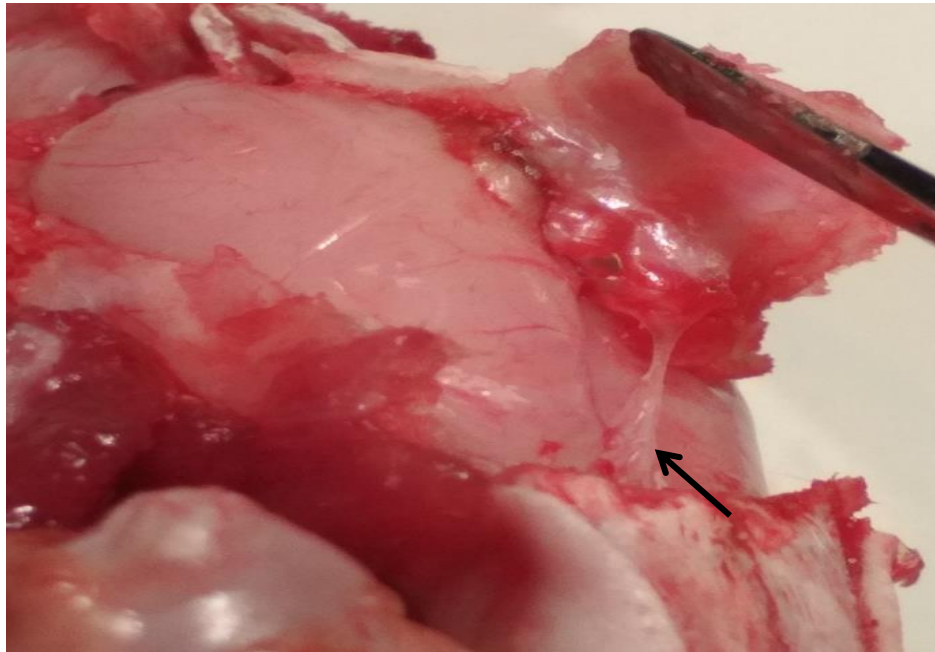


Рис. 3.6. Макроскопічне дослідження ділянки ЧМТ після пластики хітозаном. Незначно виражена спайкова тканина по периферії кісткового вікна, в проекції трепанаційного вікна (місці укладання плівки) спайок немає. Примітка: ← рубцево-спайкова тканина. Термін спостереження 3 тижні. Макропрепарат.

При комбінованому застосуванні хітозану з желатином (група 3) візуально залишки плівок не виявлялися, поверхня твердої мозкової оболонки в зоні і поза зону трепанації візуально були подібними (аналогічно попередній групі), відзначалися зрощення по периферії кісткового вікна (менш виражені ніж у тварин групи 1), зрощень в просвіті трепанаційного вікна виявлено не було (рис. 3.7).

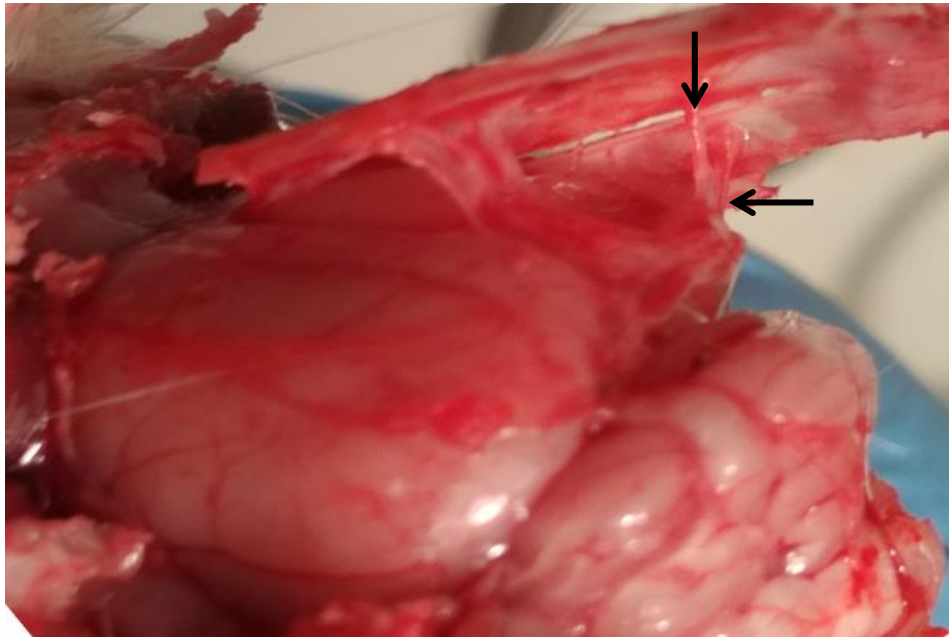


Рис. 3.7. Макроскопічне дослідження зони операції на 3 тиждень після пластики хітозаном в комбінації з желатиною плівкою. Помірно виражена спайкова тканина по периферії кісткового вікна, в місці укладання хітозаної плівки спайок немає. Примітка: ← рубцево-спайкова тканина. Макропрепарат.

При застосуванні колагену (група 4) візуально залишки плівки не виявлялися, візуально ділянки новоутвореної ТМО в зоні і поза зону трепанації майже не відрізнялися (місце укладання полімерної плівки мало білястий тьмянний відтінок, порівняно з кольором ТМО поза зоною операції) відзначалися зрощення по периферії кісткового вікна (менше виражені ніж у тварин групи 1), зрощень в просвіті трепанаційного вікна виявлено не було (рис. 3.8).

При комбінації колагену з желатином (група 5) візуально залишки плівки не виявлялися, візуальний вигляд ТМО в зоні і поза зону трепанації мала характер, подібний до попередньої групи, відзначалися виражені зрощення по периферії кісткового вікна (але візуально менше виражені ніж у

тварин першої групи), рубцево-спайкових утворень в просвіті трепанаційного вікна виявлено не було (рис. 3.9).

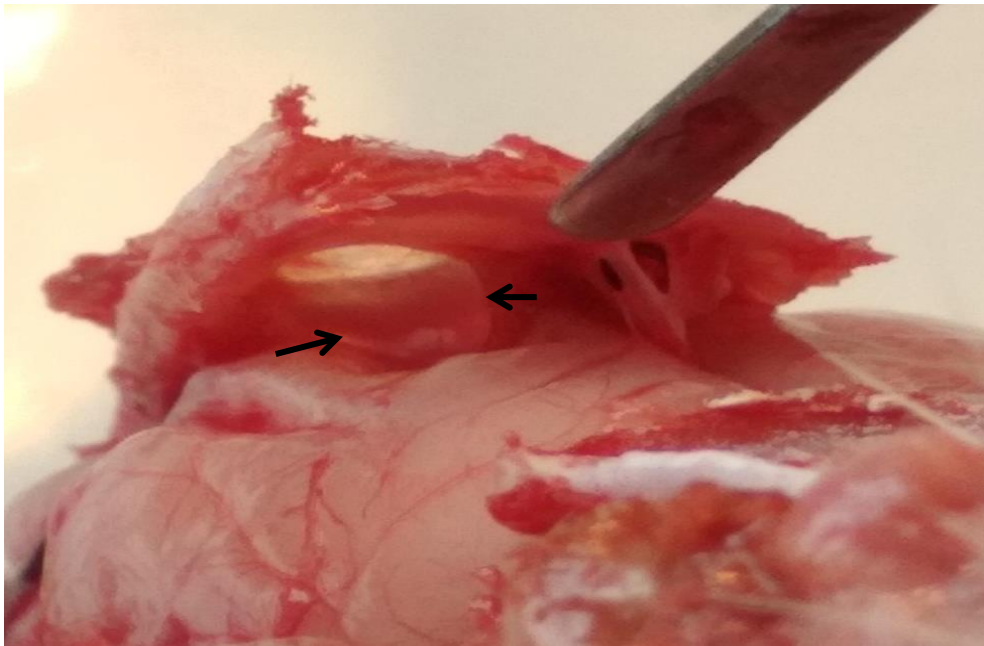


Рис. 3.8. Макроскопічне дослідження зони операції на 3 тиждень після пластики колагеном. Помірно виражена рубцево-спайкова тканина по периферії трепанаційного вікна, в місці укладання плівки спайок немає. Примітка: ← рубцево-спайкова тканина. Макропрепарат.

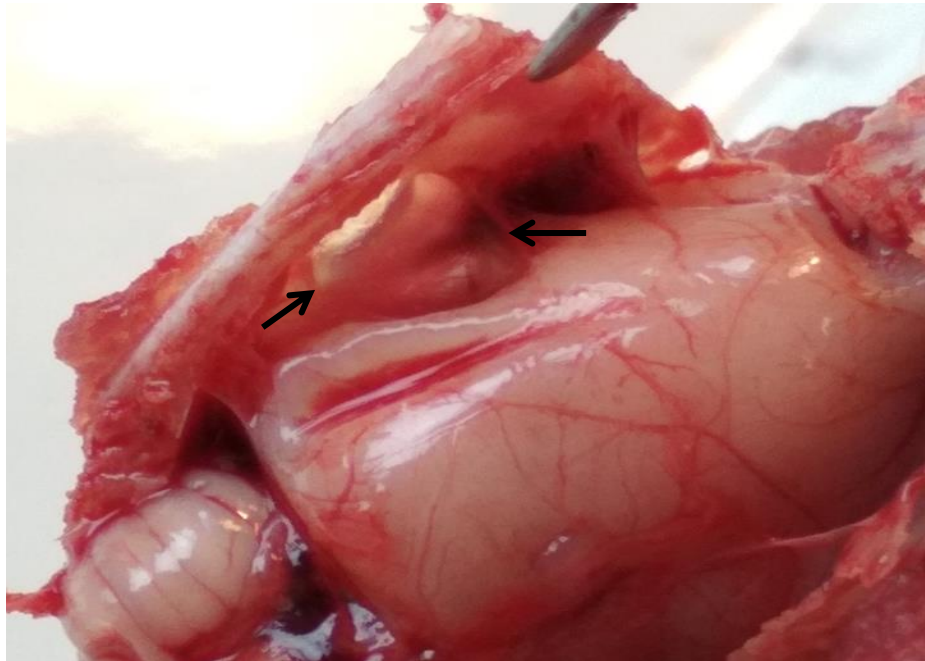


Рис. 3.9. Макроскопічне дослідження зони операції на 3 тиждень після пластики колагеном з желатином. Помірно виражена рубцево-спайкова тканина по периферії трепанаційного вікна. В проекції трепанаційного вікна спайок не виявлено. Примітка: ← рубцево-спайкова тканина. Макропрепарат.

Таким чином, на 3 тиждень після дурупластики встановлено формування рубцево-спайкової тканини по периферії трепанаційного вікна, особливості розвитку якої відрізнявся в залежності між застосованого матеріалу пластики. Так, найбільше число балів за шкалою STRYKER встановлено у групі з аутопластикою ($3,6 \pm 0,2$ бали), далі у групі з колагеном з желатином ($2,6 \pm 0,4$ бали) і найменше за умов застосування хітозану з желатином ($1,4 \pm 0,2$ бали), тільки хітозану ($1,0 \pm 0,0$ бали) або колагену ($1,0 \pm 0,0$ бали). Статистично значущу різницю встановлено у останніх трьох групах щодо групи з аутопластикою (за критерієм Манна-Уїтні).

Макроскопічне дослідження ділянки трепанаційного вікна на 6 тиждень після моделювання пенетруючої ЧМТ та дурупластики не показало істотних відмінностей зони пошкодження порівняно з 3 тижнем. Аналогічним чином проводилася оцінка стану тканин зони трепанаційного вікна і м'яких тканин

голови на предмет злук (див. рис. 3.10). В жодній групі таких утворень виявлено не було.



Рис. 3.10. Макроскопічне дослідження зовнішньої поверхні черепа на 6 тиждень експерименту після моделювання пенетруючої ЧМТ. Примітка: ← край трепанаційного вікна, заповненого сполучною тканиною. Макропрепарат.

Ділянка дефекту черепа у тварин усіх груп була рівномірно заповнена щільною сполучною тканиною і мала більш білястий і тьмяний колір, порівняно до аналогічних груп на 3 тиждень після операції.

У тих досліджуваних групах, де було застосовано желатинові плівки (групи 3 і 5), - залишків останніх виявлено не було. Проте у групі 5 на 6 тиждень експерименту виявлені зміни, аналогічні тим, що були описані після 3 тижня дослідження: скупчення пухкої сполучної тканини над і навколо трепанаційного вікна (Рис. 3.11). Рідше у ділянці трепанації реєстрували ніжні павутиноподібні зрощення між шкірою голови і підлеглою ділянкою операції.

Тобто процеси регенерації пошкоджених тканин на 6 тижні прогресували щодо попереднього терміну спостереження.

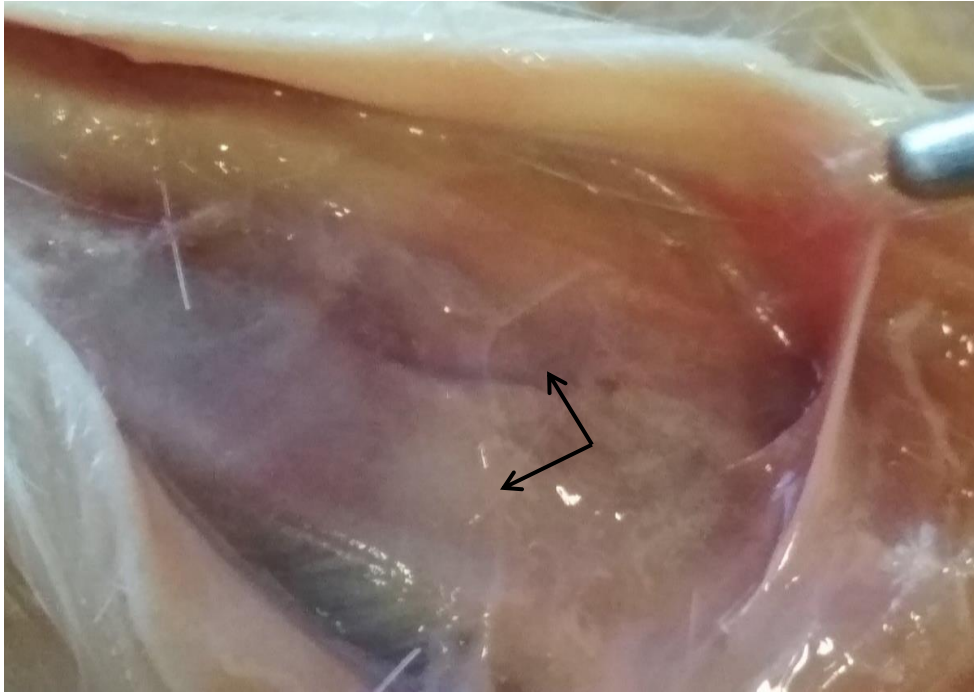


Рис. 3.11. Макроскопічне дослідження ділянки пошкодження на 6 тижень експерименту після моделювання пенетруючої ЧМТ. Примітка: ← пухка сполучна тканина над ділянкою операції. Макропрепарат.

Після аутопластики (група 1) виявлено різного ступеню вираженості сполучно-тканинні тяжі у вигляді широких смуг і нитковидні, в основному по периферії кісткового вікна, а також в його просвіті (рис. 3.12). Після їх роз'єднання ТМО мала вигляд різнобарвної, з нерівним рельєфом поверхні, так само як і на 3 тиждень після операції.

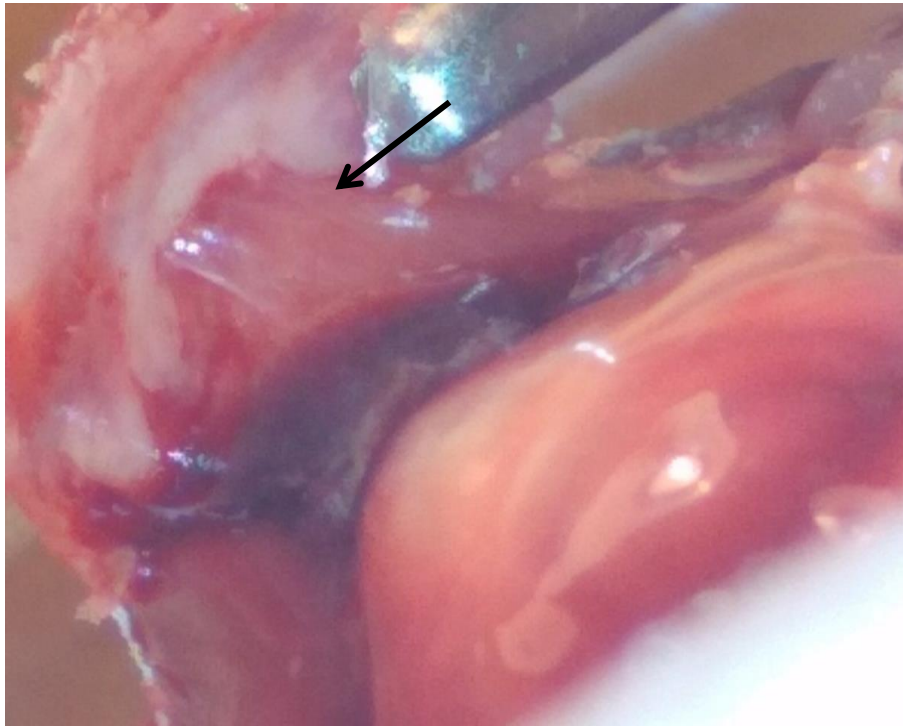


Рис. 3.12. Макроскопічне дослідження зони операції на 6 тиждень після моделювання пенетруючої ЧМТ і аутопластики. Примітка: ← рубцева тканина. Макропрепарат.

У групі з хітозаном (група 2) візуально залишки плівки не виявлялися, ділянки ТМО в зоні і поза зоною трепанації візуально майже не відрізнялися, відзначалися зрощення по периферії кісткового вікна (менш виражені, ніж у тварин групи 1, як на 3 так і на 6 тиждень експерименту. Виражених рубцевих процесів в просвіті трепанаційного вікна виявлено не було (рис. 3.13).

Після застосування хітозану у комбінації з желатином (група 3) візуально залишки плівок не виявлялися, ділянки регенерату твердої мозкової оболонки в зоні і поза зоную трепанації візуально були подібними (аналогічно попередній групі), відзначалися зрощення по периферії кісткового вікна (менше виражені ніж у тварин першої групи), зрощень в просвіті трепанаційного вікна виявлено не було (рис. 3.14).

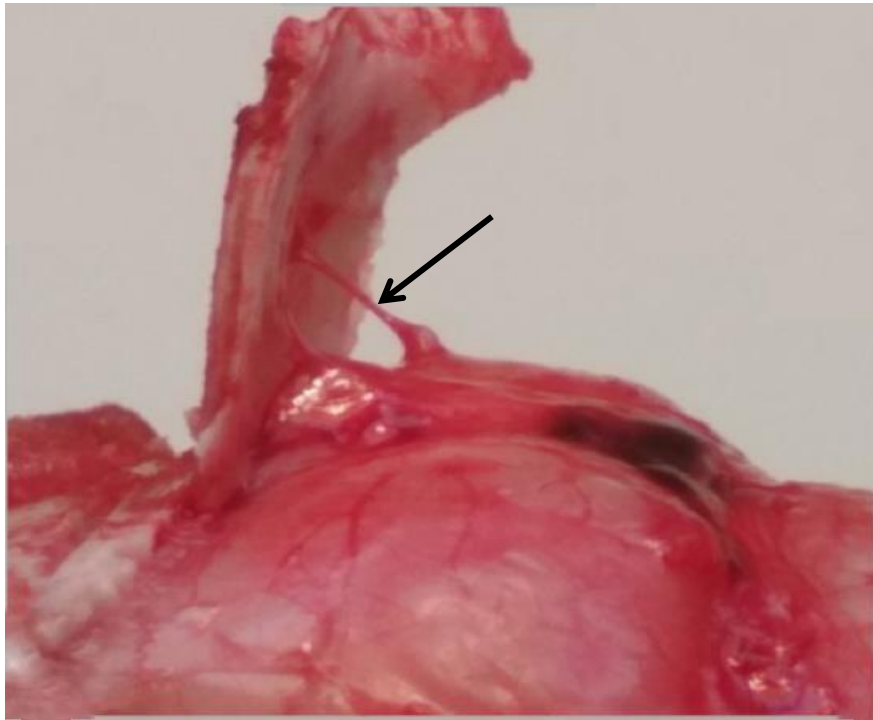


Рис. 3.13. Макроскопічне дослідження ділянки ЧМТ після пластики хітозаном. Слабко виражені спайкові зміни. Примітка: ← рубцево-спайкова тканина. Макропрепарат.

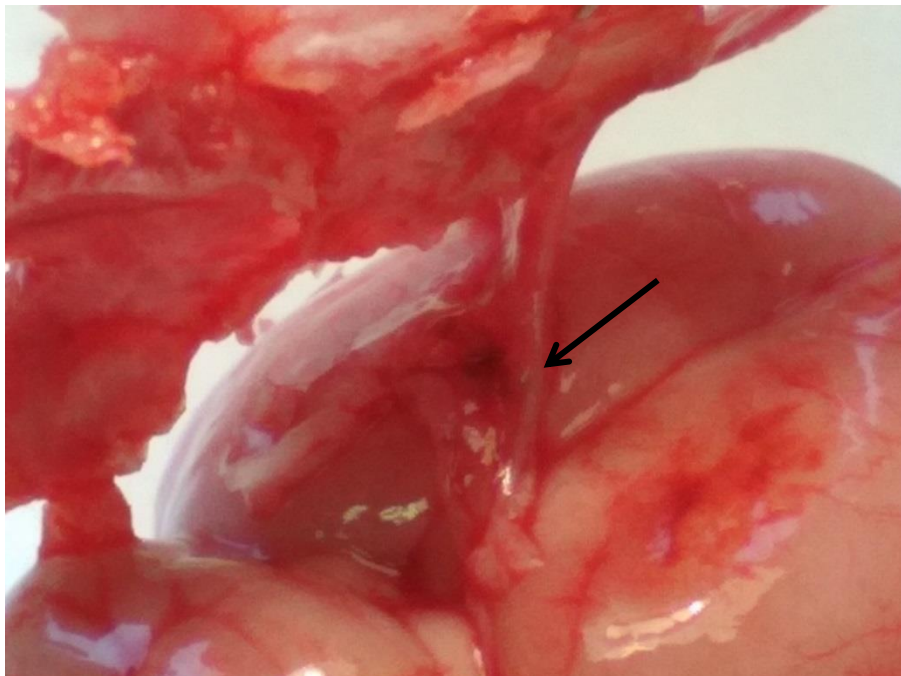


Рис. 3.14. Макроскопічне дослідження ділянки ЧМТ на 6 тиждень після пластики хітозаном у комбінації з желатином. Примітка: ← рубцево-спайкова тканина. Макропрепарат.

У групі з колагеном (група 4) візуально залишки плівки не виявлялися, візуально ділянки новоутвореної ТМО в зоні і поза зону трепанації майже не відрізнялися (місце укладання полімерної плівки мало білястий тьмянний відтінок, порівняно з кольором ТМО поза зоною операції) відзначалися зрощення по периферії кісткового вікна (менше виражені, ніж у тварин групи 1), зрощень в просвіті трепанаційного вікна виявлено не було (рис. 3.15)

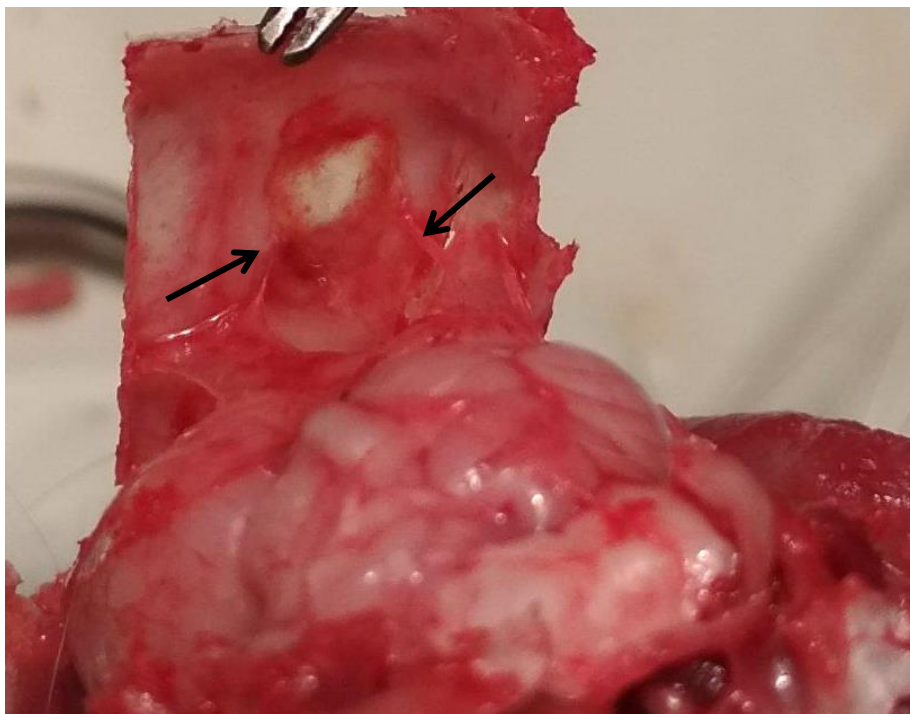


Рис. 3.15. Макроскопічне дослідження ділянки ЧМТ на 6 тижнів після пластики колагеном. Примітка: ← рубцево-спайкова тканина. Макропрепарат.

У тварин п'ятої досліджуваної групи (колаген+желатин) візуально залишки плівки не виявлялися, візуальний вигляд твердої мозкової оболони в зоні і поза зону трепанації мала характер, подібний до попередньої групи, відзначалися виражені зрощення по периферії кісткового вікна (але менше виражені ніж у тварин першої групи), рубцево-спайкових утворень в просвіті трепанаційного вікна виявлено не було (рис. 3.16).

Крім вищеописаних особливостей, для тварин усіх досліджуваних груп на 6 тижні експерименту було характерним те, що злуки були більш щільними і (суб'єктивно) міцнішими на розрив, ніж на 3 тиждень для відповідної групи, тобто рубцеві процеси у динаміці спостереження прогресували.

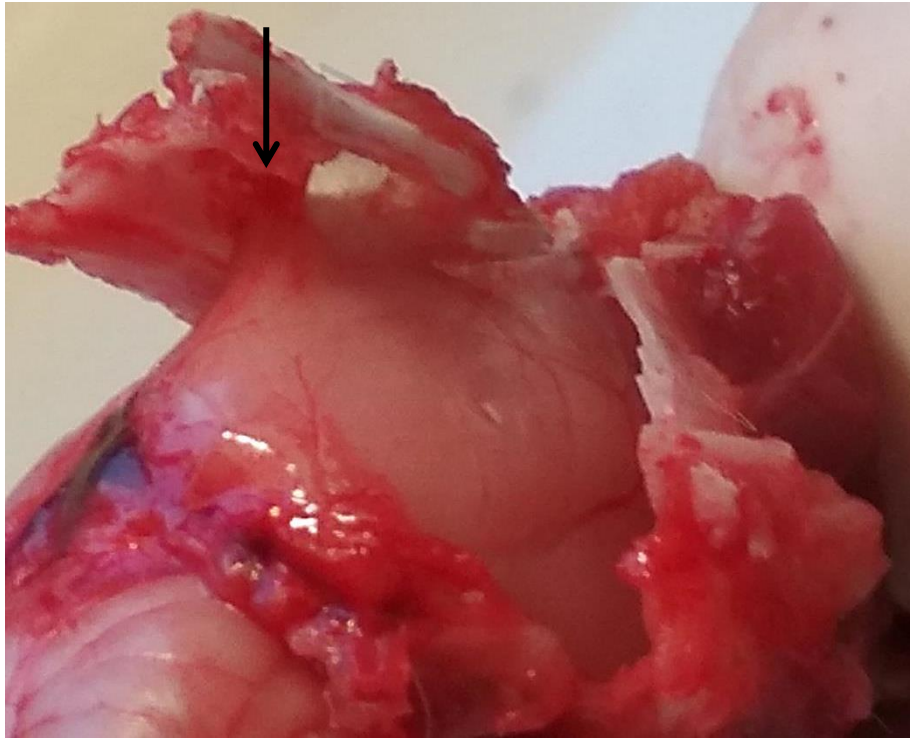


Рис. 3.16. Макроскопічне дослідження зони операції на 6 тижнів після пластики колагеном в комбінації з желатиновою плівкою. Значне зрощення по периферії рубцевої тканини з тканиною мозку по контуру кісткового вікна. Примітка: ← рубцево-спайкова тканина. Макропрепарат.

Таким чином, на макроскопічному рівні було виявлено сформовані рубцево-спайкові тяжі (злуки) в усіх досліджуваних групах. Топографічні особливості тяжів мали чіткі відмінності між досліджуваними групами і, в той же час, були подібні в межах однієї групи. Зважаючи на це, для кількісної оцінки відновлення ТМО було обрано шкалу STRYKER, що була модифікована під завдання дослідження і це дозволило кількісно оцінити макроскопічні особливості регенованої ТМО. В результаті було одержано узагальнюючий (інтегральний) показник адгезії між шарами операційної рани

(проекційної ділянки трепанаційного вікна) (рис. 3.17). Як видно з результатів оцінки у групі з колагеном мало місце тенденція зростання рубцевих змін, а при додатковому застосуванні желатину рубцеві зміни не мали суттєвої різниці порівняно до групи з аутопластикою. Висунуто припущення, що ці зміни є менш вираженими при застосуванні хітозану. Для дослідження цих змін було проведено гістологічні дослідження, результати яких висвітлено у наступному розділі.

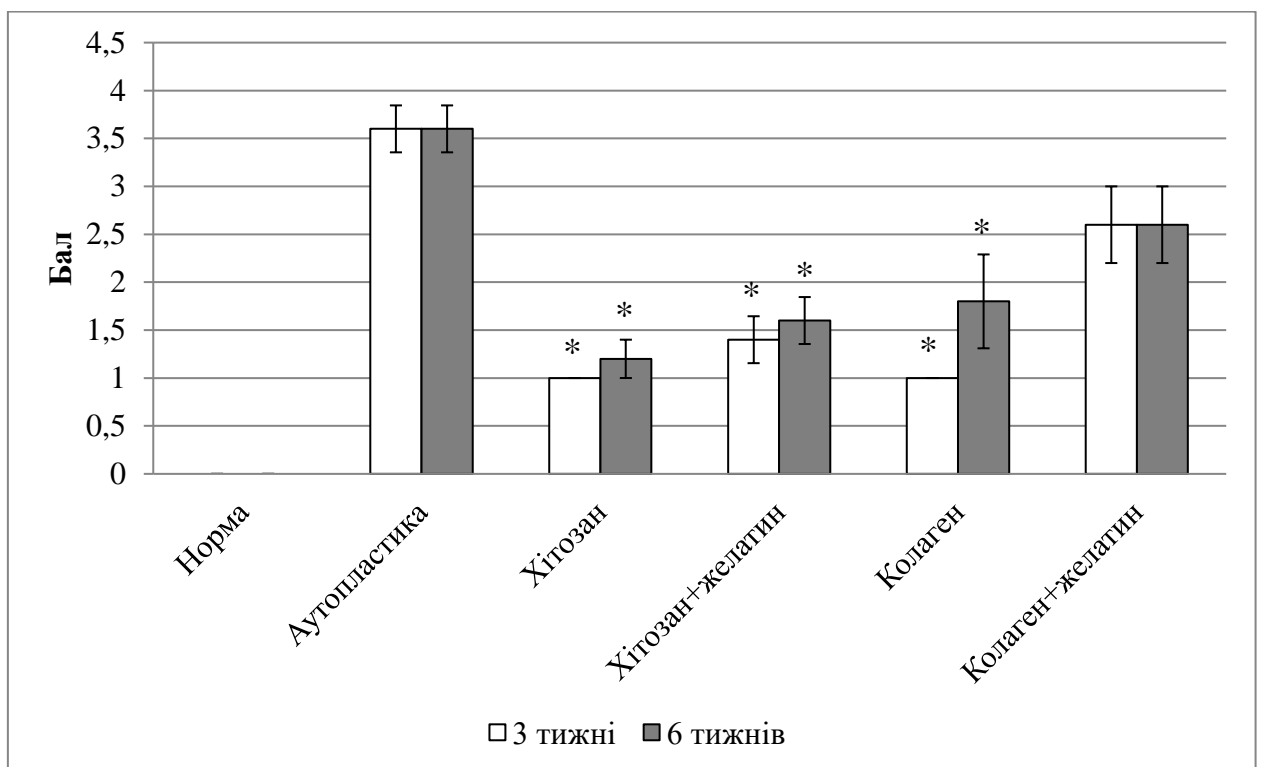


Рис. 3.17. Оцінка спайково-рубцевих процесів у ділянці дефекту ТМО за умов різних способів дуроластики за модифікованою шкалою STRYKER. Примітка: * - достовірно щодо групи з аутопластикою ($P < 0,05$, за критерієм Манна-Уїтні).

Висновок до розділу 3.

Таким чином, у групі з аутопластикою спостерігається найбільш виражені рубцево-спайкові процеси у ділянці операції. Залежно від застосованого матеріалу топографічні особливості регенерату і спайок були подібними в межах однієї групи і чітко відрізнялися між дослідними групами, що підтверджено бальною оцінкою за модифікованою шкалою STRYKER. Найменш виражені злукові процеси виявлено після застосування хітозанових плівок, у групі хітозану з желатином злукові процеси також були маловиражені і статистично не відрізнялись від групи з хітозаном. Застосування колагену (без желатину) мало числові характеристики подібні до хітозану з желатином.

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ГІСТОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

4.1. Світлооптична мікроскопія.

ТМО (*dura mater*) утворює саму зовнішню оболонку головного мозку. Вона складається з двох пластинок: зовнішня пластинка, прилегла до кістки і служить в той же час внутрішнім окістям порожнини черепа, складається з м'якої пухкої, багатой судинами сполучної тканини (рис. 4.1). Внутрішня пластинка щільніша, структурно представлена сполучною тканиною, але в ній менша щільність кровоносних судини (рис. 4.2). ТМО у контрольній групі тварин мала властиву їй мікроструктуру, що обумовлено особливостями функції ТМО. До внутрішньої поверхні кісток склепіння черепа прилягає зовнішня пластинка ТМО. За власними даними морфометрії товщина ТМО у контролі складала $91,9 \pm 7,5$ мкм.

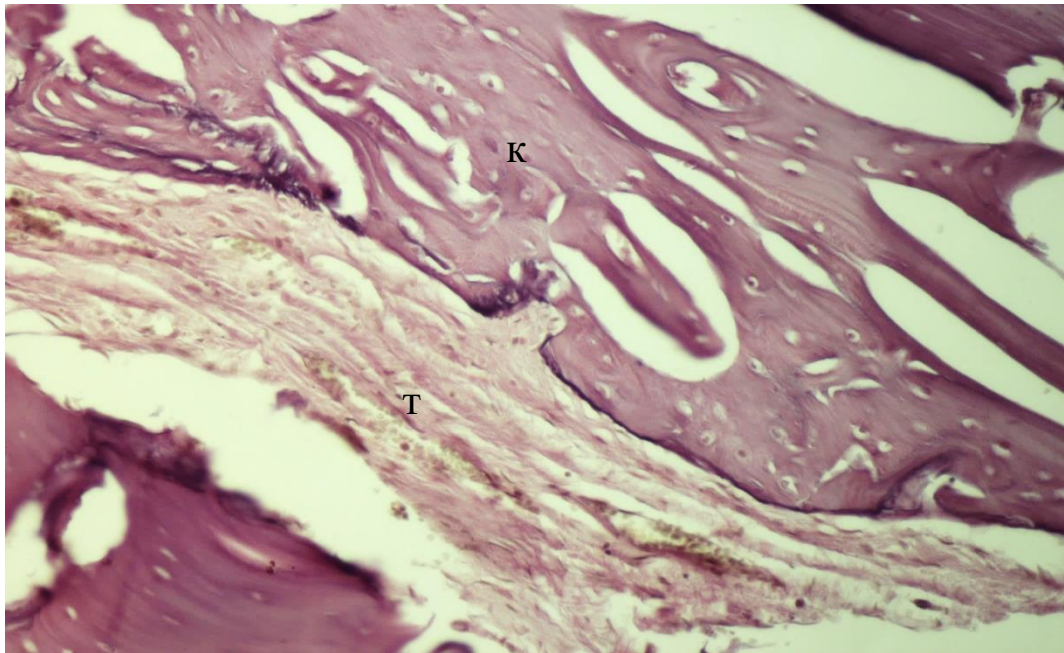


Рис. 4.1. ТМО контрольної групи тварин. Структура ТМО представлена сполучною тканиною. Примітка: т – ТМО; к – кісткова тканина. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

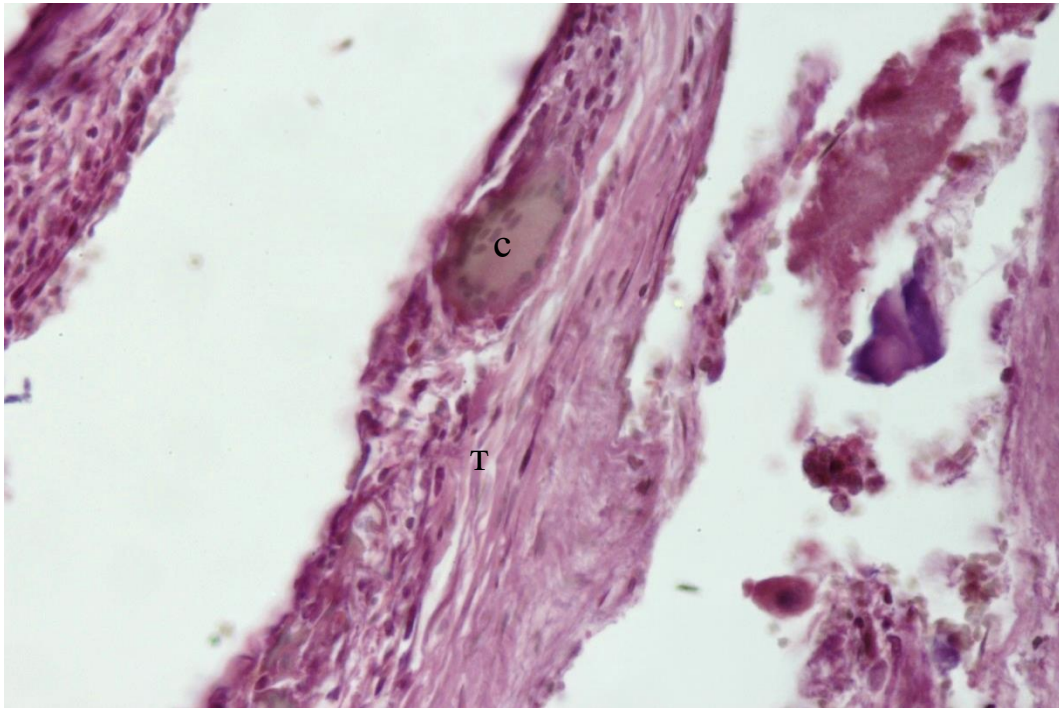


Рис. 4.2. ТМО контрольної групи тварин. Фрагмент ТМО і тонкостінні кровоносні судини. Примітка: т – ТМО; с – кровоносні судини. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

Термін експерименту 3 тижні.

Через 3 тижні після моделювання проникаючої ЧМТ та дурупластики було проведено гістологічне дослідження ділянки пошкодження і визначено загальні структурні особливості відновного процесу. Результати морфологічного дослідження пластики ТМО ГМ хітозановими, колагеновими плівками, а також даними плівками у поєднанні з желатиновими плівками через 3 тижні після операції свідчать про відсутність грубих структурних змін в ділянці модельованої травми (зони операції). Ділянка трепанації в усіх досліджених випадках заповнена новоутвореною сполучною тканиною, за своєю структурою подібною до інтактної ТМО ГМ з наявністю невеликої кількості фібробластів. Через 3 тижні визначити межу сполучної тканини навколо трансплантату і ТМО поза зоною трепанації неможливо. Клітинні елементи мають переважно видовжену форму. В усіх випадках відзначалася

герметизація субдурального простору. За результатами гістологічного аналізу ТМО після аутопластики виявлено наступні її характеристики. Через 3 тижні межу сполучно-тканинного краю і дефекту ТМО розрізнити майже не вдається (рис. 4.3).

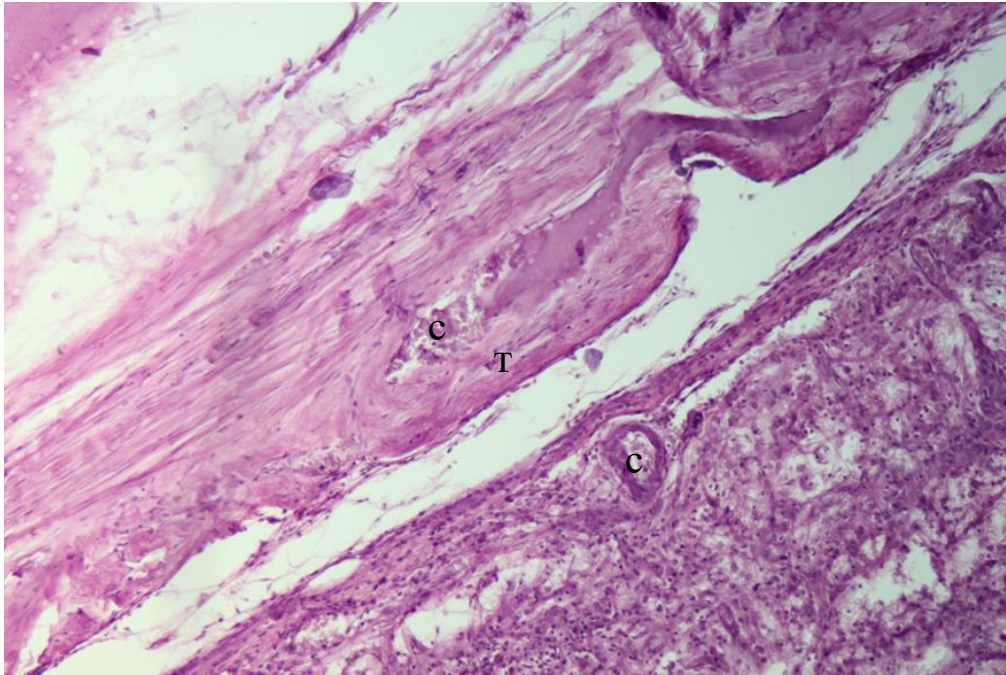


Рис. 4.3. Фрагмент ТМО у групі тварин з аутопластикою. Волокниста сполучна тканина у регенераті ТМО, новоутворені кровоносні судини. Примітка: т – ТМО; с – кровоносні судини. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 4, ок. 10.

В регенованої ТМО мікроскопічно збільшилась кількість сполучної тканини, подекуди реєстрували ділянки з формуванням кількох шарів колагенових пучків. У цих ділянках щільність сполучної тканини неоднорідна і містить грануляційну тканину (рис. 4.4). Це позначилось на достовірному збільшенні товщини ТМО до $202,7 \pm 33,8$ мкм ($P < 0,05$) щодо контрольної групи тварин. У перифокальній зоні прилегла тканина мозку (кора мозку) виглядає незміненою, але у ділянці пенетруючої травми (трек введення голки) встановлено пошкодження мозку з формуванням перичелюлярного набряку

(рис. 4.5 і 4.6). Встановлено появу колагену у корі мозку у місці пенетруючої ЧМТ. Тобто пенетраційна ЧМТ викликала травматичне пошкодження кори мозку з розвитком нейродистрофічних змін, хоча загальна цитоархітектоніка (стратифікація шарів) прослідковувалась.

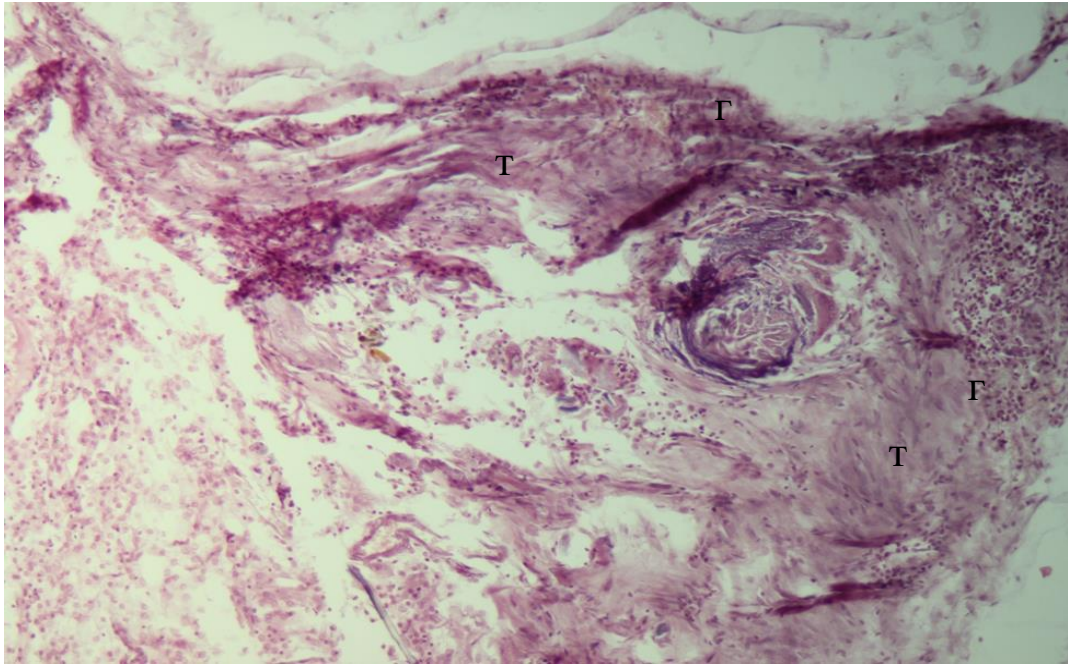


Рис. 4.4. Новоутворена ТМО ГМ з ділянками грануляційної тканини і підлегла мозкова речовина у групі тварин з аутопластиком. Примітка: т – ТМО; г – грануляційна тканина. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 4, ок. 10.

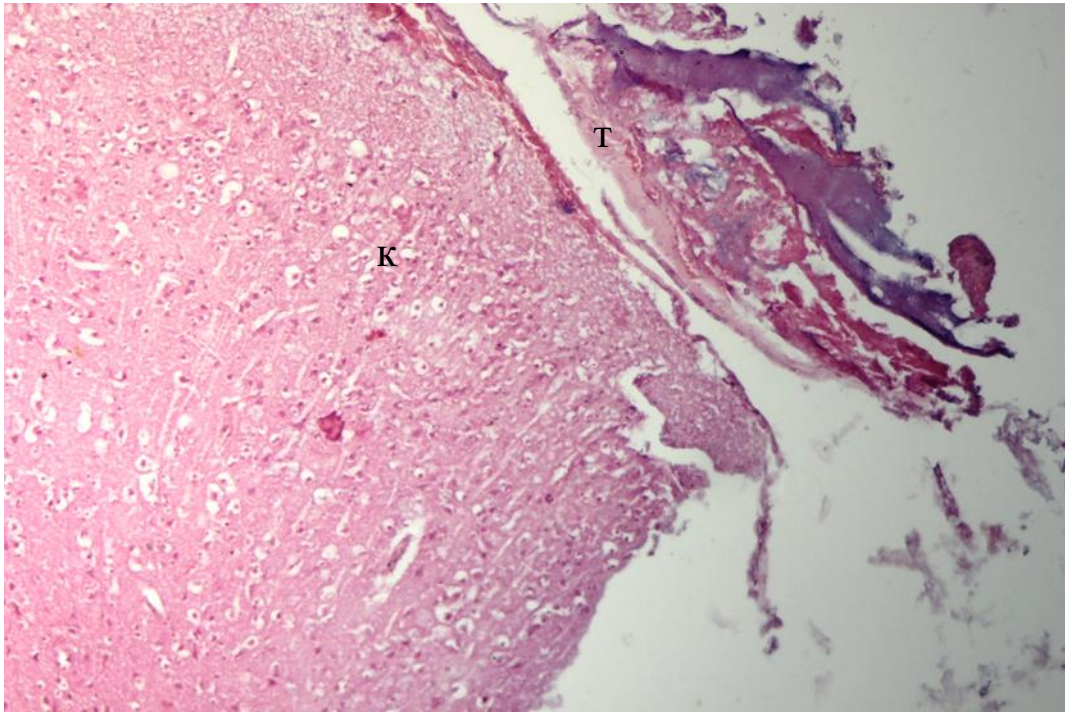


Рис. 4.5. Фрагменти сформованої ТМО і прилягаючі ділянки мозкової тканини у групі тварин з аутопластикою. Кора мозку з явищами перичелюлярного та перивазального набряку. Примітка: т – ТМО; к – кора мозку. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 2, ок. 10.

При дослідженні ділянки кісткового дефекту встановлено утворення грубих сполучно-тканинних розростань. Сполучнотканинний регенерат заповнював трепанаційне вікно і інтегрувався з сполучною тканиною ТМО (рис. 4.6). Також відмічено наявність сполучної тканини по периферії трепанаційного вікна (рис. 4.7). Регенерація ТМО супроводжувалась формування щільної сітки кровоносних судин.

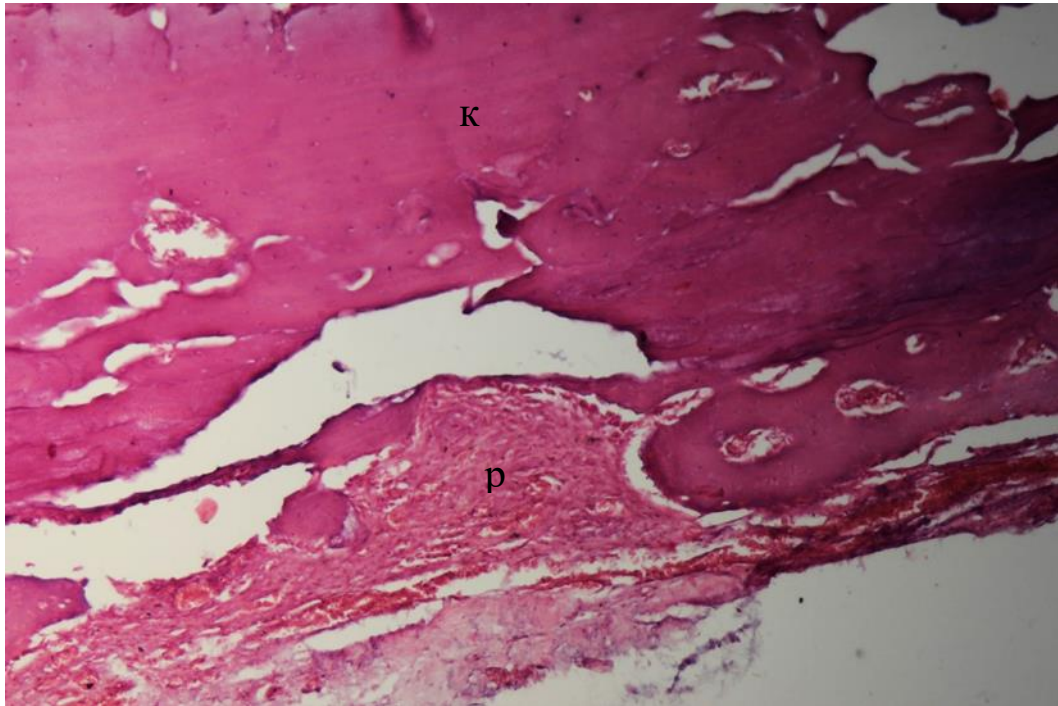


Рис. 4.6. Край кісткового дефекту у групі тварин з аутопластикою. ТМО без чіткої межі переходить в сполучно-тканинну пластинку, що заміщує дефект. Примітка: р – сполучнотканинний регенерат у трепанаційному вікні; к – кісткова тканина. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 2, ок. 10.

Таким чином, при аутопластиці повністю формується сполучно-тканинний регенерат, що за своєю будовою відповідає структурі ТМО з одночасними явищами рубцево-спайкового процесу.

Відновні процеси у регенеруючій ТМО після пластики хітозаном на 3 тижні експерименту також відбувалося шляхом формування молодії фіброзної сполучної тканини з великою кількістю гіперхромних фібробластів і волокон колагену (рис. 4.8 і 4.9).

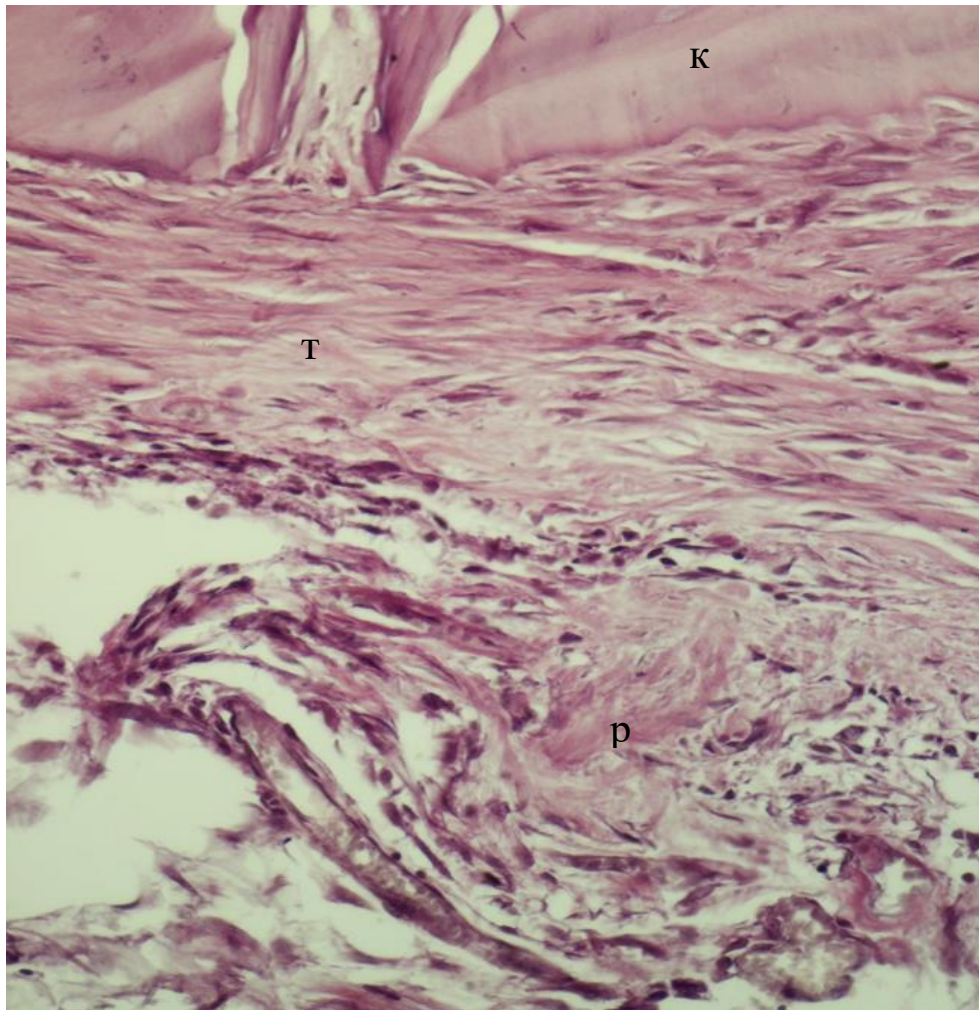


Рис. 4.7. Ділянки грубої сполучної тканини на межі трепанаційного вікна у групі тварин з аутопластикою. Примітка: р – сполучнотканинний регенерат у трепанаційному вікні; к – кісткова тканина; т – ТМО. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

Фібробласти мали як округлу, так і овальну форму. В частині клітин були відмічені паличкоподібні ядра з гіпохромним забарвленням (молоді форми фібробластів), що є свідченням активного регенеративного процесу навколо імплантованого хітозану. При цьому щільність пучків колагенових волокон і шарів оточуючої новоутвореної сполучної тканини була неоднорідною. Пучки волокон, обернених до мозкової поверхні знизу, були тоншими від пучків

волокон, що розміщувалися на зовнішній поверхні (рис. 4.10). Краї дефекту ТМО і новоутвореної фіброзної тканини чіткої межі не мали.

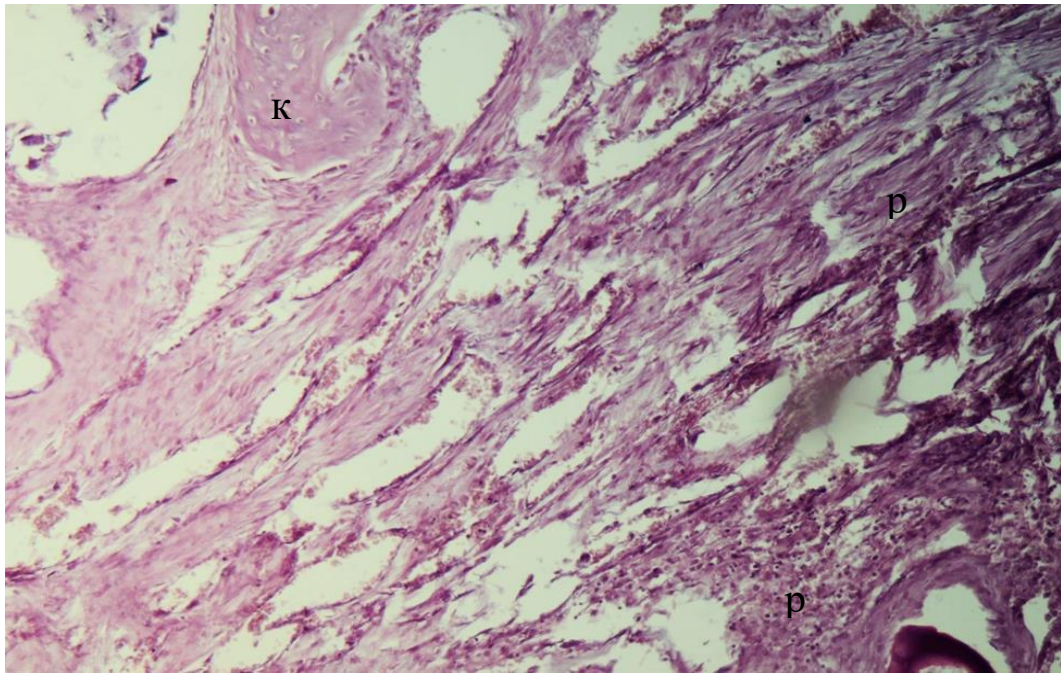


Рис. 4.8. Пучки новоутворених колагенових волокон, ділянки біодеградації полімерної плівки хітозану. Велика щільність кровоносних судин. Примітка: р – сполучнотканинний регенерат; к – кісткова тканина. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

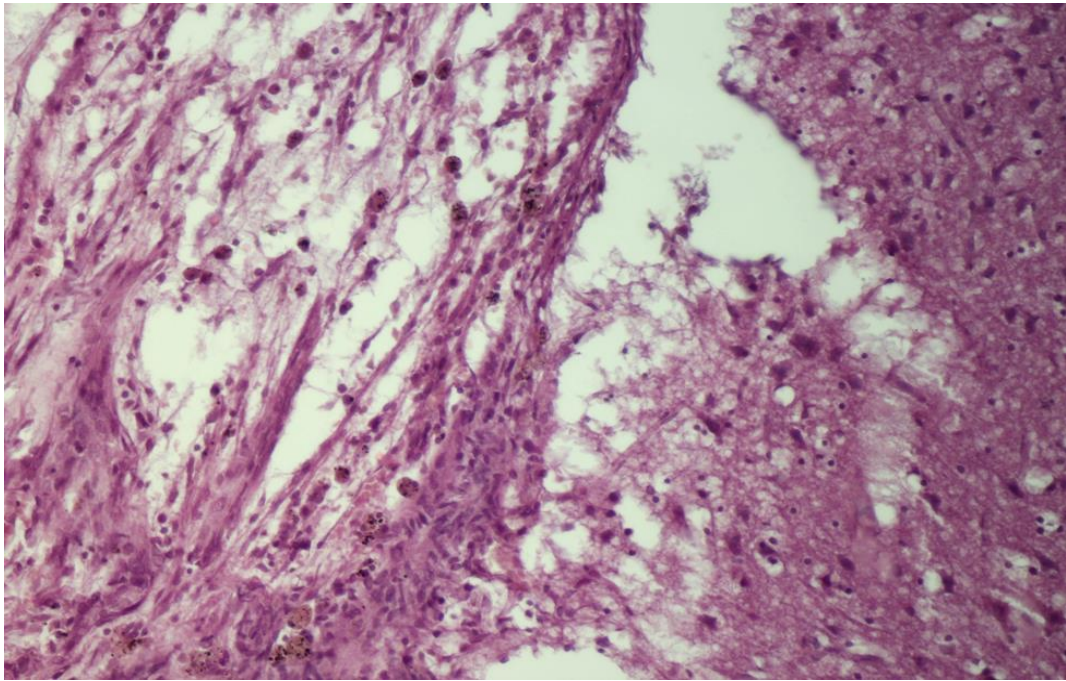


Рис. 4.9. Сполучнотканинний регенерат у групі тварин з хітозаном. Рихле розташування сполучно-тканинних волокон, велика кількість фіброblastів. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

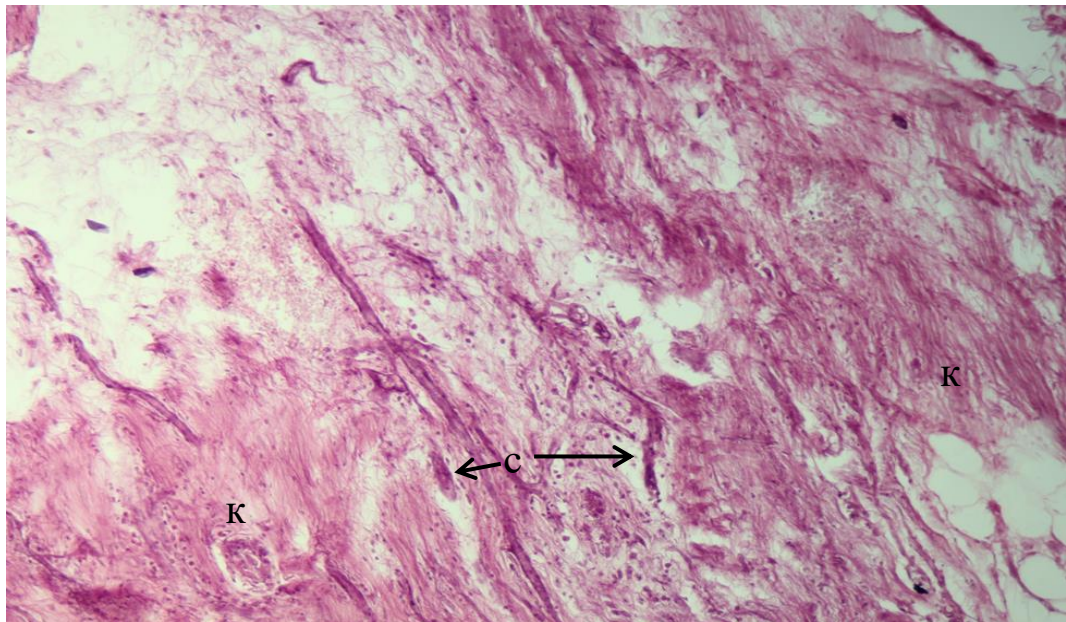


Рис. 4.10. Неоднорідна щільність новоутвореного колагену у регенеруючій сполучній тканині ТМО у групі тварин з хітозаном. Сітка новоутворених кровоносних судин. Примітка: к – пучки колагену; с – кровоносні судини. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

Відмічено формування більш ніжних оболонково-мозкових зрощень. Прилегла тканина мозку виглядала типовою. Вцілому хітозанові плівки були по всьому контуру оточені сполучною тканиною, відбувалось щільне прилягання регенерату по полімерного матеріалу (рис. 4.11). Інтеграція хітозанової плівки з регенеруючою сполучною тканиною характеризувалось істотним збільшенням товщини $313,8 \pm 72,7$ мкм ($P < 0,05$). В такому випадку морфометрична оцінка включала вимірювання усіх шарів новоутвореної ТМО – внутрішній сполучнотканинний листок, хітозанова плівка, зовнішній сполучнотканинний листок. В результаті такого способу дуороластики товщина ТМО мала тенденцію до збільшення порівняно з ТМО після аутопластики, хоча не досягала статистично значущої різниці. Крім того, не спостерігалось реакцій запального характеру.

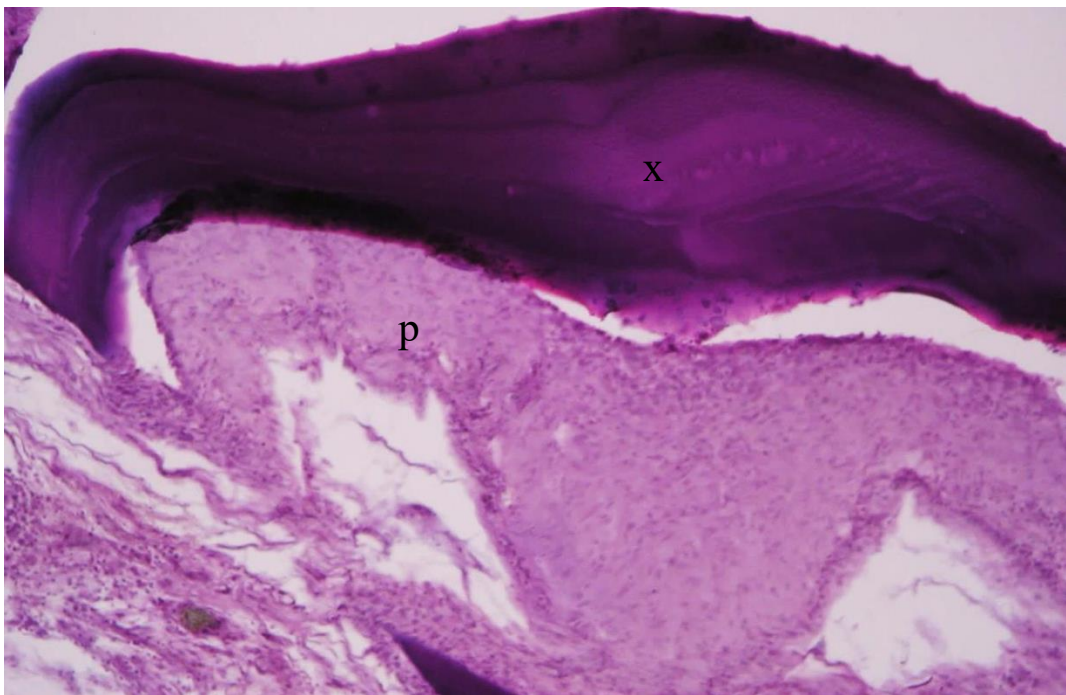


Рис. 4.11. Відновлена сполучна тканина під хітозановою плівкою у групі тварин з хітозаном. Регенерована тканина щільно контактує з хітозановою плівкою. Примітка: х – хітозан; р – сполучнотканинний регенерат. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

У випадку комбінованого застосування хітозану з желатином краї дефекту ТМО і новоутвореної фіброзної тканини також не мали чіткої межі, як і у випадках імплантації тільки хітозану. Новоутворені колагенові волокна мали нещільне розташування відносно одне одного, відзначаючись «ніжною» волокнистістю (рис. 4.12). Пучки волокон, обернених до мозкової поверхні знизу, також були тоншими від пучків волокон, що розміщувалися на зовнішній поверхні. Серед пучків фіброзної тканини простежувалася велика кількість добре сформованих кровоносних судин різного діаметра (рис. 4.13). Запальних змін не відзначено. Формування оболонково-мозкових зрощень в цілому мало той же характер, що в попередній групі. Підлягаюча тканина мозку виглядала типовою.

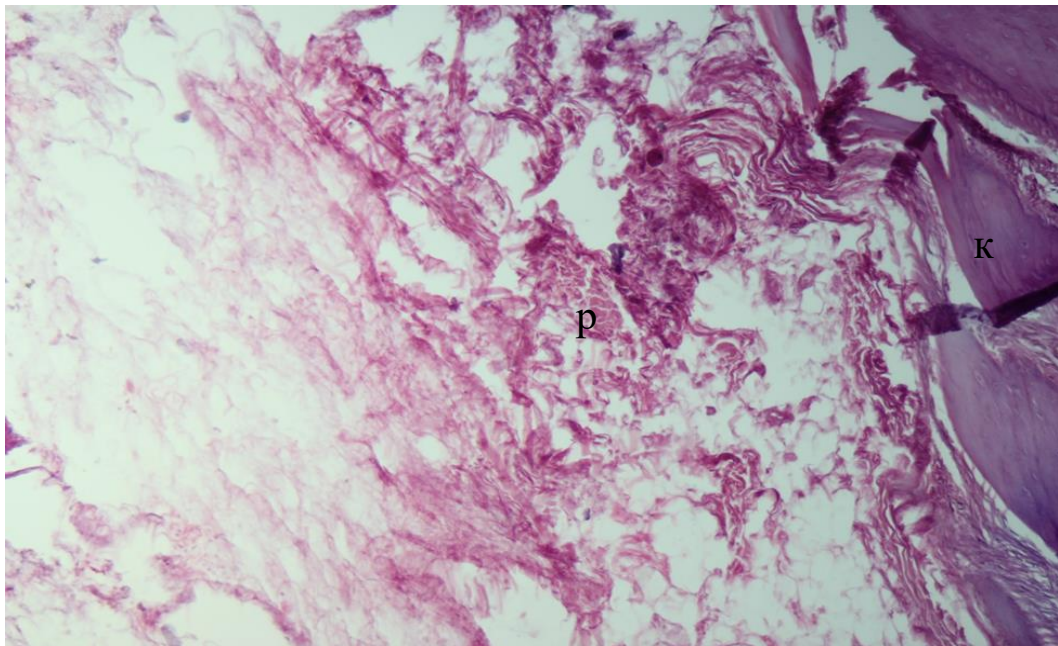


Рис. 4.12. Дифузно орієнтовані пучки колагенових волокон у регенеруючій сполучній тканині ТМО у групі тварин з хітозаном та желатином. Примітка: р – пучки колагену в регенераті; к – кісткова тканина. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

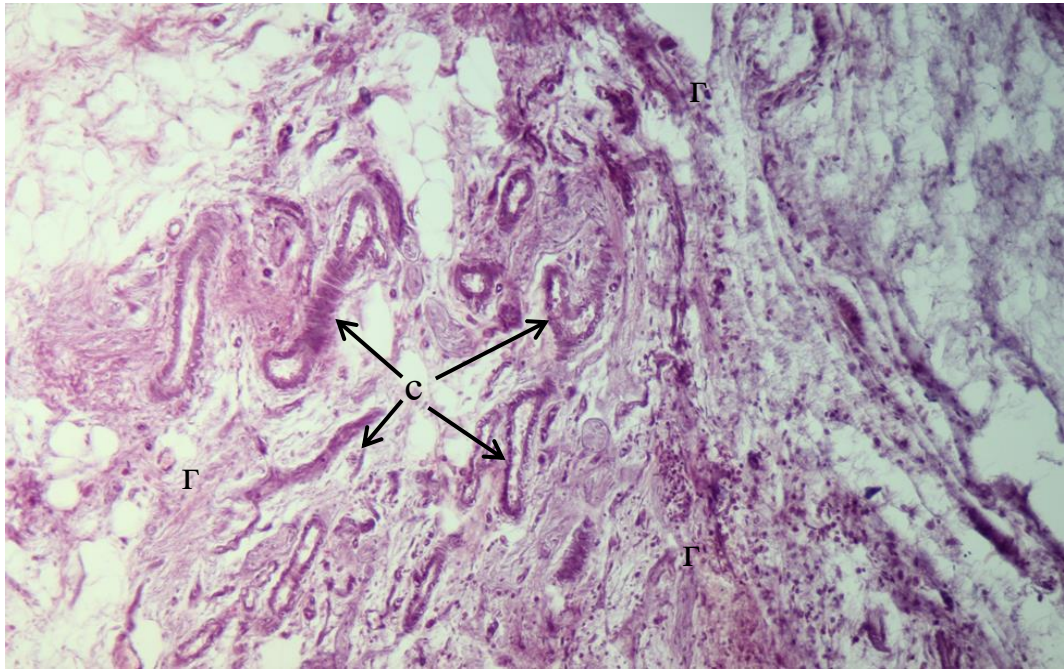


Рис. 4.13. Грануляційна тканина у групі тварин з хітозаном та желатином. Пучки колагенових волокон різної щільності і густа сітка кровоносних судин у регенераті з боку ТМО. Примітка: г – грануляційна тканина; с – кровоносні судини. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

В ділянці трепанаційного вікна, по його периферії, відзначали одиничні тонкі ниткоподібні спайки. В проекції просвіту вікна спайкових волокон виявлено не було. Разом з тим трепанаційне вікно заповнене регенерованою сполучною тканиною, яка інтегрована у тканину навколо хітозанової плівки (рис. 4.14). Чіткої межі між зазначеними ділянками сполучної тканини не виявлено. Сполучна тканина оточувала хітозанову плівку по всьому контуру, тобто формується прошарок тканини, який розділяє (відмежовує) хітозан від тканини мозку, і другий шар, який покриває хітозан ззовні, тим самим відділяючи його від кістки.

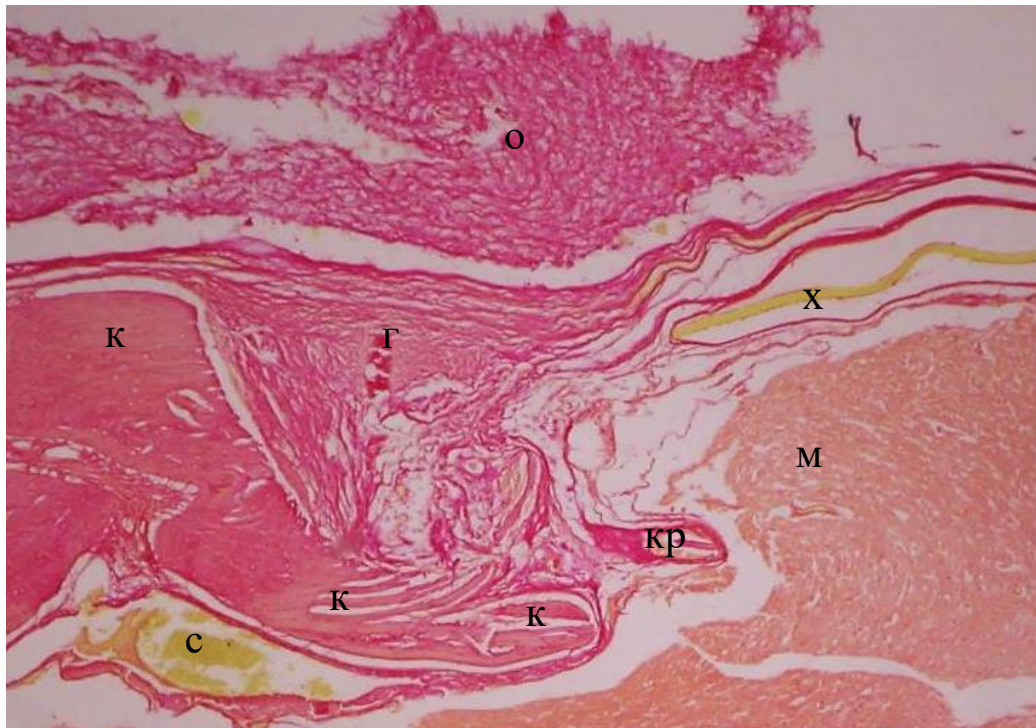


Рис. 4.14. Трепанаційне вікно з сполучнотканинним регенератом і хітозанова плівка. Примітка: г – грануляційна тканина у кістковому дефекті; к – кісткова тканина; с – верхній сагітальний синус; м – кора мозку; кр – кровоносна судина; о – регеноване окістя; х – хітозан. Термін спостереження: 3 тижні. Пікросіріус червоний. Об. 4, ок. 10.

При гістологічному дослідженні ТМО у групі з дурупластиком із використанням колагенової плівки встановлено, що трепанаційне вікно повністю заміщене сполучною тканиною з високою щільністю колагену (рис. 4.15). Відбувалося розсмоктування трансплантата і заміщення його тканиною, подібною за будовою до нормальної ТМО. Новоутворений колаген мав вигляд ніжноволокнистої слабо базofilно забарвленої маси і, яка лежала вільно над ділянками забою. Клітинні сполучно-тканинні елементи були щільно пов'язані з фрагментами імплантата і кістковою тканиною, нерівномірно проникаючи в його основну масу (рис. 4.16). Край ТМО був потовщеним за рахунок розростань, які змикались над краєм ТМО і поширювалися в напрямку центра її дефекту, сполучаючись з сполучно-

тканинними елементами у трепанаційному вікні і кістковою тканиною склепіння черепа. Товщина ТМО не відрізнялась від товщини ТМО у групі з аутопластиком (202,7±33,8 мкм).

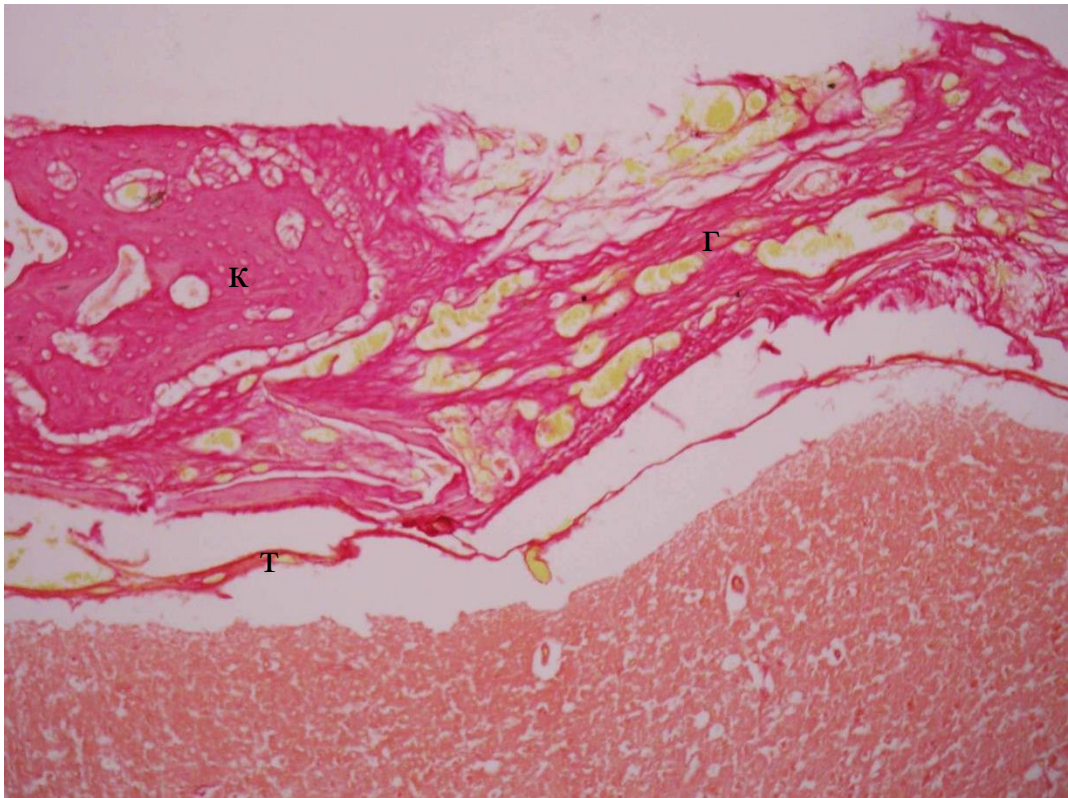


Рис. 4.15. Ділянки регенованої сполучної тканини у трепанаційному вікні, що зростаються з краями дефекту кістки і ТМО у групі з колагеновою плівкою. Примітка: г – грануляційна тканина у кістковому дефекті; к – кісткова тканина; т – ТМО. Термін спостереження: 3 тижні. Пікросіріус червоний. Об. 10, ок. 10.

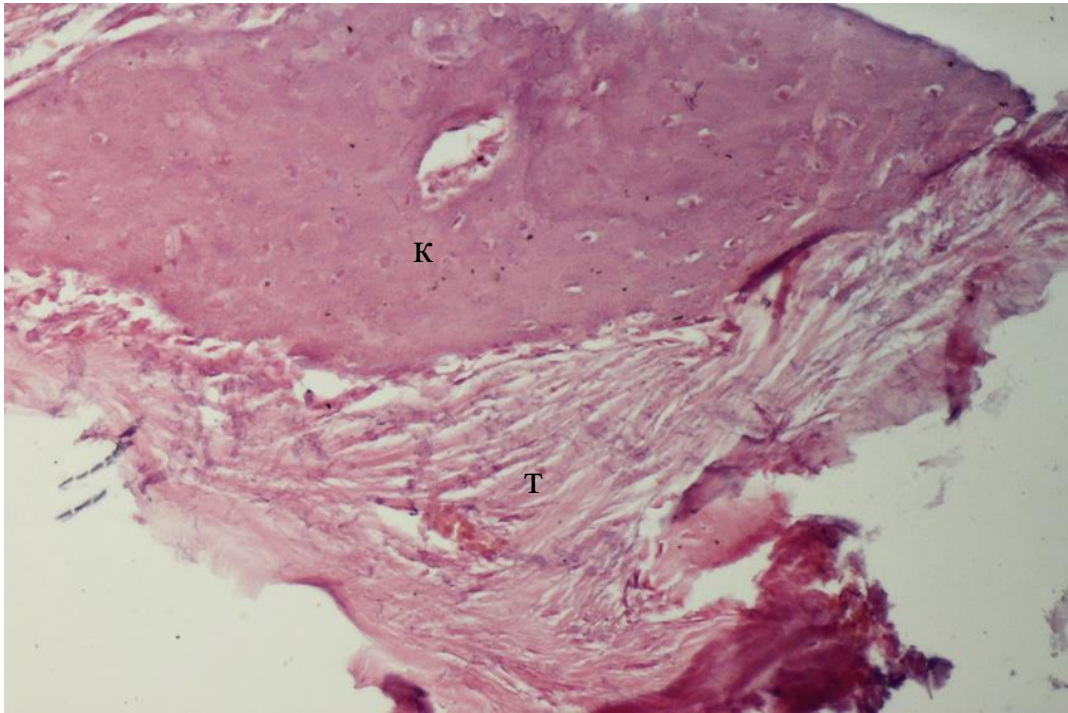


Рис. 4.16. Ділянки деградаційних змін колагену і заміщення тонковолокнистою фіброзною тканиною у групі тварин з колагеновою плівкою. Щільне прилягання колагенового імплантата з фрагментами спайок до кісткової тканини склепіння черепа. Примітка: к – кісткова тканина; т – ТМО. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

Сполучно-тканинна капсула, що сформувалась довкола імплантанта, була відокремлена від м'якої мозкової оболони вільним простором. Фрагменти імплантату, що розсмоктувався, мали вигляд блідозабарвленої однорідної безклітинної ніжноволокнистої маси. Заміщуюча дефект молода фіброзна тканина складалася з витягнутих з паличкоподібними ядрами фібробластів і фіброцитів, та поодиноких скупчень макрофагів (рис. 4.17). На окремих мікропрепаратах в товщі сполучної тканини зустрічались фрагменти імплантанта, що були оточені вузькою каймою, що складалася із клітин з округлим або овальним ядром і світлою цитоплазмою. Дефект ТМО заміщувався сполучно-тканинною пластинкою. Між краями ТМО і новоутвореною тканиною чіткої межі встановити не вдалося (рис. 4.18). В

тканині, що оточує фрагменти імплантанта як на всьому протязі останнього, так і в ділянках переходу до дефекту ТМО будь-якої запальної реакції відмічено не було.

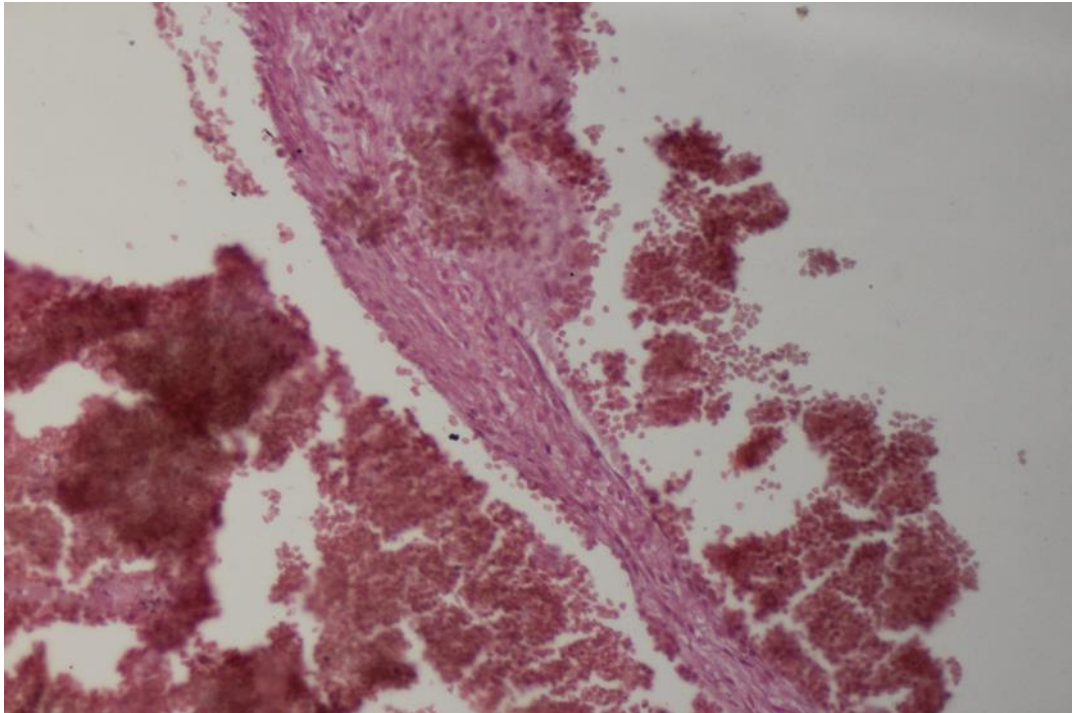


Рис. 4.17. Ділянки крововиливу з фрагментами формування молоді сполучної тканини в зоні дефекту у групі тварин з колагеновою плівкою. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

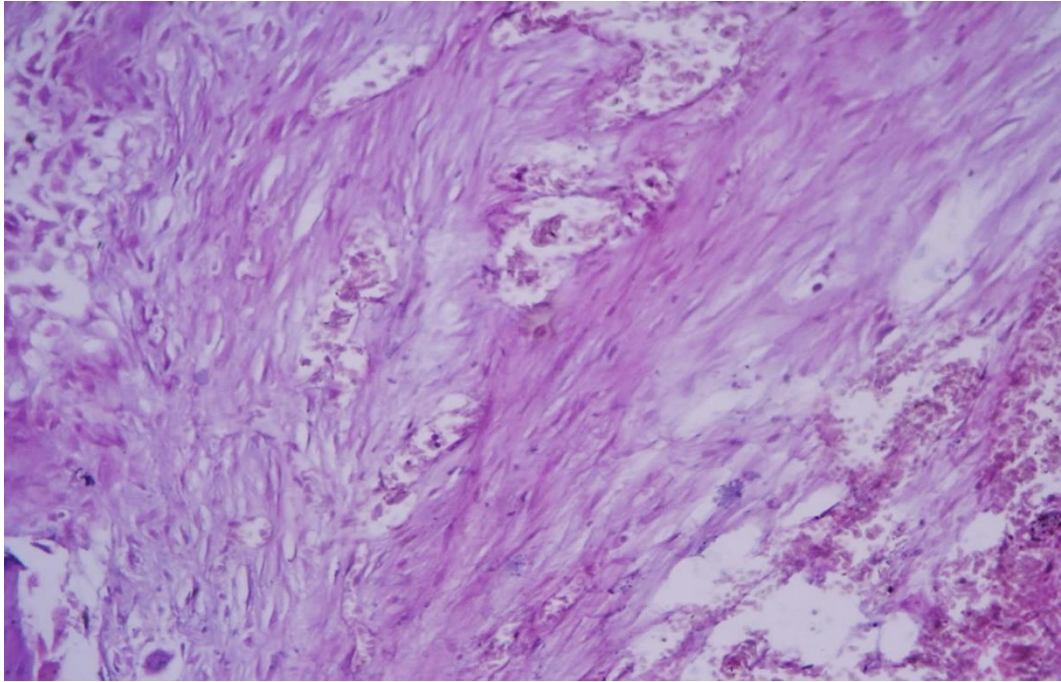


Рис. 4.18. Новоутворена ТМО у групі тварин з колагеновою плівкою. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

Структурні особливості відновлення ТМО після її пластики колагеном у поєднанні з желатином характеризувались формуванням нових колагенових волокон у трепанаційному вікні, неоднорідністю її щільності, неоднаковою товщиною і рихлою структурою. В окремих ділянках регенерату виявлено розростання новоутвореної тканини під ТМО та кісткамии склепіння черепа, з проникненням до поверхні кори мозку (рис. 4.19).



Рис. 4.19. Трепанційне вікно з регенерацією сполучнотканинних та кісткових елементів у групі тварин з колагеновою плівкою та желатином. Примітка: в – трепанаційне вікно; к – кісткова тканина; т – ТМО; м – кора мозку. Термін спостереження: 3 тижні. Пікросіріус червоний. Об. 4, ок. 10.

Подекуди реєстрували залишки желатину і елементи грануляційної тканини з кровоносними судинами (рис. 4.20 і 4.21). Середня товщина ТМО складала $185,2 \pm 49,8$, що було достовірно більше за товщину ТМО у контрольній групі. При цьому не мала достовірної різниці порівняно з відновленою ТМО шляхом використання аутопластики, колагену, хітозану і комбінації останнього з желатином.

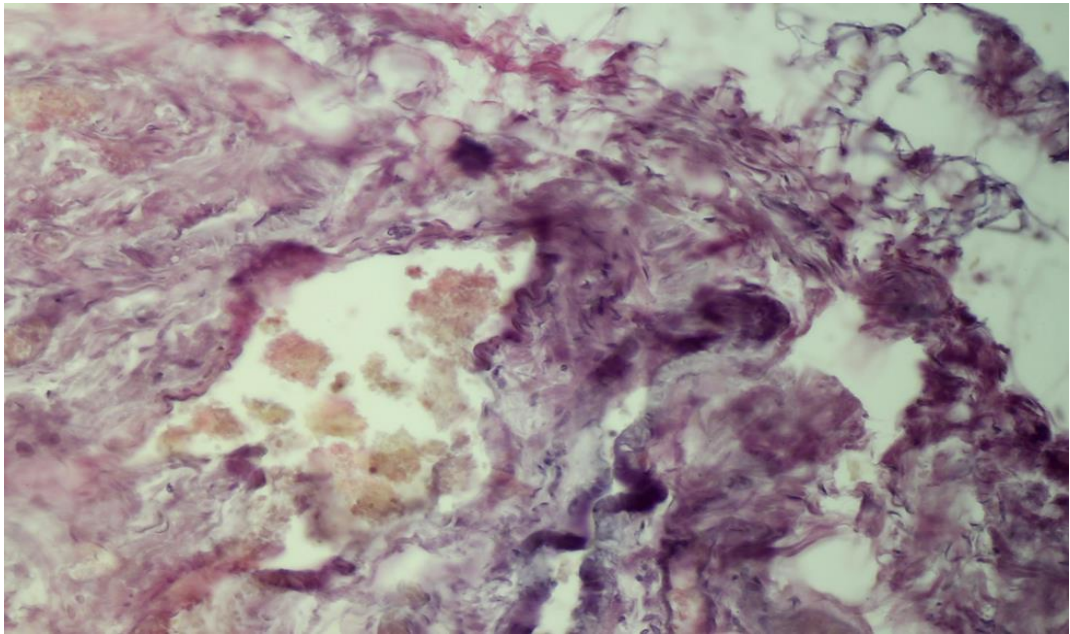


Рис. 4.20. Фрагменти щільних пучків колагенових волокон та регенована вена в центрі об'єкта у групі тварин з колагеновою плівкою та желатином. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

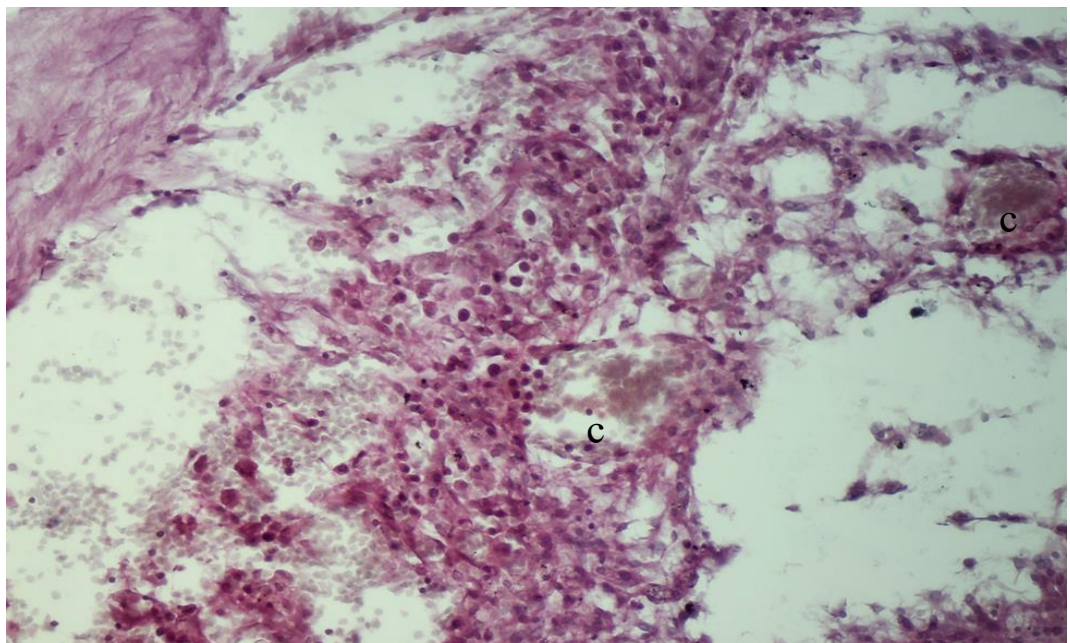


Рис. 4.21. Ділянки грануляційної тканини у ТМО у групі тварин з колагеновою плівкою та желатином. Примітка: с – кровоносні судини. Термін спостереження: 3 тижні. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

Таким чином, загальним висновком для усіх досліджуваних груп на 3 тижні експерименту після дуороластики є те, що заміщення імплантатів відбувається шляхом проростання новоутвореної сполучної тканини у вигляді окремих сполучно-тканинних волокон, джерелом якої служать клітини материнської ТМО з боку країв оболонкового дефекта, а також з боку м'яких тканин з ділянки трепанаційного отвору. Сформована молода фіброзна тканина містить значну кількість неупорядковано розташованих фібробластів. Паралельно з проростанням сполучно-тканинних елементів і активним синтезом волокнистого каркасу (в імплантаті) відбувається розсмоктування (біодеградація) структури біополімерних плівок. Процеси перебудови і заміщення пластичного матеріалу протікали без будь-яких помітних місцевих запальних реакцій. Розростання фібробластичних елементів і їх проникнення в товщу імплантів було одним з основних факторів в механізмі регенерації ТМО і збільшення її товщини, особливо після застосування хітозану.

Термін експерименту 6 тижнів.

Результати гістологічних досліджень регенерації ТМО через 6 тижнів після дуороластики показали, що за умов аутопластики край ТМО в зоні операції потовщується, спостерігаються сполучно-тканинні розростання, джерелом яких є переважно зовнішній шар материнської ТМО і, в меншій мірі, - внутрішній шар материнської ТМО (рис. 4.22). Сполучно-тканинні розростання змикались над краєм ТМО і поширювались в напрямку центра операційної рани. Операційна рана в межах трепанаційного вікна заповнена товстими колагеновими волокнами, які в окремих ділянках розташовані рихло, але на переважній протяжності мають щільне розташування (рис. 4.23). На фоні помірної кількості волокон клітинні елементи представлені значною кількістю зрілих фібробластів (фіброцитів). Багато волокон звивисті і мають нерівномірну товщину, подібно до рубцевої тканини (рис. 4.24).

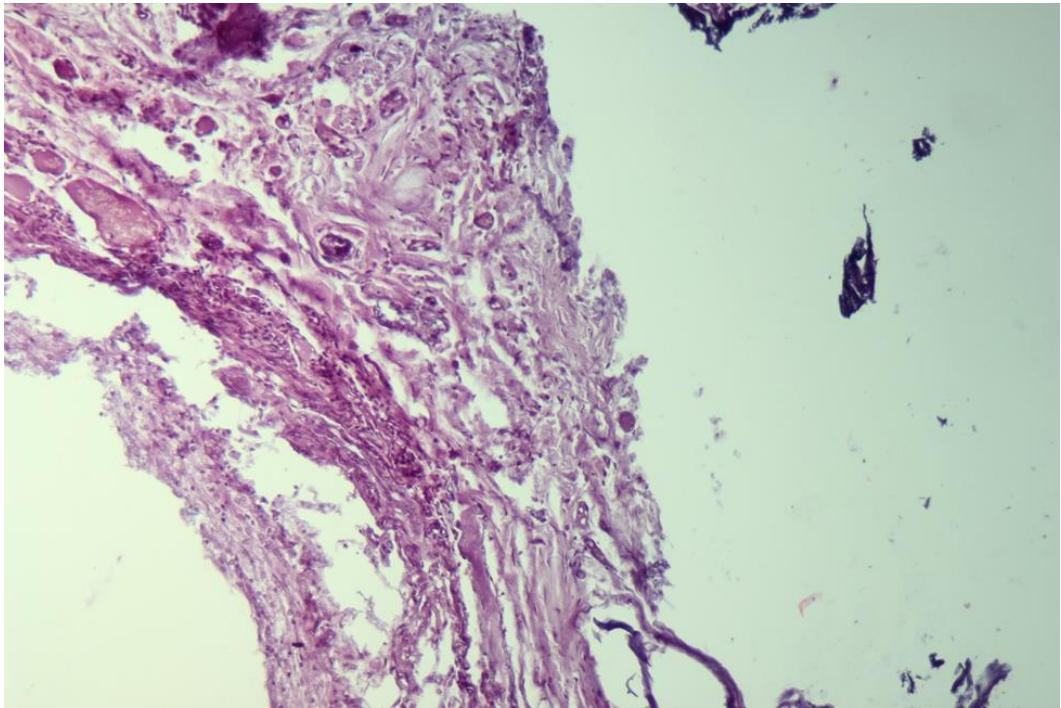


Рис. 4.22. Рубцевий тяж, який виникає шляхом заміщення грануляційної тканини у групі тварин з аутопластиккою. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 4, ок. 10.

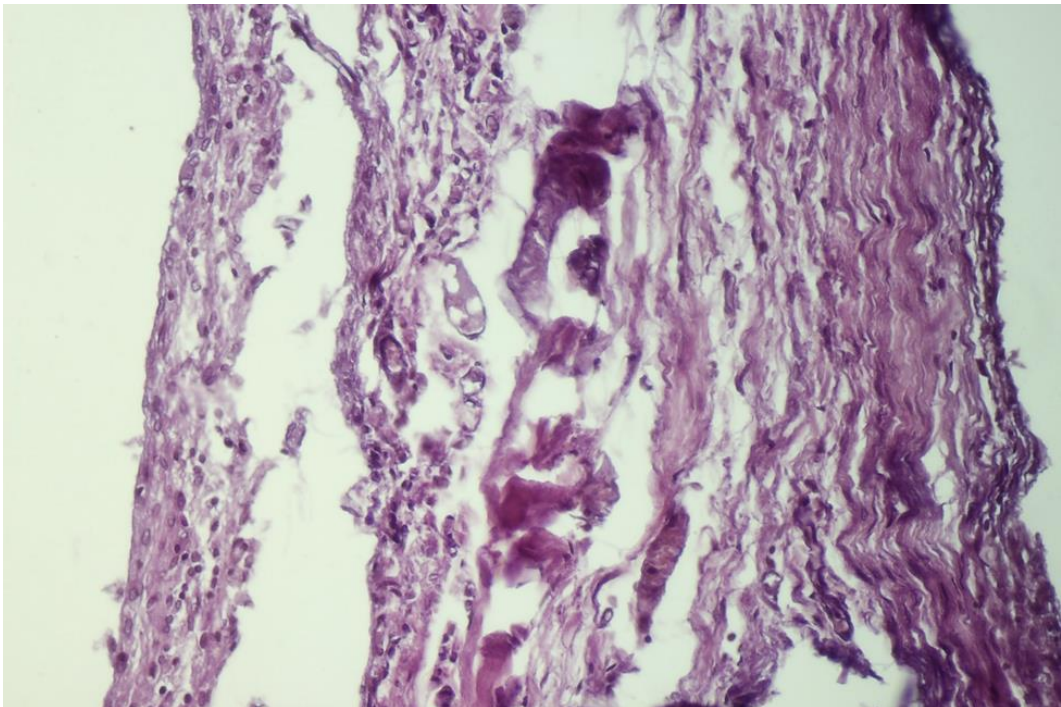


Рис. 4.23. Груба, складна за своєю архітектонікою сполучна тканина у групі тварин з аутопластиккою. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

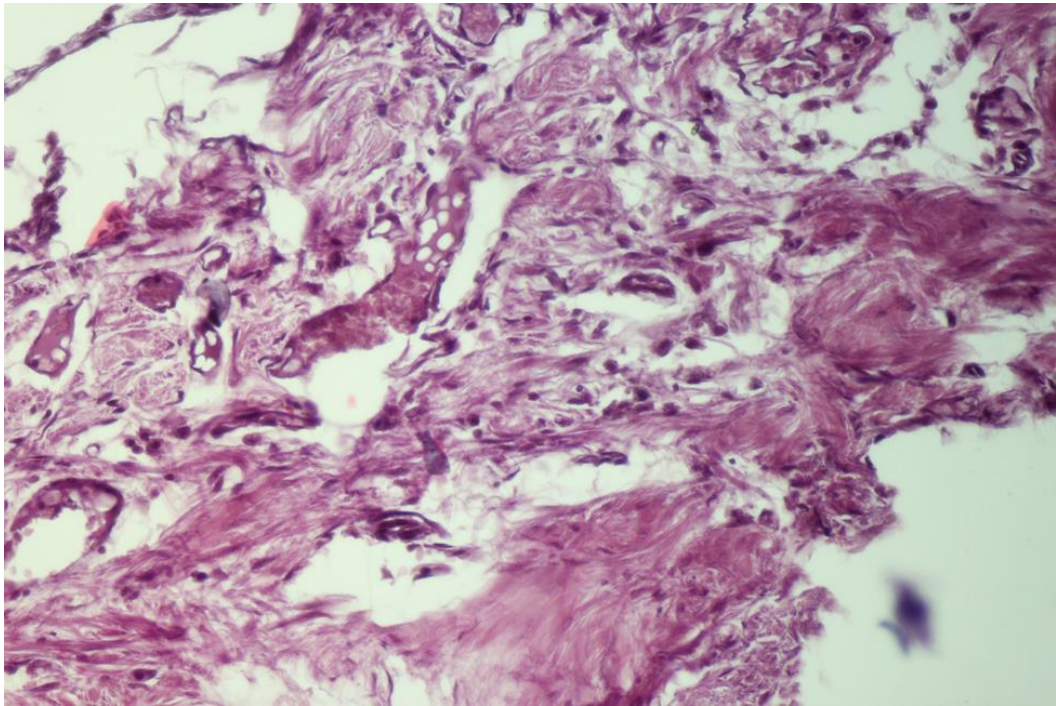


Рис. 4.24. Масивні розростання рубцевої тканини по краю операційного дефекту у групі тварин з аутопластиком. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

Разом з тим визначалися дрібні судини і невеликі ділянки грануляційної тканини. На поверхні, яка прилягає до мозку, - вогнища пухкого зрощення з підлеглою тканиною. Новоутворена сполучна тканина заповнює ділянку операційного дефекту ТМО, в результаті чого відбувається відновлення герметичності субдурального простору. За результатами морфметричного дослідження виявлено незначне збільшення товщини ТМО після аутопластики порівняно до терміну експерименту 3 тижні ($272,6 \pm 25,3$ мкм), без статистично значущої різниці.

У групі з хітозаном через 6 тижнів після дуоропластики ділянка операційного дефекту була заповнена великою кількістю поздовжньо-розташованих колагенових волокон, ніжно-волокнистої структури. Ряди тонких колагенових волокон поступово потовщувалися, складаючись в пучки

(рис. 4.25 і 4.26. В полі зору визначається значна кількість молодих фіброblastів (продовгуватої форми), а також дрібних кровоносних судин.

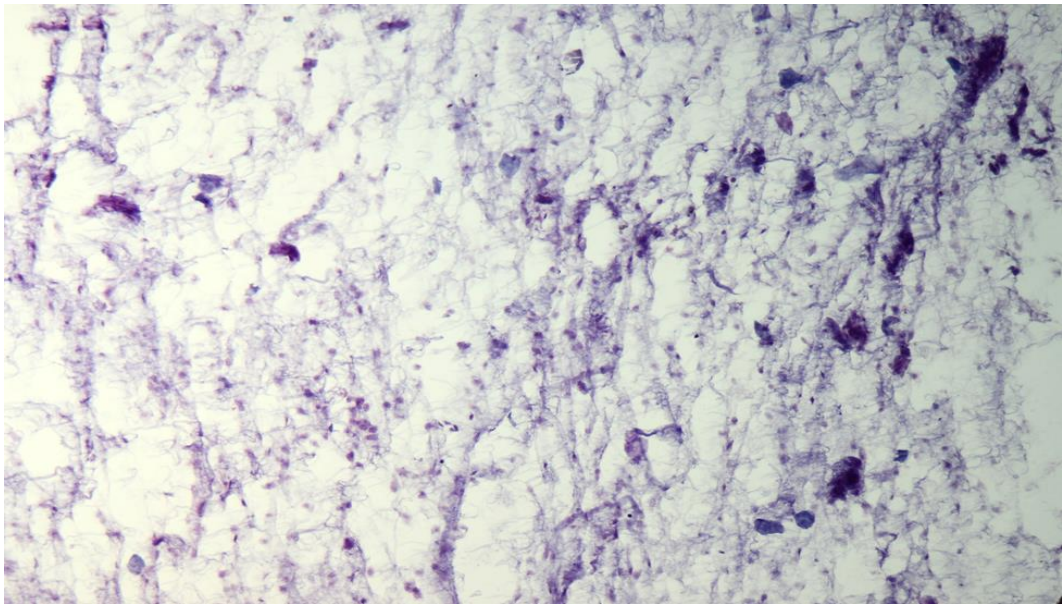


Рис. 4.25. Рихле розташування новоутворених тонких колагенових волокон у групі тварин з хітозаном. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 4, ок. 10.

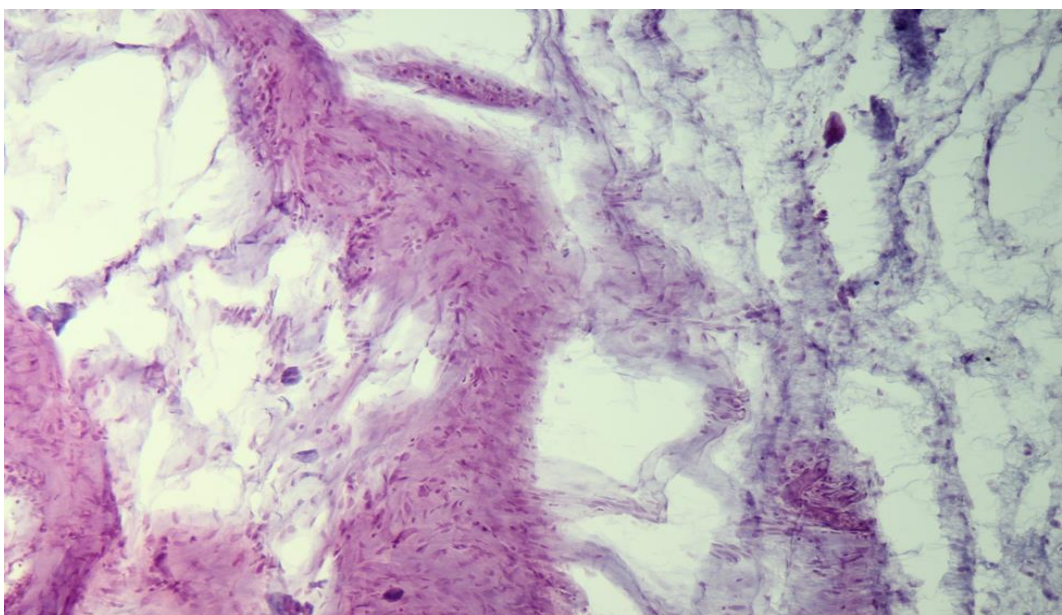


Рис. 4.26. Новоутворена сполучна тканина різної щільності у групі тварин з хітозаном. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

Через 6 тижнів виявлено зміни межі хітозанової плівки (рис. 4.27). Навколо фрагментів хітозану виявлено тонші шари колагену, які «заякорювались» у хітозан. Це свідчить про інтеграцію сполучної тканини з хітозаном по контуру останнього. За результатами морфометричного дослідження товщина відновленої ТМО ($407,1 \pm 48,8$ мкм) несуттєво збільшилась порівняно з терміном 3 тижнів, без статистично значущої різниці. Разом з тим, товщина ТМО з хітозаном на 6 тижні була достовірно більшою, ніж після аутопластики.

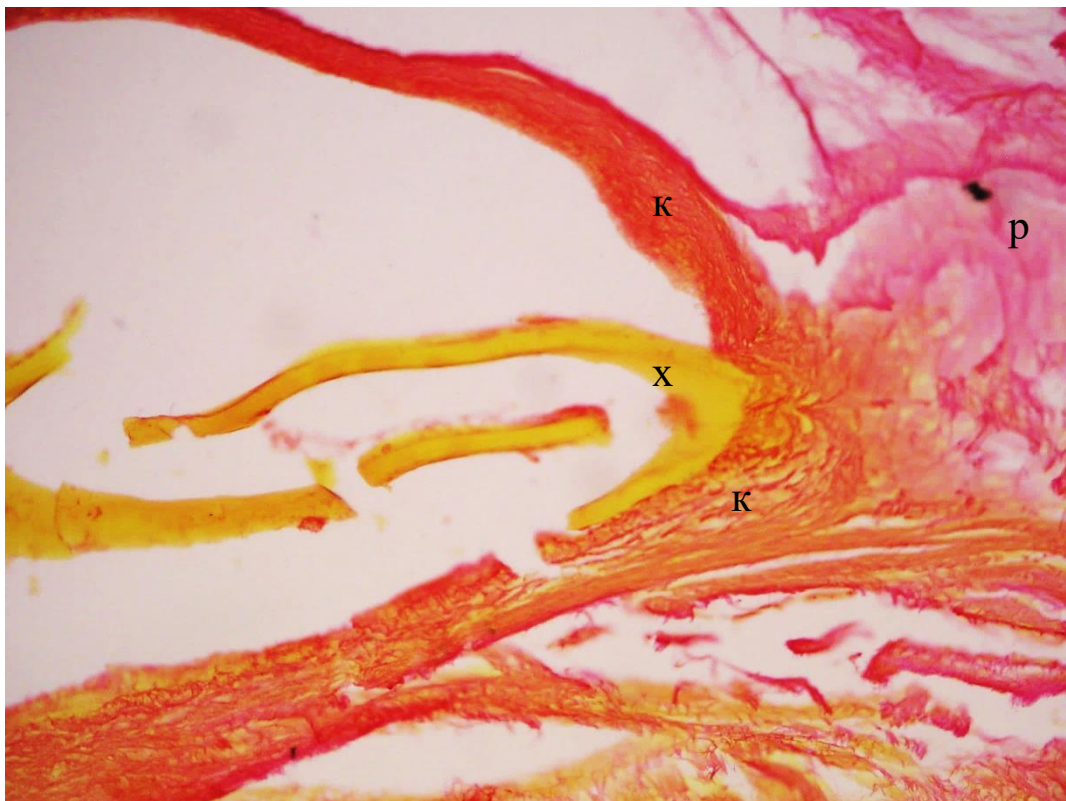


Рис. 4.27. Інтеграція сполучнотканинних елементів з залишками хітозанової плівки. Примітка: р – ніжна регенераційна тканина (волокна новоутвореного колагену); к – тонкі прошарки колагену по контуру хітозану; х – хітозан. Термін спостереження: 6 тижнів . Пікросіріус червоний. Об. 40, ок. 10.

Також відзначено одиничні тонкі спайки з підлеглою тканиною по периферії трепанаційного вікна. Герметизація субдурального простору після дурупластики з хітозаном була відновлена.

У групі з хітозаном і желатином тканина регенерату на 6 тижні представлена значною кількістю сполучно-тканинних волокон, переважно рихло розташованих; нерідко складається враження про «віддаленість» волокон одне від одного (рис. 4.28). Звертає на себе увагу присутність великої кількості фібробластів в полі зору, переважно молоді їх форми. Визначаються ділянки з грануляційною тканиною (рис. 4.29).

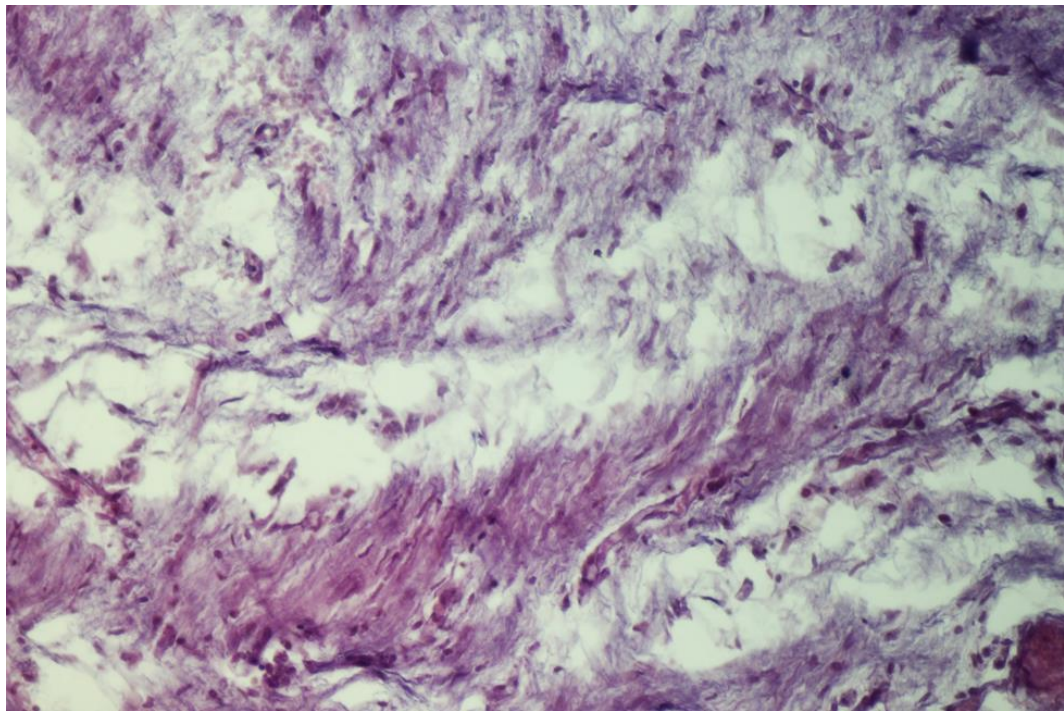


Рис. 4.28. Сформована тканина регенерату, яка складається з пучків новоутворених колагенових волокон різного ступеню щільності у групі тварин з хітозаном та желатином. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

В ділянці просвіту трепанаційного вікна спайки не спостерігалися. В одному із спостережень було відзначено залишки хітозанової плівки (рис. 4.30 і 4.31). Новоутворена сполучна тканина щільно прилягала до залишків хітозану, виявлено тонкі шари колагену, які безпосередньо контактують з полімерним матеріалом, ділянки «фіксації» новоутвореного колагену у

хітозан. Незважаючи на це регенерат ТМО мав тенденцію до збільшення товщини ($529,7 \pm 68,0$ мкм), головним чином за рахунок новоутворених шарів сполучної тканини. Герметизація субдурального простору була відновлена.

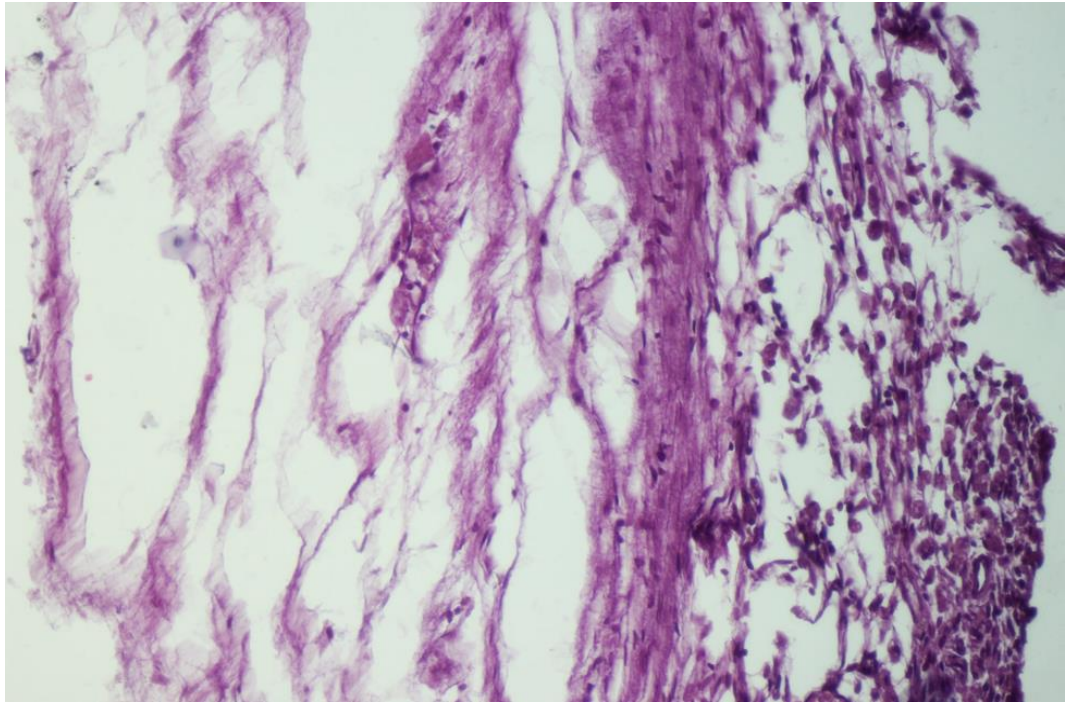


Рис. 4.29. Грануляційна тканина, яка проростає зі сторони країв операційного дефекту у групі тварин з хітозаном та желатином. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

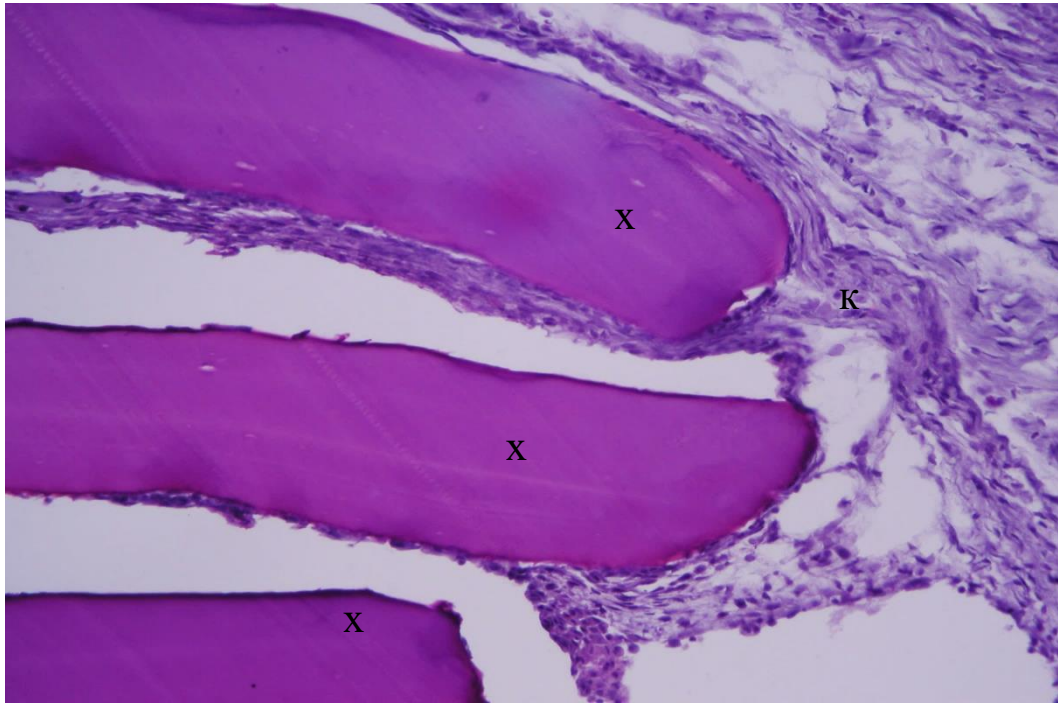


Рис. 4.30. Новоутворені тонкі прошарки сполучної тканини з колагеновими волокнами по контуру залишків хітозанової плівки у групі тварин з хітозаном та желатином. Примітка: к – сполучна тканину з колагеном; х – хітозан. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

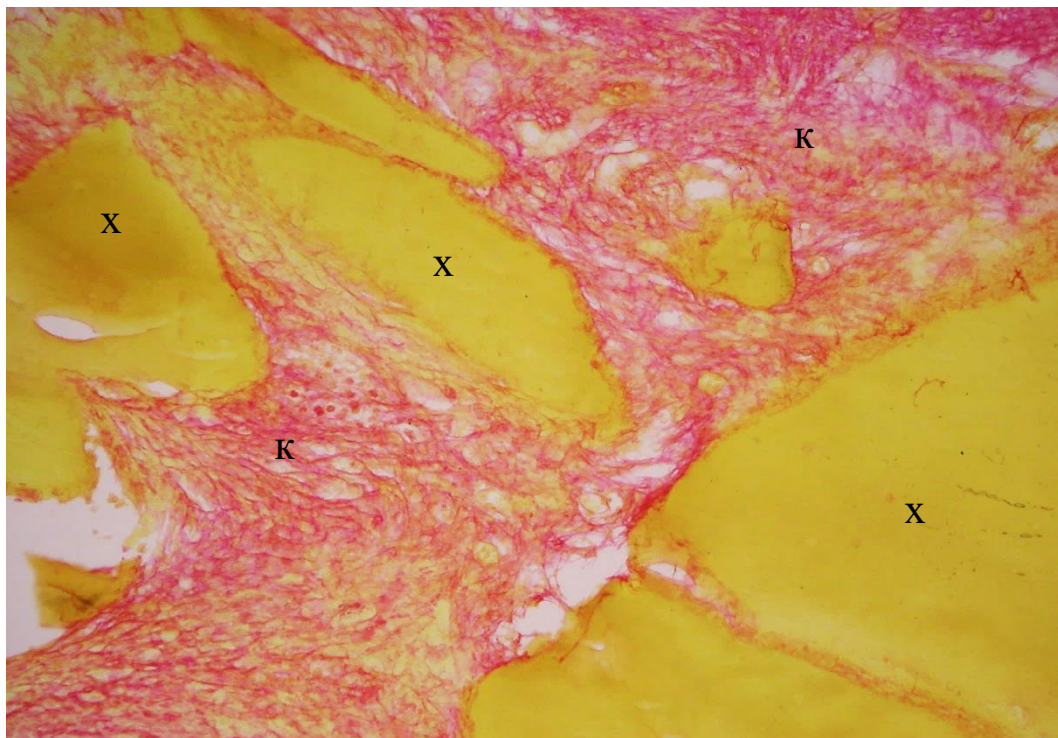


Рис. 4.31. Інтеграція сполучнотканинних елементів з залишками хітозанової плівки. Примітка: к – сітка новоутвореного колагену; х – хітозан. Термін спостереження: 6 тижнів. Пікросіріус червоний. Об. 40, ок. 10.

У групі з колагеном на 6 тиждень після дуоропластики ділянка трансплантату являла собою сполучну тканину, яка складається переважно з пучків новоутворених колагенових волокон. Волокна колагену неоднородні по щільності, потовщені, їх велика кількість, зібрані в пучки, не завжди чітко впорядковані. Кількість фібробластів на фоні новоутворених волокон в полі зору відносно невелика, фібробласти в основному зрілі (рис. 4.32 і 4.33).

В окремих ділянках реєстрували тонкі прошарки грануляційної тканини. Тонкостінні кровоносні судини визначалися в невеликому кількості. У субдуральному просторі – поодинокі пухкі спайки з мозковою речовиною, що прилягає до кори мозку. У прилеглих до трепанаційного вікна ділянках виявили відносно меншу кількість осередків рубцювання. Герметизація субдурального простору була відновлена.

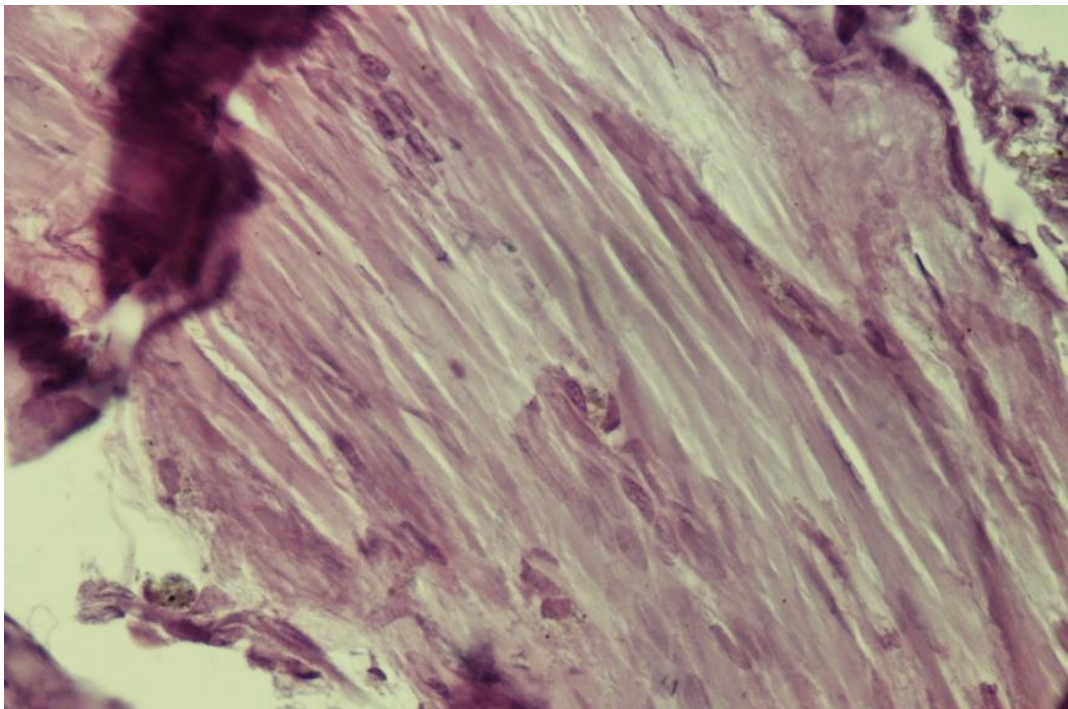


Рис. 4.32. Впорядковані і розташовані поздовжньо щільні пучки новоутворених колагенових волокон у групі тварин з колагеновою плівкою. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

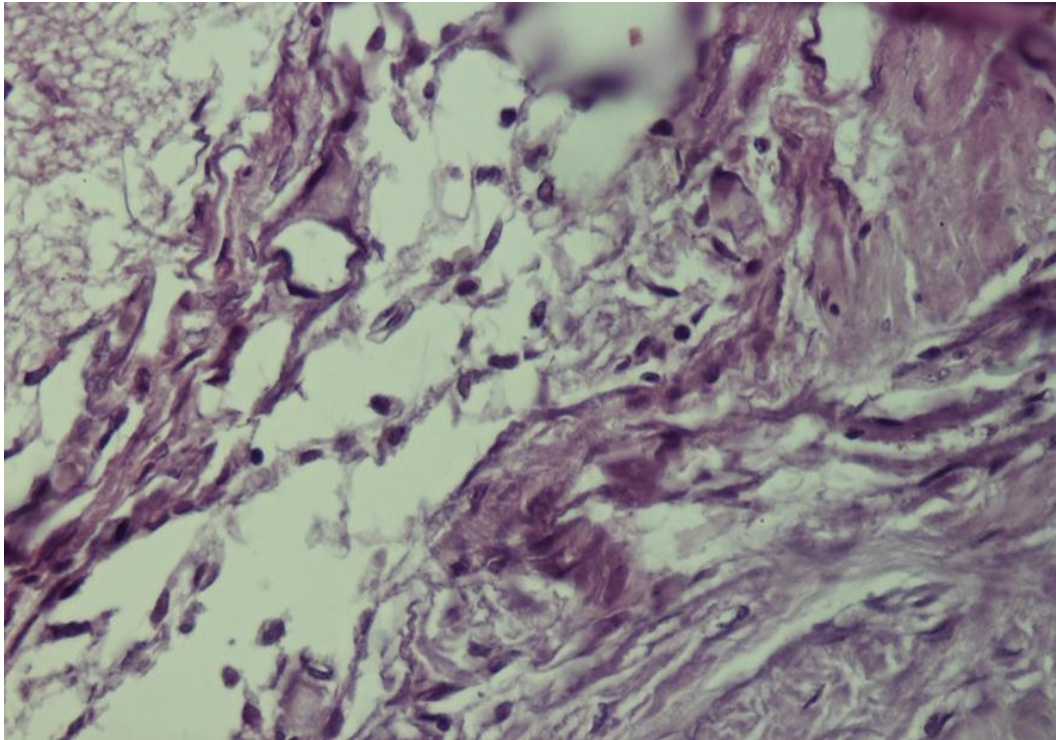


Рис. 4.33. Пучки колагенових волокон, фібробласти і кровоносні судини у групі тварин з колагеновою плівкою. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 20 ок. 10.

У групі з комбінацією колагенової плівки з желатином на 6 тижні експерименту колагенові волокна в ділянці регенерату (у трепанаційному вікні) відзначались більш рівномірним поздовжнім розташуванням, з ділянками гомогенного рубця та з «пустотами» з кровоносними судинами між окремими фрагментами регенерату (рис. 4.34).

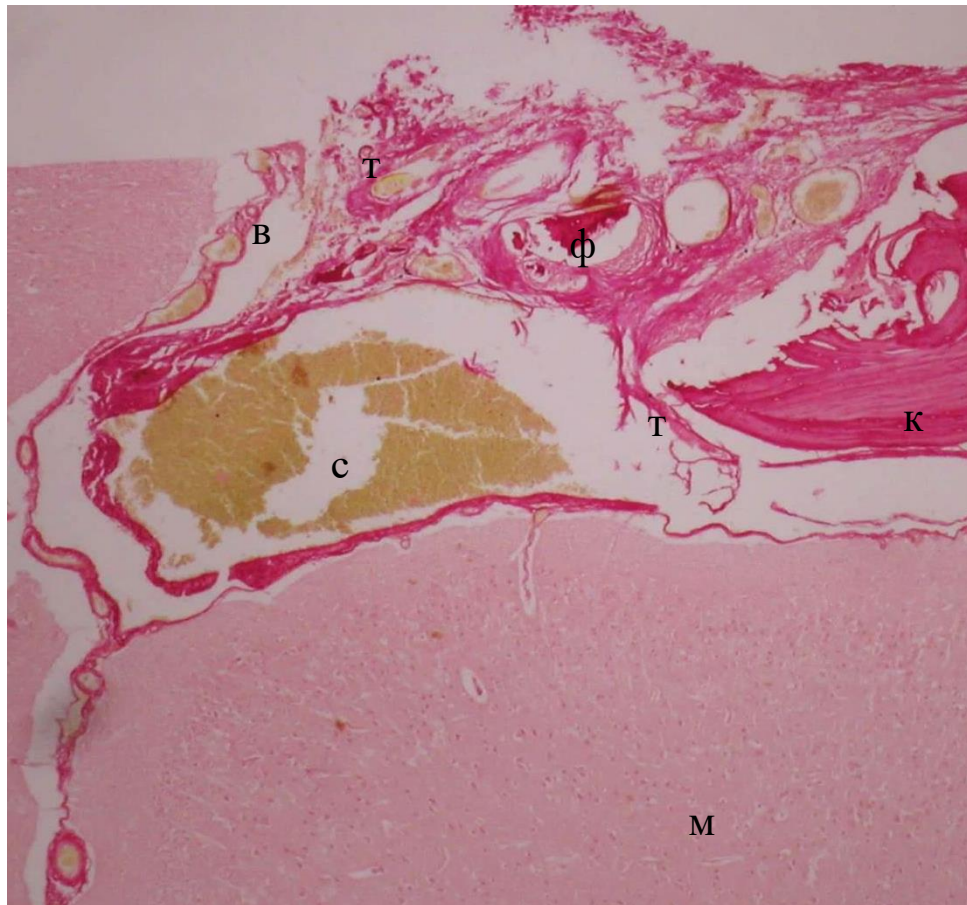


Рис. 4.34. Трепанаційне вікно і сполучнотканинний регенерат у групі тварин з колагеновою плівкою та желатином. Примітка: в – трепанаційне вікно; к – кісткова тканина; т – ТМО; м – кора мозку; с – верхній сагітальний синус; ф – фрагмент полімерної колагенової плівки. Термін спостереження: 6 тижнів . Пікросіріус червоний. Об. 4, ок. 10.

В цілому ряді ділянок новоутворена сполучна тканина характеризувалась тонкими, дифузно орієнтованими пучками колагену (рис. 4.35 і 4.36). Можна стверджувати про більш ніжний стан рубцевої тканини у групі колагену з желатином з станом рубцевої тканини у групах з застосованими хітозановими плівками.

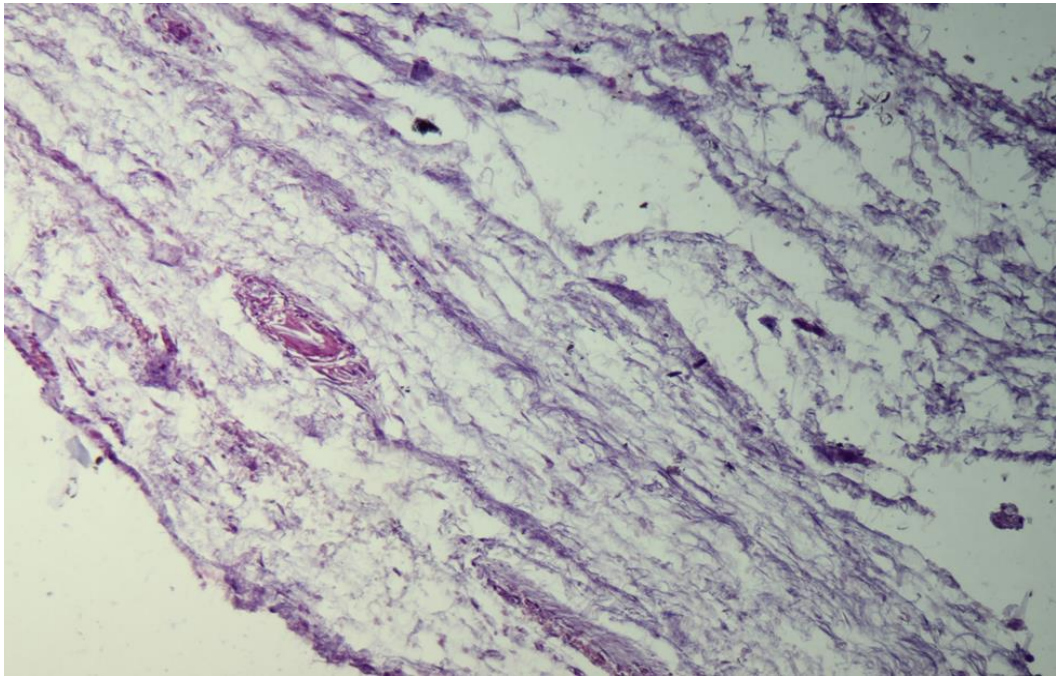


Рис. 4.35. Домінування пухкої сполучної тканини у регенованій ТМО у групі тварин з колагеновою плівкою та желатином. Поодинокі кровоносні судини серед новоутворених кластерів колагенових волокон. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

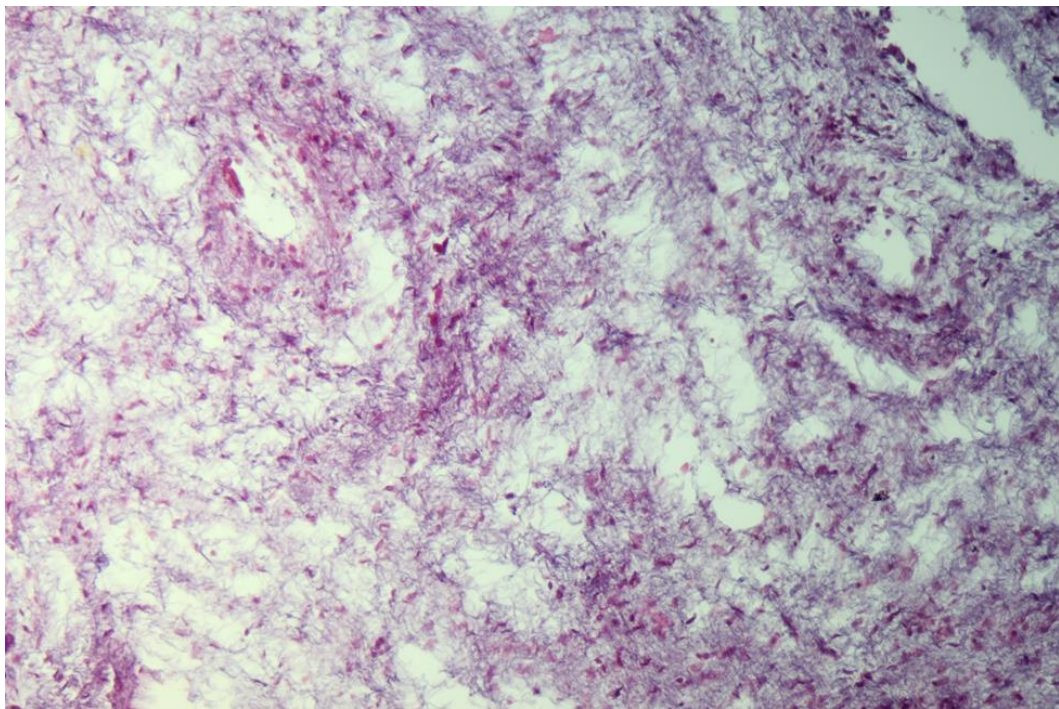


Рис. 4.36. «Мереживне» розташування колагенових волокон у сполучно-тканинному регенераті у групі тварин з колагеновою плівкою та желатином. Термін спостереження: 6 тижнів. Гематоксилін-еозин. Об. 10, ок. 10.

Реєстрували відносно невелику кількість фібробластів. В одному зі спостережень були відзначені залишки желатину у вигляді базофільно-забарвлених фрагментів. В більшості полів зору визначались тонкостінні кровоносні судини. Одиничні ниткоподібні спайки відзначались лише по краю трепанаційного вікна. Описані відмінності формування сполучно-тканинного регенерату у ТМО позначився на морфометричних показниках. Так, середня товщина відновленої ТМО становила $270,4 \pm 33,8$ мкм, що статистично значимо менше від товщини ТМО у групі з хітозаном, та комбінації хітозану із желатином (рис. 4.37). Герметичність субдурального простору була відновлена.

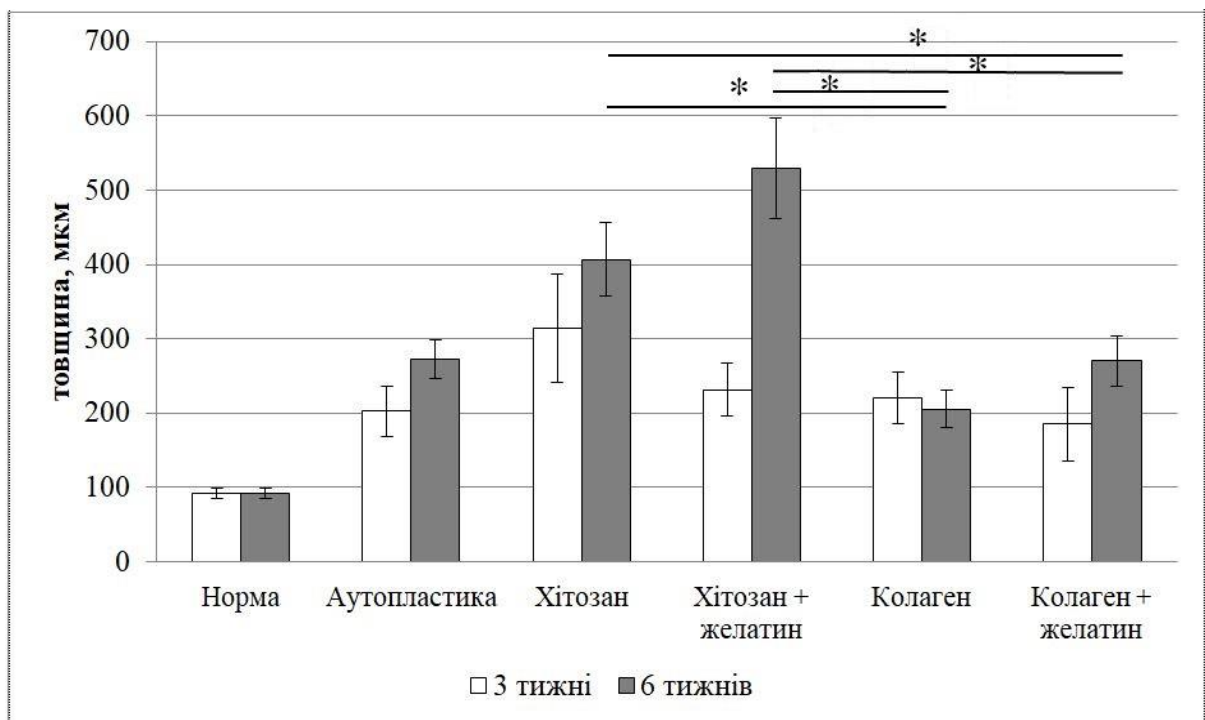


Рис. 4.37. Діаграма середньої товщини ТМО за різних способів дуропластики. Примітка: * - $P < 0,05$ (усі дослідні групи достовірно відрізнялись від групи контроль, крім колагену з желатином, $P < 0,05$)

Порівняльний аналіз результатів морфометричного вимірювання товщини ТМО у ділянці дуороластики засвідчив статистично значиму різницю між деякими досліджуваними групами. Так, через 3 тижні після аутоластики, дуороластики з використанням хітозаної плівки, хітозаної плівки з желатином, колагенової плівки товщина регенерованої ТМО статистично була більшою від інтактної ТМО у контрольній групі ($P < 0,05$). Після застосування колагенової плівки з желатином товщина ТМО на 3 тижні була у межах статистичної похибки щодо контрольних значень. Не виявлено достовірної різниці товщини ТМО між дослідними групами на 3 тижні. Разом з тим, товщина регенерованої ТМО через 6 тижнів у деяких груп збільшилась. Так, достовірно збільшилась товщина ТМО у групі з хітозаною плівкою і желатином між термінами спостереження ($P < 0,05$). У групах з аутопластикою, хітозаном і колагеновою плівкою з желатином відмічено тенденцію до збільшення товщини ТМО, але без статистично значущої різниці між термінами спостереження. При статистичному аналізі міжгрупової різниці встановлено достовірно більшу товщину ТМО у групі з хітозаном і хітозаном з желатином порівняно до групи з колагеном і колагеном з желатином ($P < 0,05$). Тобто товщина ТМО у випадку дуороластики з використанням хітозаної плівки характеризується достовірним збільшенням товщини ТМО, що пояснюється оточенням новоутвореної сполучної тканини навколо плівки.

На рисунку 4.38 представлено результати інтенсивності регенерації ТМО за 7-ми ознаковою шкалою, яка базується на морфологічних критеріях: щільності розташування новоутвореного колагену, фіброblastів і регенерованих кровоносних мікросудин (опис шкали див. у розділі 2). У всіх дослідних групах з дуоропластикою визначено більшу кількість балів за шкалою, що характеризує збільшену щільність розташування фіброblastів і колагену, в тому числі новоутвореного, появу додаткових мікросудин. Найбільше кількість балів визначено у групі з аутопластикою і це пояснюється активним процесом утворенням рубцевої тканини. Менш виражене рубцювання було охарактеризовано після застосування колагенової плівки

(достовірно менше від аутопластики на 6 тижні , $P<0,05$). У групі з колагеновою плівкою на 3 тижні рубцеві процеси були більш активними порівняно з групою з хітозаною плівкою в обидва терміни дослідження ($P<0,05$), а щодо комбінації колагенової плівки з желатином – тільки на 3 тижні експерименту ($P<0,05$). На 6 тижні не виявлено різниці між групами, де було застосовано хітозанову плівку, її комбінацію з желатином, або комбінацію колагенової плівки з желатином. У цих групах рубцеві процеси за морфологічними параметрами були менш вираженими, порівняно до колагену або аутопластики.

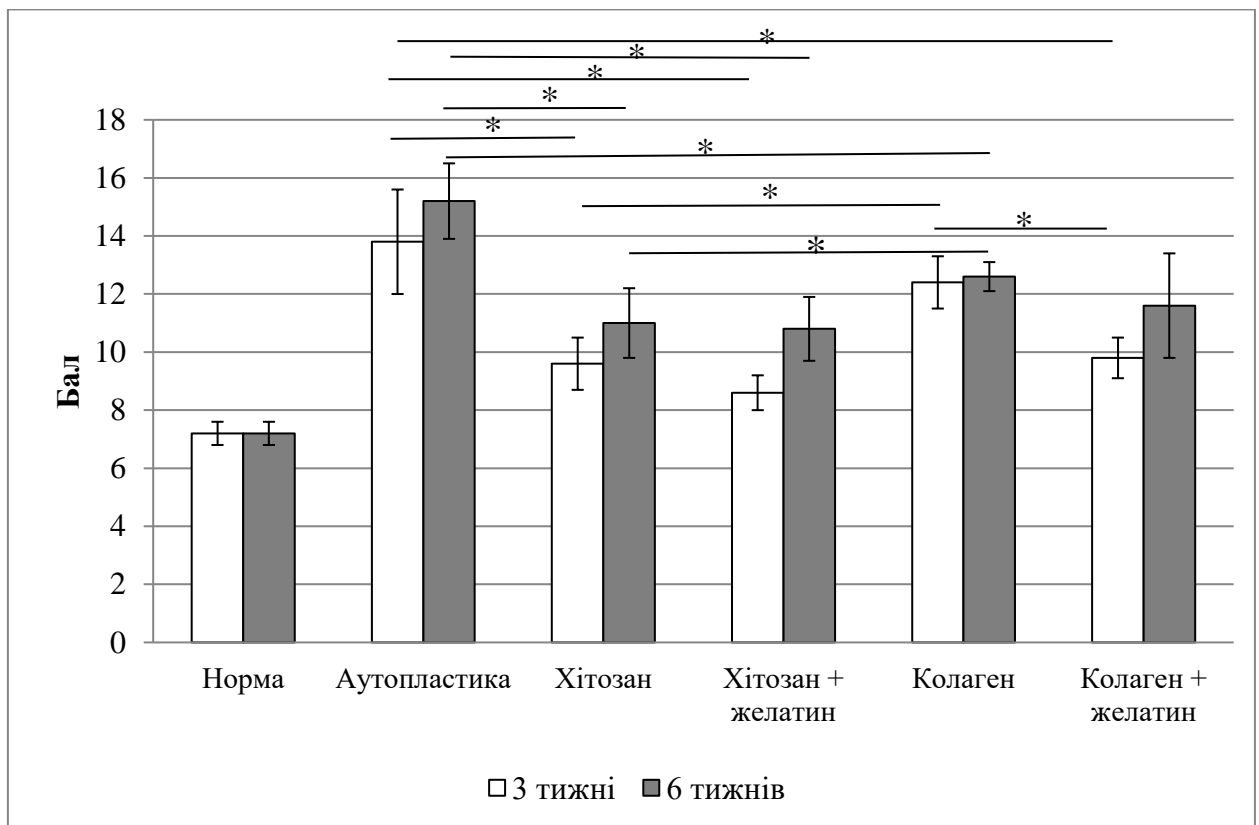


Рис. 4.38. Інтегральна оцінка інтенсивності регенеративних процесів у ТМО за 7-ми ознаковою шкалою. Примітка: * - $P<0,05$ (усі дослідні групи достовірно відрізнялись від групи контроль, $P<0,05$)

Таким чином, за результатами досліджень зроблено заключення про те, що застосування хітозаної плівки у дуоропластиці характеризується формуванням по всьому периметру імпланту тонкого шару колагенових

волокон, інтеграції регенеруючої сполучної тканини ТМО у плівку. Желатин остаточно біодеградує. Колагенова плівка також заміщується новоутвореною сполучною тканиною, встановлено її фрагментацію та наступну резорбцію даного біополімеру. Разом з цим, регенерація ТМО характеризувалася формуванням грануляційної тканини.

4.2. Конфокальна мікроскопія (кількісна оцінка фіброзного матриксу регенерованої твердої мозкової оболони).

Як показали результати морфологічних досліджень, при аутопластиці виявлено зрощення по периферії трепанаційного дефекту, між кістковими краями і поверхнею ТМО, рубцювання безпосередньо в просвіті трепанаційного вікна. У групах з колагеном, хітозаном та їх комбінаціях з желатином не виявлено залишків плівки або тільки їх фрагменти, поверхня ТМО в зоні і поза зону трепанації не відрізнялися, виявлено зрощення по периферії кісткового вікна, зрощень кісткового регенерату в просвіті трепанаційного вікна виявлено не було. У групі з колагеном і желатином відзначено наявність рубцево-спайкових утворень по периферії трепанаційного вікна.

Для кількісного вимірювання щільності позаклітинного матриксу у сполучнотканинних регенератах було застосовано конфокальну мікроскопію з подальшою обробкою зображень у програмному забезпеченні. Спершу було досліджено однотипні ділянки регенеруючої ТМО, які були забарвлені гематоксиліном та еозином у всіх дослідних групах на 3 та 6 тижні експерименту, а далі у цих зонах викликано аутофлюоресценцію колагену лазером із $\lambda_{em}=488$ нм і $\lambda_{em}=543$ (рис. 4.39 і 4.40). У мікропрепаратах забарвлених гематоксиліном та еозином виявлено формування сполучної тканини (різноспрямовані пучки колагенових волокон, фібробласти і фіброцити) і регенеровані поодинокі мікросудини після аутологічної дурупластики, що є маркером активної регенерації. Виявлено більшу щільність волокон позаклітинного матриксу (тобто колагену) у групах з колагеном та хітозану з желатином. Це особливо чітко видно в люмінесцентному зображенні (при збудженні лазером $\lambda_{em}=488$ нм). На обох групах суттєво більша щільність колагену порівняно з групою аутологічної дурупластики. При цьому у групі з колагеном з желатином істотного

збільшення щільності колагену не відмічено і ангиогенез проходить не активно.

Можна припустити, що у цьому випадку желатин сповільнює процес загоєння, хоча аутофлуоресценція при збудженні лазером $\lambda_{em}=543$ нм була збільшеною. У мікропрепаратах забарвлених гематоскиліном та еозином виявлено багато фібробластів і тонких волокон, суттєвої різниці між регенератами після аутопластики ТМО і навколо хітозанових плівок не встановлено.

На рисунках 4.41 і 4.42 наведено значення інтенсивності флюоресценції позаклітинного матриксу у регенератах ТМО, а на рисунку 4.43 результати кількісної (денситометричної) оцінки.

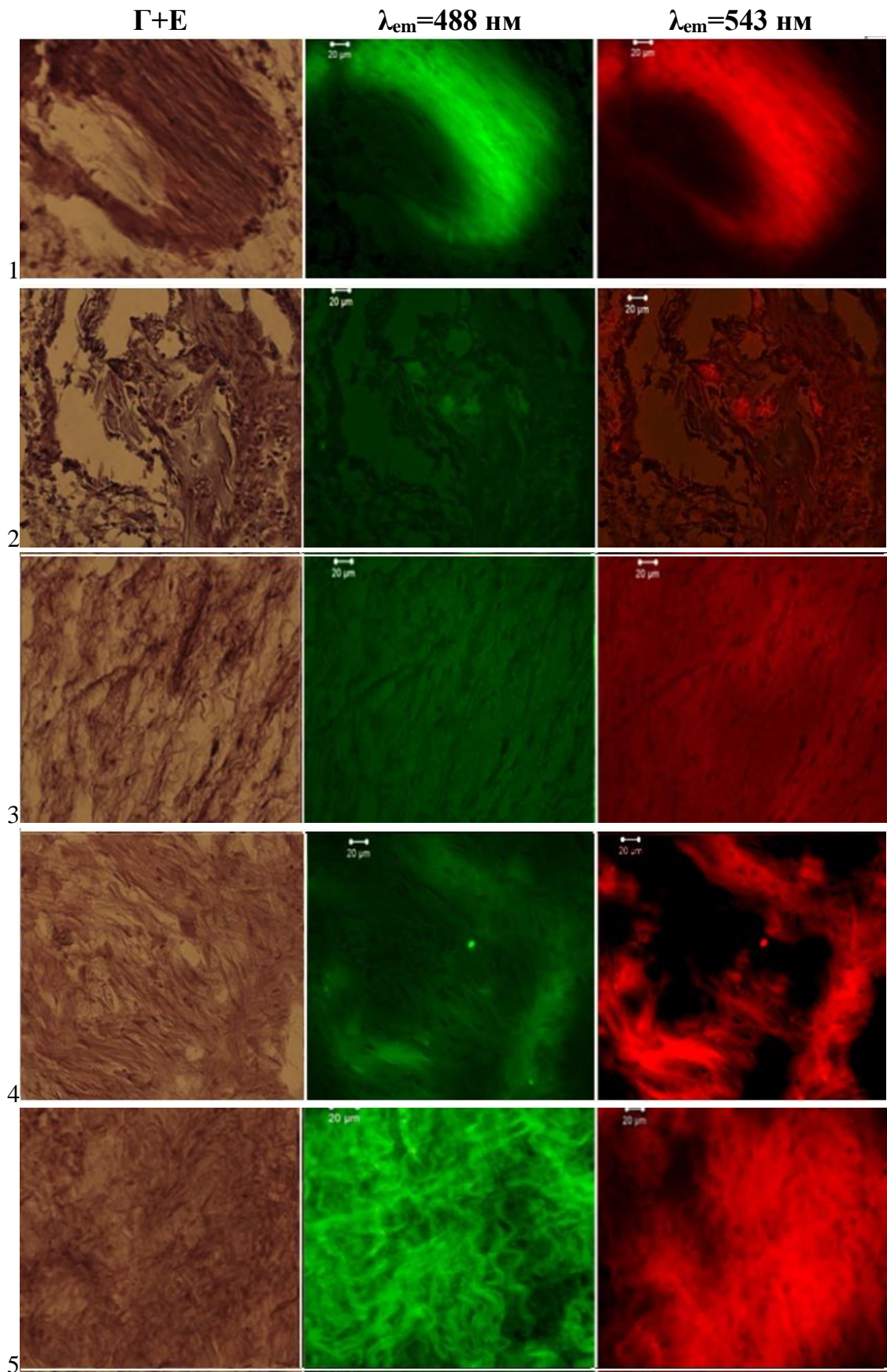


Рис. 4.39. Регенована ТМО на 3 тиждень після різних видів дурапластики. Конфокальна мікроскопія. Мікропрепарати забарвлені гематоксиліном та еозином і далі збуджені лазером з $\lambda_{em}=488 \text{ нм}$ і $\lambda_{em}=543 \text{ нм}$. Примітка: 1 – аутопластика; 2 – хітозан; 3 – хітозан+желатин; 4 – колаген; 5 – колаген+желатин. Шкала на мікрофото 20 мкм.

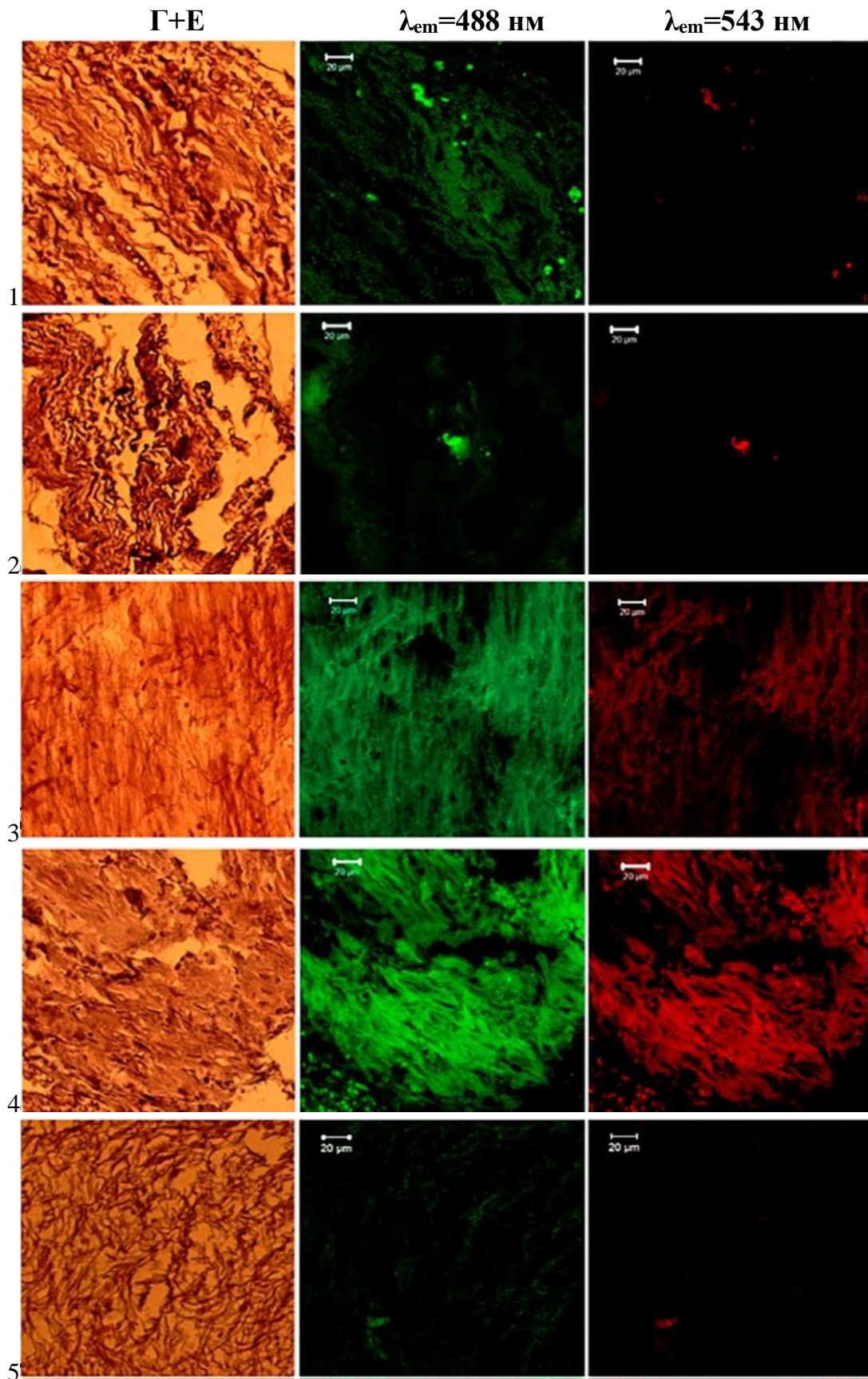


Рис. 4.40. Регенерована ТМО на 6 тиждень після різних видів дурапластики. Конфокальна мікроскопія. Мікропрепарати забарвлені гематоксилином та еозином і далі збуджені лазером з $\lambda_{em}=488 \text{ нм}$ і $\lambda_{em}=543 \text{ нм}$. Примітка: 1 – аутопластика; 2 – хітозан; 3 – хітозан+желатин; 4 – колаген; 5 – колаген+желатин. Шкала на мікрофото 20 мкм.

У групі аутопластики не відрізнялась аутофлюоресценція при збудженні лазером $\lambda_{em}=488$, тоді як збудженні лазером $\lambda_{em}=543$ на 6 тиждень зменшилась. У групі з колагеном рівень флюоресценції був більшим за такий у групі з аутопластикою і на 6 тижні досяг статистично значущої різниці. У групі з хітозаном і хітозаном з желатином виявлено достовірно менший рівень флюоресценції на 3 тижні порівняно до групи з колагеновими плівками при збудженні лазером $\lambda_{em}=488$ (після $\lambda_{em}=543$ лише тенденція). На 6 тижні відмічено незначне збільшення інтенсивності флюоресценції при збудженні лазером $\lambda_{em}=488$ і зниження після лазеру з $\lambda_{em}=543$. У групі колагену з желатином рівень флюоресценції на 6 тижні при збудженні лазером $\lambda_{em}=488$ і $\lambda_{em}=543$ був достовірно меншим від групи з колагеновими плівками. А при комбінації хітозану з желатином показники були більшими за значення у групі з аутопластикою і зростали у динаміці експерименту. Як заключення, застосування колагенової плівки та хітозанової плівки з желатином сприяло загоєнню ТМО і у більшій мірі порівняно з іншими способами дуропластики, через активацію регенерації сполучної тканини і синтезу колагену у позаклітинний матрикс, а сама імплантована плівка на 6 тиждень деградує.

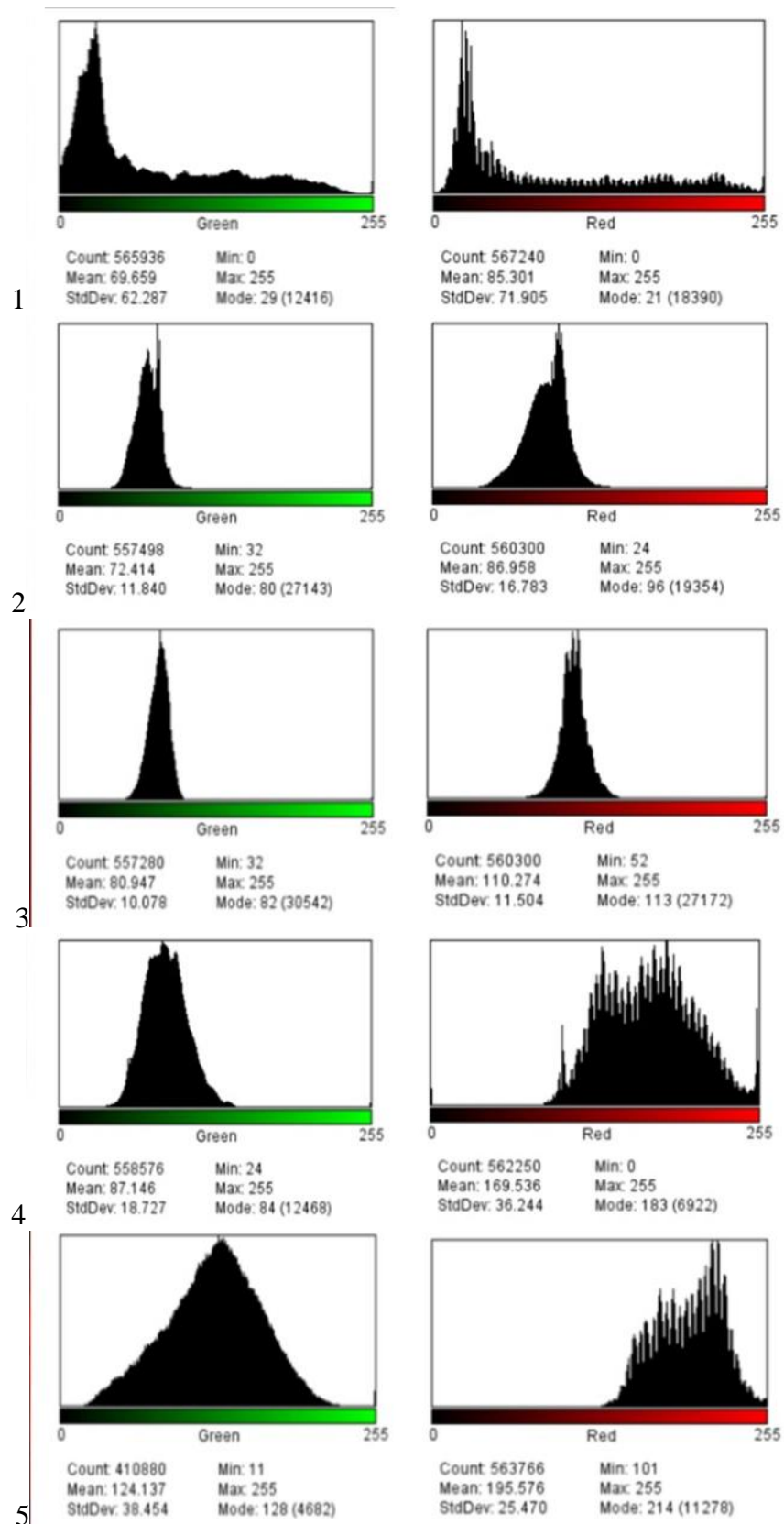


Рис. 4.41. Інтенсивність спонтанної аутофлуоресценції на 3 тиждень після різних видів дулопластики. Діаграми на основі денсіометричного аналізу зображень, одержаних методом конфокальної мікроскопії після збудження лазером з $\lambda_{em}=488$ нм і $\lambda_{em}=543$ нм. Примітка: 1 – аутопластика; 2 – хітозан; 3 – хітозан+желатин; 4 – колаген; 5 – колаген+желатин. Шкала на мікрофото 20 мкм.

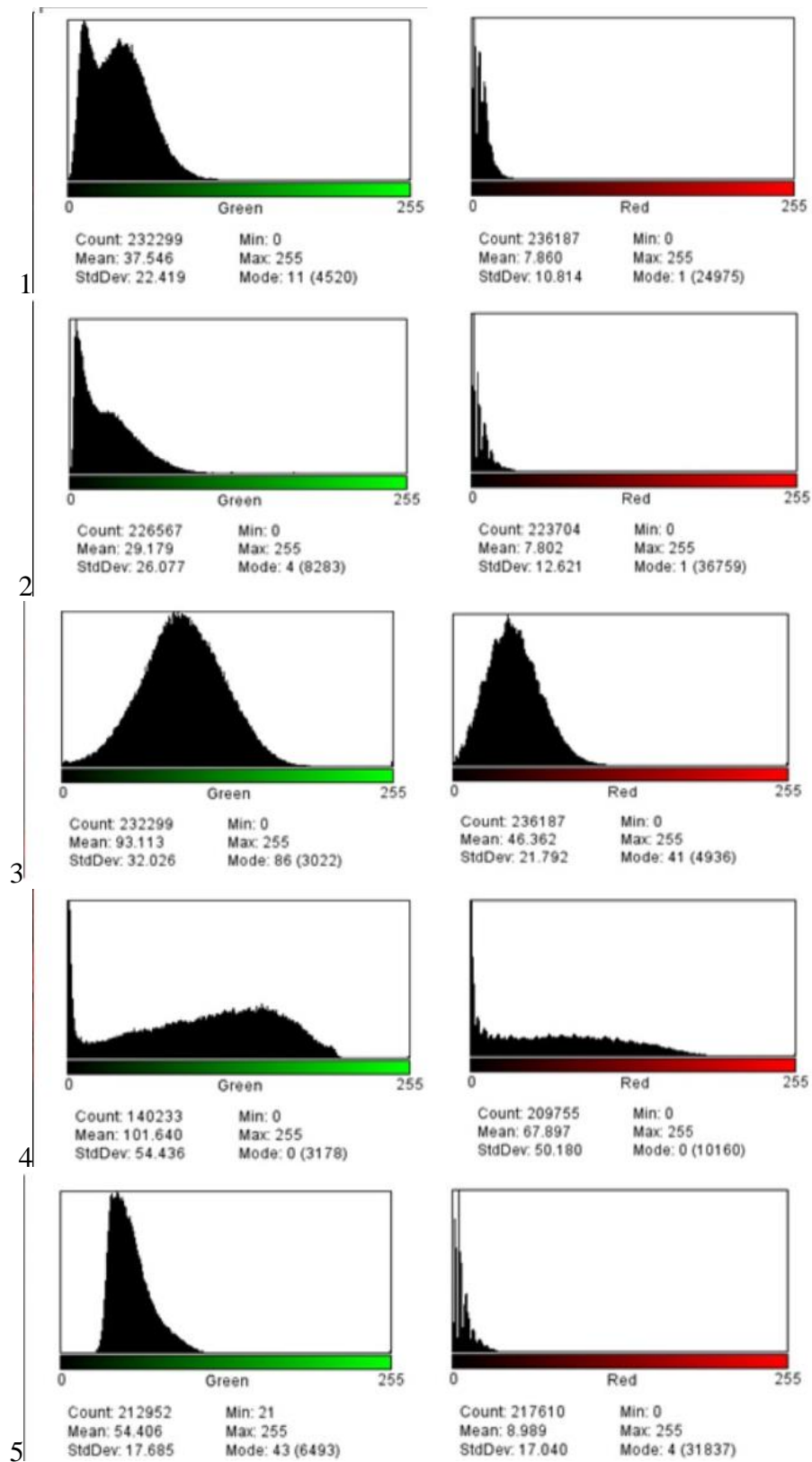


Рис. 4.42. Інтенсивність спонтанної аутофлуоресценції на 6 тижень після різних видів дуропластики. Діаграми на основі денсіометричного аналізу зображень, одержаних методом конфокальної мікроскопії після збудження лазером з $\lambda_{em}=488$ нм і $\lambda_{em}=543$ нм. Примітка: 1 – аутопластика; 2 – хітозан; 3 – хітозан+желатин; 4 – колаген; 5 – колаген+желатин. Шкала на мікрофото 20 мкм.

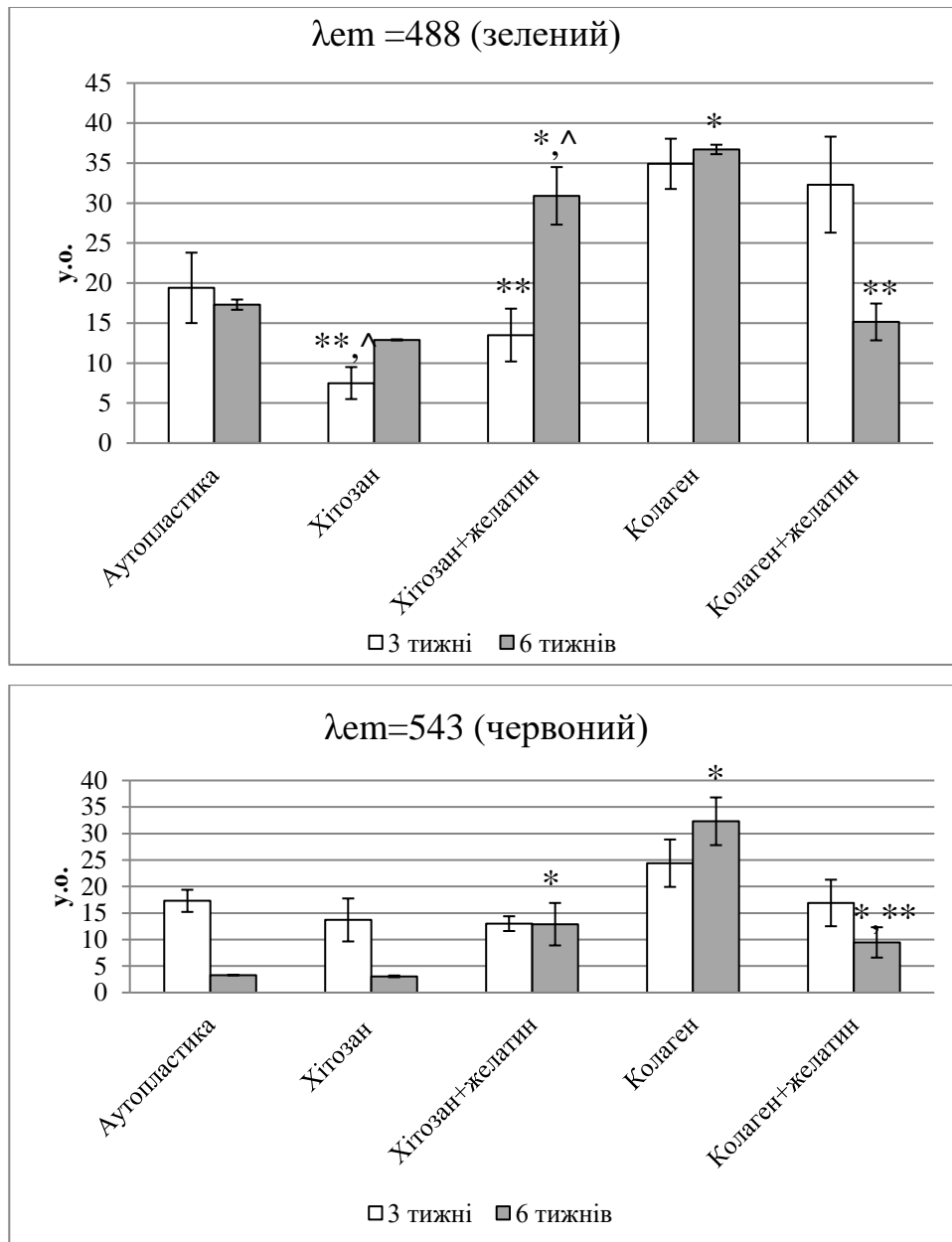


Рис. 4.43. Середні значення флуоресценції одержаної з регенератів ТМО на 3 і 6 тижні після різних видів дуропластики методом конфокальної мікроскопії. Примітка: * $P \leq 0,05$ у порівнянні з аутопластиккою; ** $P < 0,05$ у порівнянні з колагеновою дуропластиккою; ^ $P \leq 0,05$ порівняти з колаген-желатиною дуропластиккою.

Таблиця 4.1

Результати денситометричної оцінки інтенсивності флюоресценції білкових молекул у регеноерованій ТМО на 3 і 6 тижні після різних видів дурупластики.

| Група | Довжина хвилі | | | |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | 3 тижні | | 6 тижнів | |
| | $\lambda_{em}=488$ (зелений) | $\lambda_{em}=543$ (червоний) | $\lambda_{em}=488$ (зелений) | $\lambda_{em}=543$ (червоний) |
| Аутопластика | 19,4±4,36 | 24,3±2,09 | 17,3±0,64 | 3,3±0,04 |
| Хітозан | 7,5±2,01**^ | 13,7±4,05 | 12,9±0,07 | 3,0±0,16 |
| Хітозан+желатин | 13,5±3,26** | 13,0±1,39 | 30,9±3,59*^ | 12,9±4,0* |
| Колаген | 34,9±3,14 | 24,4±4,47 | 36,7±0,59* | 32,3±4,5* |
| Колаген+желатин | 32,3±5,9 | 16,9±4,39 | 15,4±2,27** | 9,4±2,86*,** |

Примітка: *P ≤0,05 у порівнянні з аутопластикою; ** P <0,05 у порівнянні з колагеновою дурупластикою; ^ P ≤0,05 порівняти з колаген-желатиною дурапластикою

Висновок до розділу 4.

Проведені дослідження показали можливість застосування вибраних плівкових матеріалів (колагенова, хітозанова і желатинова плівки) для пластики ТМО в експерименті. Результати морфологічного дослідження доводять здатність даних матеріалів до біодеградації. Зони заміщення дефектів ТМО (регенератів) характеризуються загальними рисами будови: це перш за все формування молоді сполучної тканини, участь фібробластів (разного

ступеню зрілості) в побудові новоутворених колагенових волокон, формуванням судинного русла, яке забезпечує трофіку регенерованої тканини.

Хітозанова плівка служить каркасом для побудови молодої сполучної тканини. Використання хітозану з желатином характеризується більш активним процесом загоєння, ніж при використанні самого лише хітозану. Разом з тим формування регенерату при використанні колагенових плівок (без желатину) відбувається відносно швидше, так як утворені пучки новоутворених колагенових волокон товсті і, нерідко, з «завихреннями». Застосування желатину (відносно застосування колагенової плівки) призводить до зменшення щільності тонких колагенових новоутворених волокон одне відносно одного і, разом з тим, до їх більшої впорядкованості в тканинах регенерату.

Рубцево-спайковий процес був найбільш виражений в групі аутопластики, а збільшення товщини у групі хітозану з желатином. Процеси відновлення (загоєння) при використанні даних біополімерних біодеградуючих матеріалів не супроводжувались запальною реакцією. Для усіх досліджуваних груп з полімерними плівками було характерним поступове розсмоктування обраних матеріалів і синхронне їх заміщення тканиною регенерату, що сприяло формуванню гістоархітекtonіки ТМО, відновленню герметичності субдурального простору.

РОЗДІЛ 5

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ВІДНОВЛЕНОЇ ТВЕРДОЇ ОБОЛОНИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ МЕТОДОМ ІНФРАЧЕРВОНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

5.1. Інфрачервона спектроскопія штучних замінників ТМО.

Методом інфрачервоної спектроскопії досліджено ІЧ спектри біодеградуючих плівок хітозану. Графік спектру наведено на рисунках 5.1. Унікальна характеристика ІЧ спектрів визначається біохімічною будовою основного компонента плівок. У ІЧ-спектрі хітозану виявлено три смуги коливань. Смуги в інтервалі $1255\text{--}1580\text{ см}^{-1}$ відповідає Амиду II і Амиду III. Широка смуга при 1706 см^{-1} відноситься до валентних коливань зв'язку $\text{C}=\text{O}$ карбонільних груп; характеристичні смуги поглинання біля 1573 см^{-1} відповідають деформаційним коливанням N-H -зв'язку; смуга при 1403 см^{-1} відноситься до валентних коливань $-\text{C-O}$ -зв'язку первинної спиртової групи в хітозані; смуга при 1220 см^{-1} пов'язана із коливаннями C-O в імідоефірних груп; смуга при 1469 см^{-1} зумовлена осьовою деформацією C-N -зв'язку в аміногрупах.

Смуга близько 1050 см^{-1} обумовлена валентними коливаннями C-O зв'язків в аліфатичних первинних спиртах. Вона перекривається з широким піком при 1110 см^{-1} , що, разом з малоінтенсивною смугою при 890 см^{-1} , відноситься до β -(1-4)-глікозидних зв'язків в полісахаридних ланках.

Смуга при 925 см^{-1} відноситься до α -(1-3)аномерного зв'язку. Смуга при 1545 см^{-1} , що пов'язана з коливаннями $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{O}$, та NH -зв'язків (амід II) у спектрі протонowanego хітозану, слабо виражена. У той самий час у спектрі наявна смуга при 1288 см^{-1} , що відповідає коливанням C-H зв'язків в $-\text{CH}_2-$ групах, які слабо взаємодіють з амідом III. Смуга при 1341 см^{-1} може бути віднесена до деформаційних коливань OH -груп, тоді як смуга при 1375 см^{-1} у

структурно-чутливому діапазоні спектру відповідає деформаційним коливанням СН зв'язку в ацетамідних групах і є характерною для псевдокристалічної структури [155].

Тобто, найбільш інтенсивним ІЧ-спектр хітозану є у межах 1152-1000 cm^{-1} , тому при дослідженні регеноерованої ТМО з хітозаном, унікальна смуга в ІЧ спекті може бути критерієм ідентифікації хітозану у регенераті ТМО. Таким чином, хітозан має свої унікальні смуги в ІЧ спектрі, які можна відрізнити.

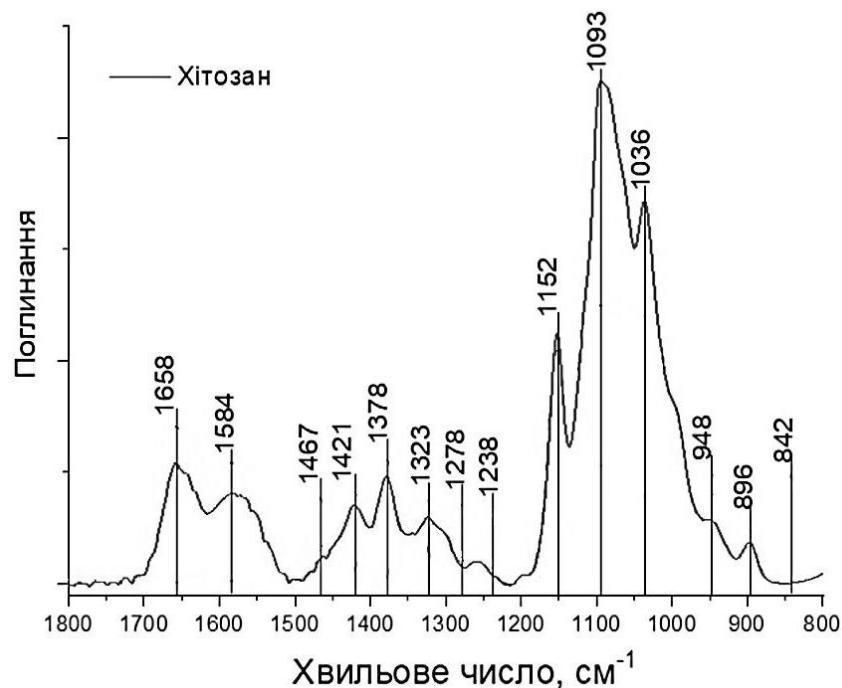


Рис. 5.1. FTIR спектри плівки хітозану. Максимум ІЧ спектрів у межах 1152-1000 cm^{-1}

Були визначені спектральні маркери тканини ТМО без оперативного втручання (контроль, інтактна ТМО). Для інтактної тканин ТМО були виявлені смуги в ІЧ спектрі з максимумами у Амід А – 3300 cm^{-1} , Амід І – 1650-1633 cm^{-1} , Амід ІІ – 1547 cm^{-1} , Амід ІІІ – 1203-1281 cm^{-1} . Схема спектру білкової молекули показано на рисунку 5.2. Як видно з графіків на рисунках 5.1 і 5.2 спектри смуги коливань хітозану білкової молекули істотно відрізняються.

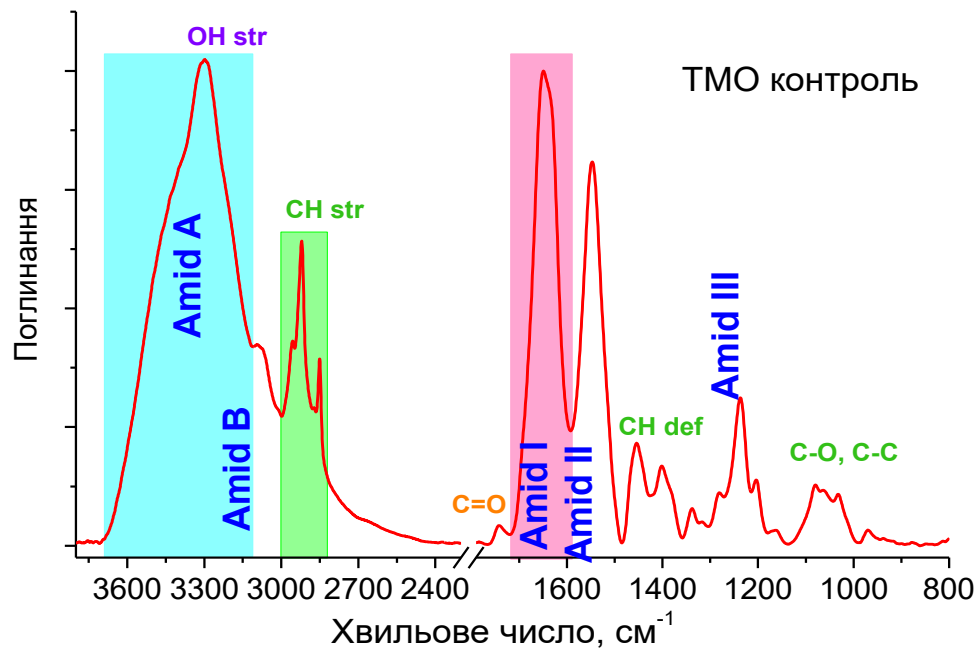


Рис. 5.2. Схематичне зображення FTIR спектру білкової молекули (контрольна ТМО).

5.2. Результати інфрачервоної спектроскопії інтактної ТМО та відновленої ТМО при застосуванні різних біодеградуючих плівок.

Досліджено рубцеву тканину, яку було одержано з регенованої ТМО. Характерною особливістю рубцевої тканини є інтенсивна смуга C=O на 1742 см^{-1} . Окрім того, можна відмітити меншу напівширину смуги Амід I в рубцевій тканині за рахунок зменшення вкладу плеча в області 1632 см^{-1} , що відповідає за потрійну спіраль. Відносна інтенсивність Амиду I до Амиду II в контролі складає 1,25-1,31, а в рубцевій тканині 1,54-1,72, що свідчить про зменшення інтенсивності смуги Амід II порівняно з Амідом I. Смуга Амід III в області 1237 см^{-1} є не до кінця структурованою, а саме слабо виражені плечі на 1281 та 1204 см^{-1} (рис. 5.3). Всі ці ознаки можуть бути основою для ідентифікації рубцевої тканини, або для виявлення характерних тенденцій до рубцювання після проведеної операції.

За результатами досліджень регенованої ТМО після аутопластики виявлено деякі відмінності. Встановлено радикальні спектральні відмінності між регенеруючою ТМО та рубцево-спайковою тканиною (зелена і чорна

криві на рисунку відповідно) на 3 і 6 тижні спостереження. Однак можна стверджувати що напівширина обох амідних смуг у випадку аутопластики має тенденцію до збільшення щодо інтактної ТМО, що характерно для молоді новоутвореної тканини.

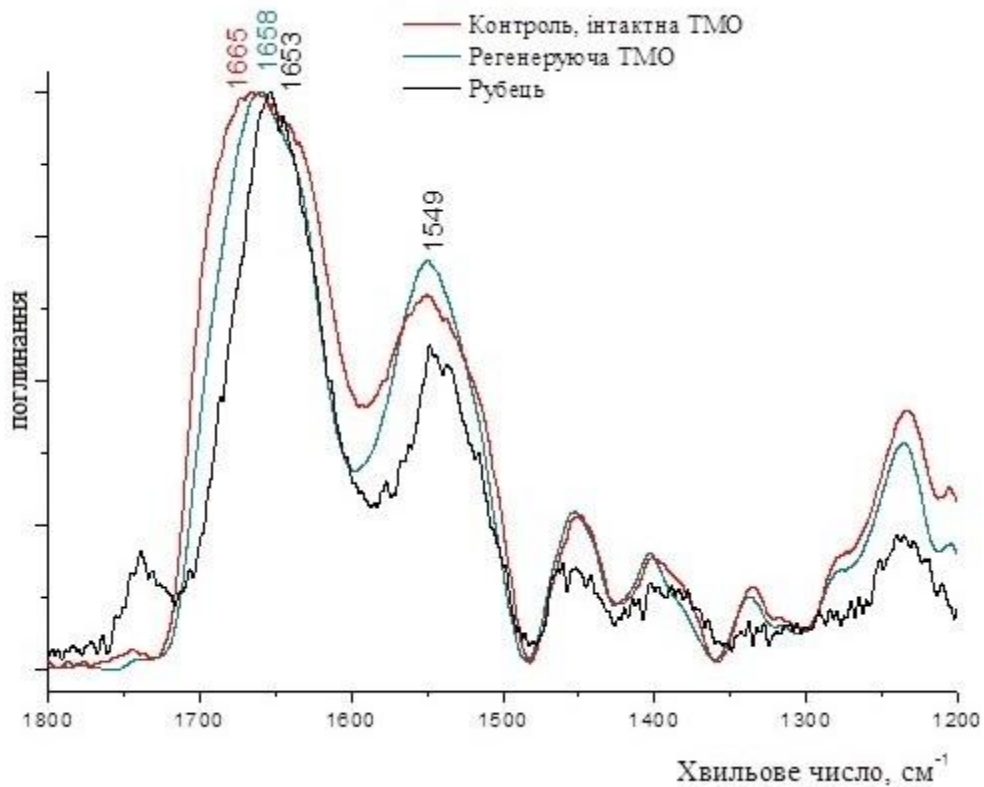


Рис. 5.3. FTIR спектри поглинання зразків тканин ТМО після аутопластики. Термін спостереження 3 тижні.

Через 6 тижнів після аутопластики виявлено смуги ІЧ спекту, які були характерні для рубцевої тканини, зокрема присутність інтенсивної смуги С=О в області 1742 см⁻¹, наявність додаткової моди СН деформаційних коливань на 1458 см⁻¹, а також менша інтенсивність смуги Амід ІІ порівняно з Амідом І, відносна інтенсивність АІ/АІІ складає 1,23 та 1,72 в контролі і регенерована ТМО відповідно. Тому можна стверджувати, що у ІЧ спектрах регенерованої ТМО після аутопластики реєструються характерні для рубцевої тканини смуги

коливань, що підтверджує утворення рубцевої тканини на більш пізніх стадіях загоєння.

У випадку застосування хітозаної плівки через три тижні після операції за спектральними характеристиками встановлено наявність залишків недеградованої хітозаної плівки (рис. 5.4). У зразку регенеруючої ТМО (зелена крива) чітко видно плече в області 1590 см^{-1} що безумовно належить плівці, однак разом з тим у цьому зразку є ознаки формування смуги Амід II на 1558 см^{-1} , що характерна для білкової молекули. Це може свідчити про початок біодеградації використаної плівки та напрямок до відновлення білкового волокнистого матриксу у сполучній тканині регенеруючої ТМО.

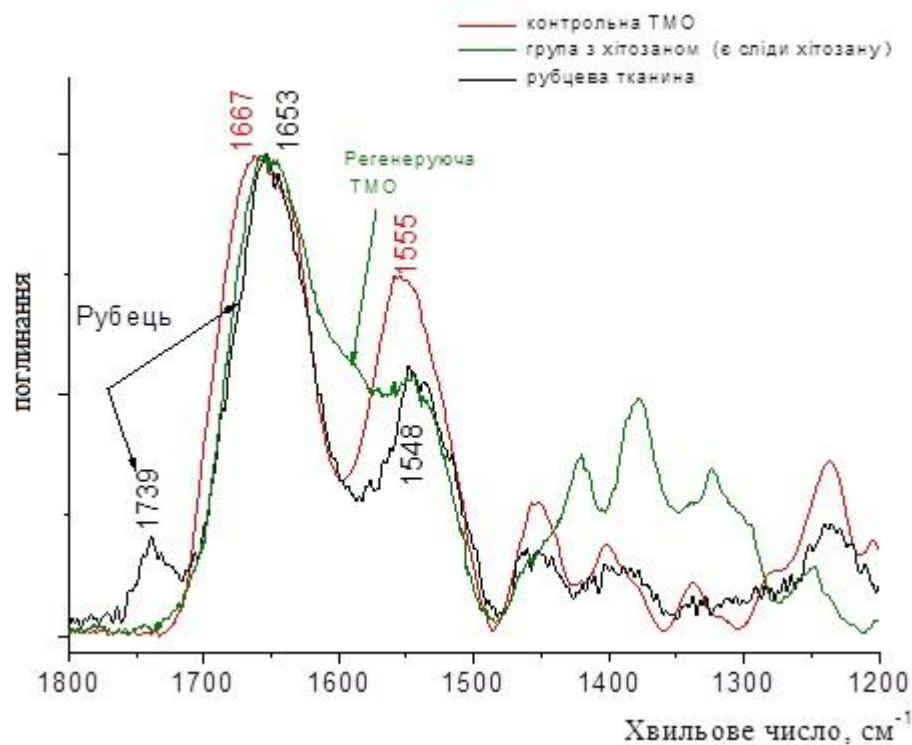


Рис. 5.4. FTIR спектри поглинання зразків тканин ТМО після застосування хітозаної плівки. Термін спостереження 3 тижні.

Через 6 тижнів після лікування процеси деградація імплантованої плівки суттєво посилились. В спектрах регенеруючої ТМО за всіма положеннями смуг поглинання бачимо повну відповідність спектру інтактної ТМО, що

свідчить про відновлення нормальної ТМО без будь яких ознак хітозанової плівки. Однак в зразку тканини відібраної в центрі травми все ще реєструються залишки недеградованої плівки, про що свідчать відмінності в області деформаційних СН коливань ($1400-1300\text{ см}^{-1}$), а також характерний для хітозану вигляд спектру в області $1200-900\text{ см}^{-1}$. Результати ІЧ спектроскопії підтверджують наявність залишків хітозану у регенерованій ТМО, як це було показано при гістологічному дослідженні (див. розділ 4).

Після застосування плівок хітозану з желатином за спектральними даними, аналогічно як і у групі з хітозаном, спостерігаються спектри імплантованої плівки на початковому етапі деградації. Спектр на 3 тижні спостереження є характерним для імплантованої хітозанової плівки (смуга в області 1587 см^{-1} , характерний вигляд спектру в області деформаційних СН та одинарних С-О, С-С зав'язків) з початковими ознаками формування білкових структур (смуга Амід II). Смуги у діапазоні $1544-1700\text{ см}^{-1}$ були подібними до ІЧ спектрів у групах з аутопластикою, желатином і рубцевою тканиною. Тобто смуга Амід II не є унікальною для жодної з цих груп і характеризує наявність білкових молекул у досліджуваному зразку.

Через 6 тижнів після проведеної операції спостерігаємо практично повне відновлення нормальної ТМО за положеннями та відносними інтенсивностями смуг поглинання в усьому спектральному діапазоні, окрім області $1100-950\text{ см}^{-1}$. Тому можна стверджувати, що у випадку додаткового застосування желатину процеси деградації імплантованої плівки проходять дещо швидше, однак процес ще не завершений повністю. При цьому характеристика ІЧ спектру наближається до спектру інтактної ТМО.

За результатами аналізу коливальних спектрів регенерованої ТМО у групі після застосування колагенових плівок встановлено, що через три тижні після дурупластики спектральні характеристики відновленої ТМО близькі до інтактної ТМО і відрізняються від ІЧ спектру рубцевої тканини у діапазоні смуги $1200-1300\text{ см}^{-1}$ (рис. 5.5). Можна припустити, що на цьому етапі використання колагенових плівок сприяє регенерації ТМО. Однак через 6

тижнів після застосування колагенової плівки вже чітко прослідковуються смуги ІЧ спектру, які характерні для рубцевої тканини. А саме: підвищена інтенсивність валентних коливань СН, наявність смуги в області 1741 см^{-1} , відсутність плеча на 1635 см^{-1} , що відповідає за потрійну спіраль, а також схожа на рубцеву тканину форма смуги в області $1100\text{-}1000\text{ см}^{-1}$. Тому можна стверджувати, що наявність тенденції утворення рубцевої тканини через 6 тижнів у випадку використання плівок на основі колагену.

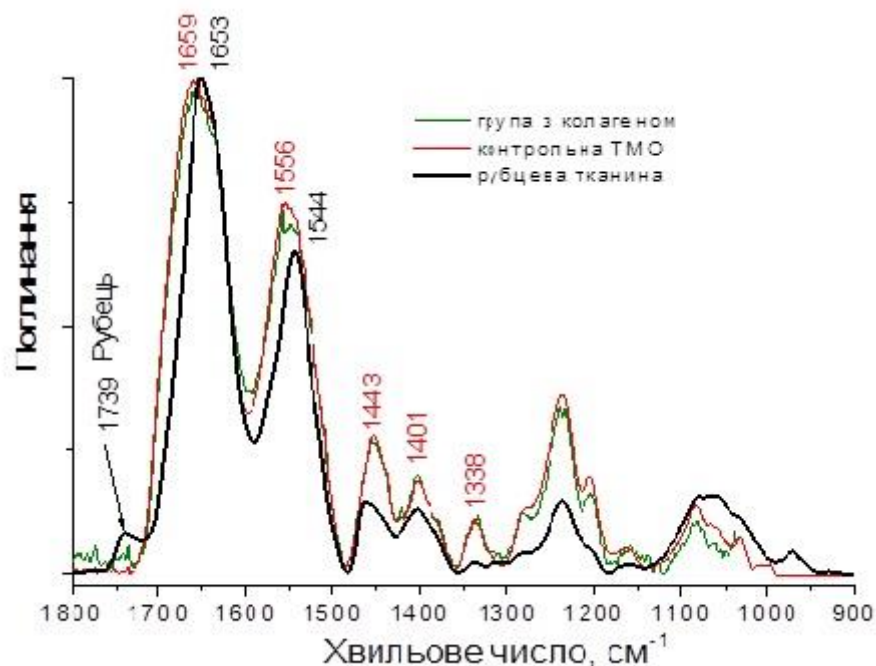


Рис. 5.5. FTIR спектри тканини регенеруючої ТМО після застосування колагенової плівки, рубцевої тканини та інтактної ТМО (контроль). Термін спостереження 3 тижні.

Після застосування колагену з желатином характеристика ІЧ спектру відновленої ТМО була подібною до ТМО інтактної групи тварин. На спектрах регенеруючої ТМО, які одержані на 3 тижні спостереження, не спостерігаємо жодних спектральних ознак, які можна було б віднести до рубцевої тканини (зокрема, у діапазоні смуг $1150\text{-}1340\text{ см}^{-1}$ і $1400\text{-}1460\text{ см}^{-1}$). Однак можна стверджувати, що півширина смуги Амід І в цьому випадку більша ніж у групі

аутопластики, що може свідчити про те, що у відновленій ТМО збільшилась кількість білкових молекул (колагену) як в результатів регенерації сполучної тканини, так і в результатів деградації колагенової плівки.

Через 6 тижнів після операції встановлено повне відновлення нормальної ТМО, без спектрів характерних для рубцевої тканини. Такі результати можуть свідчити про те, що плівка на основі колагену в сукупності з желатином дає максимально позитивний ефект та сприяє регенерації нормальної тканини ТМО і на пізніших етапах загоєння не виявляє жодних ознак рубцевої тканини.

Після дослідження якісних характеристик ІЧ спектрів було проведено кількісне вимірювання окремих смуг в спектрах. Для цього за допомогою програмного забезпечення вимірювали площу під смугами спектрів і загальну площу під кожним спектром, як інтегральну інтенсивність коливань у ІЧ спектрі. Результати статистичних досліджень наведено на рисунках 5.6 і 5.7. Так, середні значення площі під смугою поглинання $1800-800\text{ см}^{-1}$ у групі після аутопластики не відрізнялись від аналогічних значень у контрольній групі з інтактною ТМО, не залежно від терміну спостереження.

У групі із застосуванням хітозанової плівки встановлено достовірно більшу площу поглинання у досліджуваному спектрі на 3 тижні ($P < 0,01$), тоді як на 6 тижні дані були у межах статистичної погрішності щодо контрольних показників. Це свідчить про часткову резорбцію хітозану на 6 тижні після операції.

У смузі поглинання $1800-1480\text{ см}^{-1}$ не виявлено будь-яких відмінностей у ІЧ спектрах між контрольною та дослідними групами, не залежно від типу застосованих плівок та терміну спостереження.

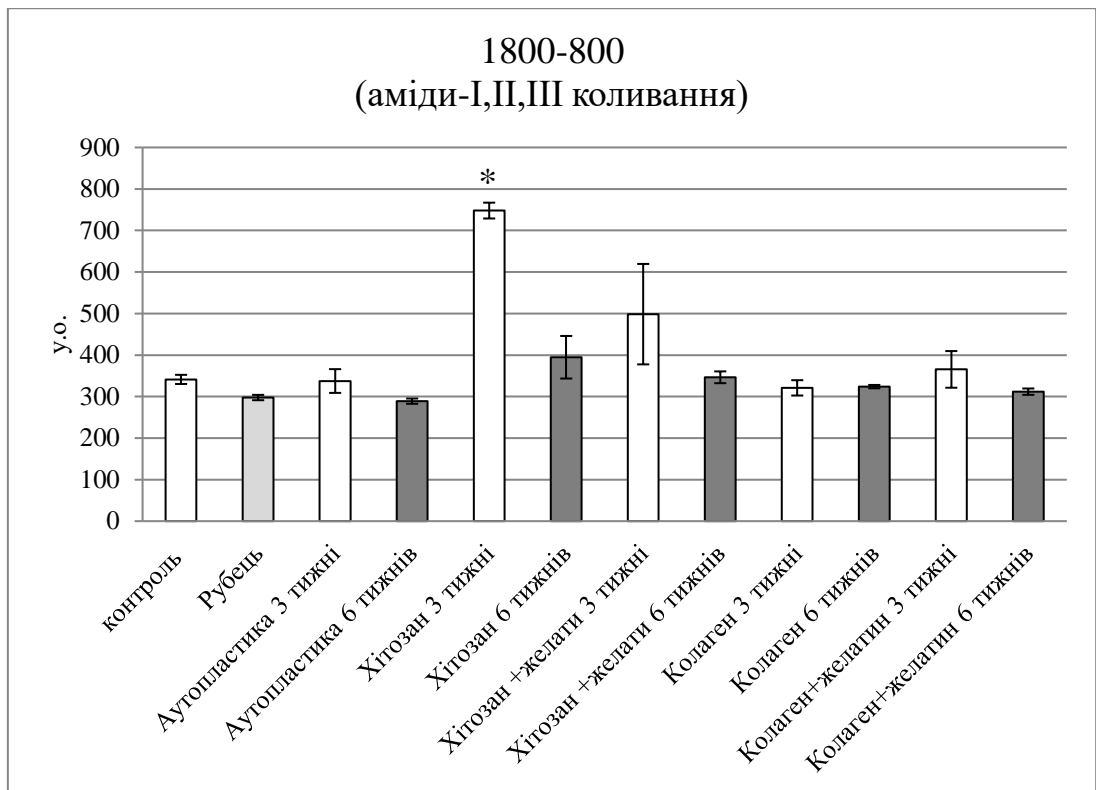


Рис. 5.6. Середня площа кривої ІЧ спектру під смугою поглинання 1800-800 cm^{-1} . Примітка: * $P < 0,05$ щодо контрольної групи

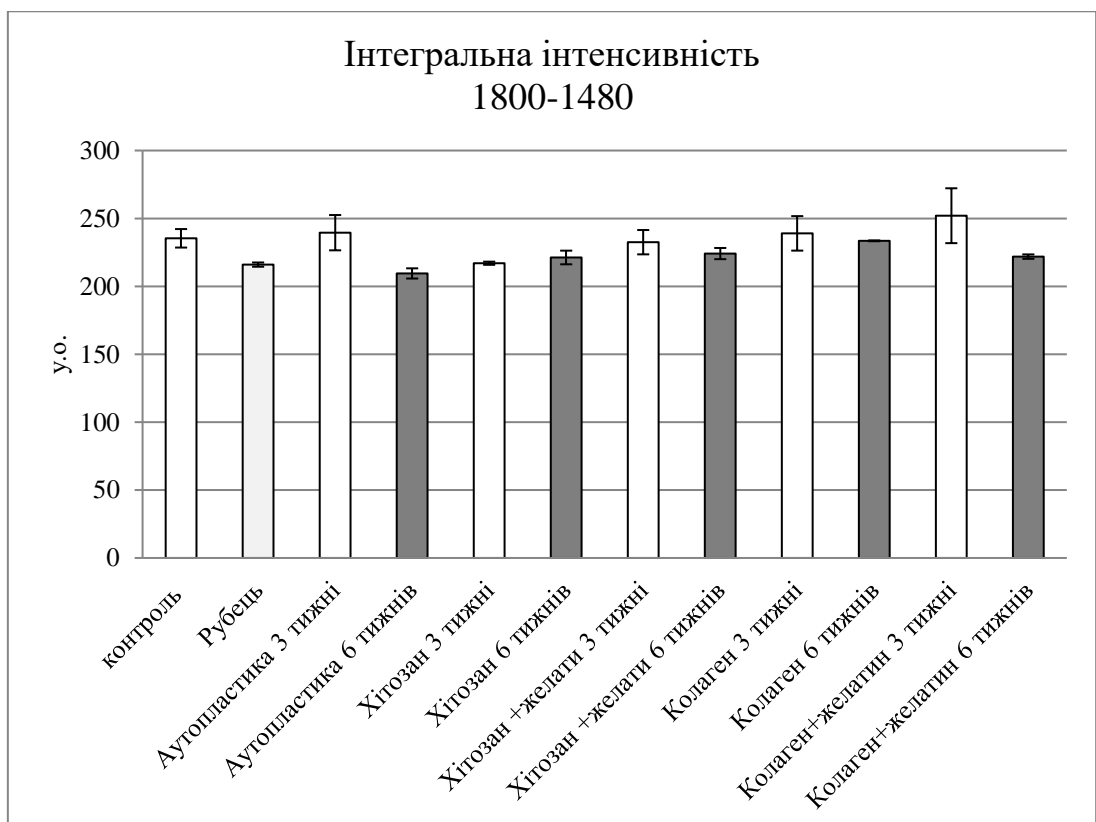


Рис. 5.7. Середня площа кривої ІЧ спектру під смугою поглинання 1800-1480 cm^{-1} .

Таблиця 5.1

Результати оцінки площі під кривою FTIR спектрів у контролі та після дурупластики

| Група | Діапазон інтенсивності у FTIR спектрі | | | |
|-----------------|---------------------------------------|-----------|---------------------------|------------|
| | 1800-1480 см ⁻¹ | | 1800-800 см ⁻¹ | |
| | 3 тижні | 6 тижнів | 3 тижні | 6 тижнів |
| Контроль | 235,3±6,8 | | 341,3±11,0 | |
| Рубець | 216,0±1,5 | | 297,7±6,4 | |
| Аутопластика | 239,5±12,9 | 209,5±3,7 | 337,5±28,5 | 289,0±63,3 |
| Хітозан | 217,0±1,1 | 221,2±5,0 | 748,0±19,0* | 394,7±51,2 |
| Хітозан+желатин | 232,5±8,9 | 224,1±4,1 | 498,5±120,9 | 346,5±14,2 |
| Колаген | 239,0±12,7 | 233,5±0,3 | 321,0±18,4 | 324,0±4,0 |
| Колаген+желатин | 252,0±20,2 | 221,8±1,6 | 365,5±44,1 | 311,8±7,6 |

Примітка: *P ≤ 0,05 щодо контролю

Висновок до розділу 5.

Методика ІЧ-спектроскопії дозволяє проконтролювати динаміку процесу регенерації тканин ТМО на різних етапах відновлення ТМО; за даними аналізу ІЧ-спектрів поглинання визначено спектральні маркери рубцевої тканини, регенеруючої ТМО та контрольної інтактної ТМО; показано, що рубцева тканини радикально відрізняється від тканин регенеруючої ТМО в усіх групах, в тому числі і в групі аутопластики. Це дозволяє достовірно відрізнити рубцеву тканину від інших досліджуваних тканин та полімерних плівок; найбільш показові ефекти отримано в групах з хітозаном, оскільки хітозан має смуги поглинання, відмінні від смуг поглинання білкових молекул (желатину і колагену, та ТМО в цілому), тому присутність плівок на основі хітозану в зразках тканин можна безпомилково ідентифікувати за ІЧ спектрами; хітозанова плівка за 6 тижнів остаточно не

деградує, її залишки чітко ідентифікуються за даними ІЧ спектроскопії. Додаткове використання желатину прискорює процес деградації плівки хітозану і сприяє нормальному загоєнню травми. Застосування колагенових плівок дає позитивний ефект на ранніх стадіях загоєння, однак в подальшому спостерігається тенденція до утворення рубцевої тканини. Використання желатинової плівки паралельно з колагеновою сприяє повному відновленню ТМО без ознак утворення рубця.

Ізольовані FTIR спектри ТМО кожної групи наведено у додатку А. Дані оцінки площі під спектрами у досліджуваних діапазонах інтенсивності наведено у таблиці 5.1.

РОЗДІЛ 6

КОРЕЛЯЦІЙНИЙ АНАЛІЗ

Методом кореляційного аналізу було досліджено зв'язок між кількісними показниками, які були одержані з ТМО гістологічними та фізичними методами дослідження. Застосовано метод лінійної кореляції Пірсона для виявлення сили залежності між станом регенованої ТМО за мікроскопічними ознаками (згідно 7-ознакової шкали) та товщини ТМО (за результатами морфометрії). Як показано у таблиці 6.1, у групі аутопластики, хітозану і колагену на 21 день експерименту встановлено сильний колеряційний зв'язок між порівнюваними показниками, що вказує на пряму залежність між ними. У групі комбінації хітозану або колагену з желатином статистично значимо сильну кореляцію виявлено на 42 день спостереження.

Таблиця 6.1

Результати кореляційного аналізу між значеннями 7-ознакової шкали мікроскопічної оцінки ТМО і товщиною ТМО.

| Група | 3 тижні | | 6 тижнів | |
|-----------------|-------------|------|-------------|-------------|
| | г | р | г | р |
| Аутопластика- | 0,92 | 0,03 | 0,57 | 0,31 |
| Хітозан | 0,98 | 0,00 | 0,78 | 0,12 |
| Хітозан+желатин | 0,73 | 0,16 | 0,95 | 0,01 |
| Колаген | 0,89 | 0,04 | 0,62 | 0,26 |
| Колаген+желатин | 0,58 | 0,30 | 0,96 | 0,01 |

Примітка: жирним шрифтом виділено статистично достовірні результати

Кореляційний аналіз залежності рівня флюоресценції колагену при збудженні $\lambda_{em} = 488$ (зелений) та $\lambda_{em} = 543$ (червоний) засвідчив сильну залежність між цими денсітометричними показниками регенованої ТМО на

6 тижні експерименту, окрім результатів у групі колагену з желатином (статистично вірогідний зв'язок виявлено на 3 тижні) (табл. 6.3). Ці результати є свідченням прямої залежності між показниками аутофлюоресценції колагену за умов збудження лазером з $\lambda_{em}=488$ та $\lambda_{em}=543$, але на основі власних результатів конфокальної мікроскопії (див. розділ 4) можна стверджувати, що флюоресценція при збудженні колагенової молекули лазером з $\lambda_{em}=488$ (зелений) характеризується більшою інтенсивністю і тому має перевагу при денсіометричній оцінці новоутвореного колагену у регенованій ТМО.

Таблиця 6.2

Результати кореляційного аналізу між інтенсивністю аутофлюоресценції колагену при $\lambda_{em}=488$ (зелений) та $\lambda_{em}=543$ (червоний)

| Група | 3 тижні | | 6 тижнів | |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | r | p | r | p |
| Аутопластика- | 0,90 | 0,10 | 1,00 | 0,01 |
| Хітозан | 0,90 | 0,10 | 1,00 | 0,02 |
| Хітозан+желатин | 0,89 | 0,11 | 1,00 | 0,01 |
| Колаген | 0,56 | 0,44 | 0,93 | 0,02 |
| Колаген+желатин | 1,00 | 0,05 | -0,04 | 0,96 |

Примітка: жирним шрифтом виділено статистично достовірні результати

Наступним етапом статистичного дослідження було виявлення зв'язку між результатами денсіометрії та мікроскопічними показниками регенованої ТМО (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

Результати кореляційного аналізу між інтенсивністю аутофлюоресценції колагену при $\lambda_{em}=488$ (зелений) та $\lambda_{em}=543$ (червоний) щодо балів за 7-означовою шкалою та товщиною ТМО.

| Група/довжина хвилі | | Шкала | | | | Товщина ТМО | | | |
|---------------------|-------------------------------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|-------------|
| | | 3 тижні | | 6 тижнів | | 3 тижні | | 6 тижнів | |
| | | r | p | r | p | r | p | r | p |
| Аутопластика- | $\lambda_{em}=488$ (зелений) | 0,99 | 0,01 | -0,12 | 0,92 | 0,95 | 0,05 | 0,96 | 0,18 |
| | $\lambda_{em}=543$ (червоний) | 0,83 | 0,17 | -0,10 | 0,93 | 0,78 | 0,22 | 0,96 | 0,19 |
| Хітозан | $\lambda_{em}=488$ (зелений) | 1,00 | 0,00 | 0,89 | 0,31 | 0,98 | 0,00 | 0,78 | 0,12 |
| | $\lambda_{em}=543$ (червоний) | 0,90 | 0,10 | 0,87 | 0,33 | 0,78 | 0,22 | 1,00 | 0,06 |
| Хітозан+желатин | $\lambda_{em}=488$ (зелений) | 1,00 | 0,00 | 0,95 | 0,19 | 0,69 | 0,31 | 0,98 | 0,13 |
| | $\lambda_{em}=543$ (червоний) | 0,91 | 0,09 | 0,95 | 0,20 | 0,94 | 0,06 | 0,98 | 0,14 |
| Колаген | $\lambda_{em}=488$ (зелений) | 0,89 | 0,04 | 0,62 | 0,26 | 0,82 | 0,18 | 0,90 | 0,04 |
| | $\lambda_{em}=543$ (червоний) | 0,56 | 0,44 | 0,93 | 0,02 | 0,53 | 0,47 | 0,89 | 0,05 |
| Колаген+желатин | $\lambda_{em}=488$ (зелений) | 0,98 | 0,14 | 0,80 | 0,20 | 1,00 | 0,02 | -0,07 | 0,93 |
| | $\lambda_{em}=543$ (червоний) | 0,96 | 0,19 | -0,03 | 0,97 | 1,00 | 0,02 | -0,07 | 0,93 |

Примітка: жирним шрифтом виділено статистично значущі результати

З наведених у таблиці 6.3 результатів кореляційного аналізу чітко підтверджується прямий зв'язок між характеристиками регенерованої ТМО (бал шкали мікроскопічної оцінки ТМО та товщина ТМО) та інтенсивністю аутофлюоресценції колагену у ТМО при збудження лазером з $\lambda_{em} = 488$ (зелений). Сильну кореляцію встановлено у групі аутопластики і хітозану на 3 та 6 тижні, хітозану з желатином і колагену на 3 тижні, а колагену з желатином на 6 тижні. Відмічено позитивну тенденцію у залежності між товщиною регенерованої ТМО та інтенсивністю аутофлюоресценції колагену у ТМО при збудженні $\lambda_{em} = 543$ (червоний), наприклад, на 3 тижні у групі хітозану з желатином ($r=0,94$; $p=0,06$), колагену з желатином ($r=1,00$; $p=0,02$), на 6 тижні у групі колагену ($r=0,89$; $p=0,05$). У групі з застосуванням колагенової плівки достовірну сильну залежність або виражену тенденцію виявлено на 6 тижні між значеннями денсіометричного аналізу люмінесцентного зображення колагену у ТМО та балом за шкалою мікроскопічної оцінки регенерату ($r=0,93$; $p=0,02$) та його товщини (при $\lambda_{em} = 488$ $r=0,90$; $p=0,04$, при $\lambda_{em} = 543$ $r=0,89$; $p=0,05$).

Висновок до розділу 6.

Одержані результати кореляційного аналізу свідчать про те, що кількісні показники регенерованої ТМО, які були отримані мікроскопічними методами, а саме гістологічним, морфометричним та методом конфокальної мікроскопії, мають лінійну залежність, яку можна оцінити за критерієм Пірсона. Як показали власні результати, у більшості порівнянь (у межах кожної дослідної групи) інтенсивність аутофлюоресценції колагену достовірно або із значною позитивною тенденцією корелює з товщиною ТМО. Результати досліджень вказують на те, що метод конфокальної мікроскопії з наступним денсіометричним оцінюванням є методом вибору у дослідженні інтенсивності утворення колагену у регенерованій ТМО.

ОБГОВОРЕННЯ І ПІДСУМКИ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Розробка нових ефективних матеріалів для пластики ТМО і нових хірургічних методик їх застосування є актуальною проблемою, розв'язання якої має на меті дві основні задачі: по-перше - повноцінне відновлення герметизації ТМО (з формуванням гістоархітекtonіки тканини, максимально близької до нормальної або інтактної) і по-друге - зменшення утворення небажаної рубцево-спайкової тканини. В результаті проведеного аналізу літературних даних у якості основних матеріалів для пластики ТМО було обрано плівкові матеріали на основі колагену і хітозану. Ці матеріали покликані служити матриксом для регенерації ТМО, спочатку беручи на себе бар'єрну і захисну функції і потім слугують каркасом (основою) для новоутворених тканин. При цьому сам каркас (або ж скафолд) поступово зникає внаслідок біодеградації і заміщується новоутвореними нативними тканинами, які повноцінно герметизують субдуральний простір, що і підтверджено в нашому дослідженні. Саме хороша здатність даних матеріалів до біодеградації вкупі з біосумісністю робить ці матеріали найбільш близькими до поняття «ідеального замітника» ТМО. Натомість плівки на основі желатину обрані нами у якості додаткових (допоміжних) матеріалів і їхня функція полягає лише у створенні тимчасового механічного бар'єру між шарами операційної рани. Такий бар'єр порівняно швидко зникає через біодеградацію і має на меті зменшувати утворення небажаної рубцево-спайкової тканини (в даному випадку – між шкірою і апоневрозом з одного боку і підлеглою ТМО і тканиною мозку – з іншого) . Однак за нашими результатами виявлено, що застосування желатину сприяє формуванню пухкої сполучної тканини в місці укладання (хоча і без формування виражених злук). З іншого боку застосування желатину чітко модифікує вплив основних матеріалів – колагену і хітозану. За даними макроскопічного дослідження він сприяє утворенню виражених злук в зоні операції при застосуванні з

колагеном. А за даними мікроскопії – суттєво змінює гістоархітекtonіку власне регенерату ТМО, як при застосуванні колагену, так і хітозану (детальніше - див. нижче).

Загалом, для усіх досліджуваних груп було характерним: відсутність виражених запальних змін в зоні операції як макроскопічно, так і за даними гістологічних методів дослідження; відсутність ліквореї (герметизація субдурального простору підтверджена світлооптичною мікроскопією); у всіх оперованих тварин операційна рана загоїлася *per gratum* і тварини добре перенесли операцію, що свідчить про гарну біосумісність обраних нами матеріалів. Відзначено, що у всіх оперованих тварин в зоні операції формуються рубцево-спайкові тяжі (злуки) ступінь вираженості яких і структурні характеристики залежать від застосованого пластичного матеріалу (або матеріалів). Аналогічно тканини регенерованої ТМО в зоні операції також мали свої конкретні і характерні тільки для певної досліджуваної групи особливості.

Група №1 (аутопластика). За даними морфологічного гістологічного дослідження – напівкількісна оцінка за 7 ознаками – найбільш інтенсивні процеси відновлення тканин відбуваються саме в цій досліджуваній групі. Одночасно з процесами відновлення нормальної структури ТМО відбуваються процеси утворення грануляційної (рубцево-спайкової) тканини. Це підтверджено гістологічними і макроскопічними методами і виявлено, що злуки в проекції трепанаційного вікна і в зоні операції (макроскопічно і мікроскопічно) є найбільш вираженими саме в цій групі. Товщина утвореного регенерату ТМО корелює з інтенсивністю аутофлюорисценції - за даними конфокальної мікроскопії. Дані ІЧ спектроскопії підтверджують формування нормальної структури ТМО на початковій стадії дослідження і наявність помітного рубцювання в товщині регенерату ТМО у більш пізній строк.

Звертає на себе увагу той факт, що процеси нормальної регенерації і рубцево-спайкові процеси в цілому відбулися за перші три тижні і майже не демонстрували динаміки на шостому тижні (див.рис.. 3.16. і 4.38.). Ще однією

особливістю даної досліджуваної групи є наявність злук безпосередньо в проекції трепанаційного вікна, чого не відзначено у жодної тварини в інших групах.

Група №2 (пластика хітозаном). При використанні у якості матричного матеріалу плівок на основі хітозану виявлено, що регенерація ТМО відбувається в основному шляхом формування регенерату, який за морфологічними ознаками близький до нормальної ТМО, з незначною кількістю рубцевої сполучної тканини. Це відображається як на макроскопічному, так і на мікроскопічному рівнях: числові значення модифікованої шкали STRYKER для цієї групи є найменшими; а гістологічно виявлено, що безпосередньо сам плівковий матеріал добре взаємодіє з оточуючими тканинами – відбувається його поступова біодеградація і утворення сполучної тканини, морфологічно найбільш близької до інтактної ТМО. Дуже значимою на наш погляд особливістю є той факт, що регенеруюча тканина формується на обох (верхній і нижній) поверхнях хітозанової матричної плівки. Тобто, крім щойно зазначених позитивних ефектів, на даному матриці здатний формуватися регенерат цілком подібний до нормальної ТМО, з нормальною двошаровою структурою. Завдяки такій особливості хітозану сформований регенерат ТМО мав найбільшу товщину серед усіх досліджуваних груп, її незначно перевершувала лише група хітозан з желатином (див. рис.4.37), хоча інтенсивність репаративних процесів в досліджуваних групах (крім аутопластики) є приблизно однаковою (див.рис. 4.38.). Конфокальна мікроскопія дає можливість кількісно оцінити кількість колагенових волокон в позаклітинному матриці; виявлено їх відносно невелику кількість, але враховуючи, що клітинні форми в регенераті це переважно молоді фібробласти – можна зробити висновок про те, що репаративні процеси будуть тривати і кількість волокон колагену буде збільшуватися.

Результати застосування в дослідженні ІЧ спектроскопії для даної групи є дуже показовими: на молекулярному рівні виявлено, що відбувається

заміщення молекул хітозану (полісахариду) білковими молекулами новоутвореного колагену. При цьому ідентифіковано молекулярні ознаки, характерні для нормальної тканини і окремо для рубцевої тканини. Таким чином ІЧ спектроскопія уточнює і підтверджує факт біодеградації хітозану з формуванням на місці біополімерної плівки регенерату без виражених ознак рубцювання.

Група №3 (пластика хітозаном і желатином). Загалом дана досліджувана група мала характер регенерату дуже подібний до групи №2 за даними усіх методів дослідження, помітною особливістю є більш пухке, «рихле» розташування новоутворених волокон колагену. Це демонструється даними як світлооптичної, так і конфокальної мікроскопії (рис.4.28., 4.39. і 4.40). Так само характеристика рубцево-спайкових утворень теж була подібною, але мала певні особливості: поєднання хітозану і желатину лише незначно збільшувало кількість злук і досторіно впливало на збільшення товщини регенерату, порівняно з групою хітозану.

Група №4 (пластика колагеном). При пластиці колагеновою плівкою репараційні процеси в тканині ТМО за характером інтенсивності були подібними до процесів в групах №2 і №3 і поступалися групі №1 (за морфологічними ознаками були менш інтенсивні). За даними світлооптичної мікроскопії в цій групі було виявлено найбільшу щільність колагенових пучків (що підтверджується даними конфокальної мікроскопії), клітинні елементи регенерату – це в основному зрілі фіброцити. За даними морфологічних методів дослідження рубцево – спайковий процес в зоні операції виражений помірно, а в товщині самого регенерату ТМО за даними ІЧ спектроскопії на початковій стадії експерименту чітких рубцевих змін не виявлено, у пізній строк – виявлено безсумнівні ознаки рубцевих змін тканини регенерату.

Група №5 (пластика колагеном і желатином). В даній досліджуваній групі процеси формування нормальної відновленої тканини ТМО були подібними до попередньої групи (див.рис. 4.37. і 4.38.). Особливістю є формування особливої гістоархітектоніки регенерату, яка безумовно

спричинена дією желатину: сформована тканина мала вигляд ніжної і пухкої сполучної тканини, а пучки новоутворених волокон мали характерне лише для цієї групи «мереживне» розташування (рис. 4.35. і 4.36., рис. 4.39. і 4.40.). Рубцево - спайкові процеси в даній групі також мають особливі відмінності: макроскопічно за модифікованою шкалою STRYKER рубцево-спайкові тяжі були найбільш виражені з усіх досліджуваних груп, де застосовувалися біополімери, і за цим показником поступалася лише групі аутопластики. Водночас за даними ІЧ-спектроскопії в товщині регенерату ознак рубцювання виявлено не було ні на 3, ні на 6 тижднів експерименту. Тобто спектральні особливості тканин регенерату є найбільш близькими до контрольної ТМО саме в цій досліджуваній групі.

Таким чином можна зробити висновок про ефективність усіх застосованих в експерименті біополімерних біодеградуючих плівкових матеріалів. Тобто проблема пластичного закриття дефекту ТМО може бути успішно вирішена з їх допомогою. Їх застосування є безпечним, вони слугують надійним засобом для герметизації субдурального простору, не викликають небажаних надмірних запальних реакцій. Показано, що інтенсивність процесів регенерації, товщина сформованої новоутвореної ТМО і її гістоархітектоніка, молекулярні властивості чітко залежать від застосованого біополімерного матеріалу або їх комбінацій.

Результати даного експериментального дослідження переконливо свідчать про перспективність застосування біодеградуючих біополімерів для пластики ТМО, що є не тільки альтернативою пластиці аутологічними тканинами, але і має певні переваги: в усіх досліджуваних групах вираженість злук достовірно була меншою, порівняно до групи аутопластики. В групах хітозан і хітозан-желатин формується новоутворена ТМО з найбільшою товщиною і двошаровою структурою, подібною до інтактної ТМО, що є безсумнівною перевагою цих матеріалів. Ще однією перевагою в групі хітозан-желатин є значна кількість новоутворених колагенових волокон, яка співставна з групою колагену (за даними конфокальної мікроскопії). В той же

час група колаген-желатин теж має окрему перевагу відносно усіх інших досліджуваних груп: молекулярні характеристики регенерату є найбільш близькими до інтактної ТМО.

ВИСНОВКИ

1. Вирішене нове наукове завдання: розроблено нову експериментальну модель для оцінки регенерації ТМО при важкій проникаючій ЧМТ і розроблений новий спосіб пластики дефектів ТМО на цій моделі із застосуванням біодеградуючих біополімерних матеріалів. Застосування біодеградуючих матеріалів на основі колагену, хітозану і желатину є ефективним, як для відновлення цілісності ТМО, так і для зменшення утворення рубцево-спайкової тканини в зоні операції.
2. Доведено, що в зоні операції в терміни 3 тижні і 6 тижнів одночасно з процесами регенерації ТМО розвиваються рубцево-спайкові тяжі(злуки), ступінь вираженості яких різна в кожній групі піддослідних тварин. Найбільш виражені рубцево-спайкові злуки мали місце в групах №1 аутопластика ($3,6 \pm 0,2$ бали) і №5 колаген-желатин ($2,6 \pm 0,4$ бали) статистично значуще відрізняючись від інших досліджуваних груп.
3. Інтенсивність регенерації (за 7-ми ознаковою шкалою) найвища в групі аутопластики, а в інших групах була приблизно однаковою (при аутопластиці досягаючи на 42 день $18,8 \pm 1,3$ балів, статистично значуще відрізняючись від інших груп піддослідних тварин і від групи контролю).
4. Товщина регенерованої ТМО була найбільшою (термін спостереження 6 тижнів) в групах №2 хітозану ($407,1 \pm 48,8$ мкм) і №3 хітозан-желатин ($529,7 \pm 68,0$ мкм), статистично значуще відрізняючись від групи аутопластики ($272,6 \pm 25,3$ мкм) і групи контролю ($91,6 \pm 7,5$ мкм).
5. Найбільша кількість новоутворених колагенових волокон в зоні операції (за інтенсивністю аутофлюорисценції) має місце в групах №4 (колаген) і №3

(хітозан з желатином) (інтенсивність флюоресценції $36,7 \pm 0,59$ у.о. в групі №4 (колаген) і $30,9 \pm 3,59$ у.о. в групі №5 (хітозан-желатин), при збудженні лазером зеленого спектру (термін спостереження 6 тижнів) – за даними конфокальної мікроскопії.

6. В групах №2 і №3 (хітозан і хітозан-желатин) підтверджено біодеградацію хітозану з одночасним заміщенням імпланту новоутвореним колагеном (тобто відновленням ТМО) - інтенсивність поглинання в діапазоні частот $1800-800$ см-1 в групі №2 хітозану змінювалася з $748,0 \pm 19,0$ у.о. на 3 тижні до $394,7 \pm 51,2$ у.о.- на 6 тижні спостереження - зменшення внеску хітозану в поглинання для даного діапазону; в групі №5 (колаген-желатин) спектрограми регенеруючої ТМО найбільш подібні до контрольної ТМО на 6 тиждень спостереження,- за даними ІЧ спектроскопії.

7. Доведено, що плівковий матеріал на основі желатину має здатність змінювати дію матричних матеріалів на регенерацію ТМО.

Поєднання хітозану і желатину незначно збільшувало кількість злук (група №2 хітозан $1,5 \pm 0,2$ балів і $1,6 \pm 0,2$ балів для групи №3 хітозан-желатин) і досторіно впливало на збільшення товщини регенерату, порівняно з групою №2 хітозану $407,1 \pm 48,8$ мкм і $529,7 \pm 68,0$ мкм для групи №3 (хітозан-желатин). В групі №5 (колагену-желатин) виразність рубцево-спайкової тканини була більшою відносно групи №4 (колаген) ($2,6 \pm 0,4$ і $1,8 \pm 0,4$ бали відповідно). Інтенсивність процесів регенерації в групі №4 подібна до групи №5 (групи колагену) (на 6 тиждень дослідження $14,4 \pm 1,5$ бали для групи колагену і $13,2 \pm 2,1$ бали для групи колаген-желатин). Морфометричні показники регенерованої ТМО між цими групами не виявили статистично значимої різниці ($205,2 \pm 25,3$ мкм для колагену і $270,4 \pm 33,8$ мкм для колаген-желатину, на 6 тиждень дослідження).

Група №3 (хітозан-желатин) порівняно до групи №2 (хітозан) мала статистично значуще більшу кількість новоутворених колагенових волокон в зеленому спектрі $13,5 \pm 3,26$ у.о. і $7,5 \pm 2,01$ у.о. відповідно- на 3 тиждень спостереження; в зеленому спектрі $30,9 \pm 3,59$ у.о. (хітозан-желатин) і $12,9 \pm 0,07$ (хітозан) відповідно, на 6 тиждень спостереження - за даними конфокальної мікроскопії.

Практичні рекомендації.

1. Розроблено новий експериментальний підхід до відновлення цілісності ТМО після пенетруючої ЧМТ і декомпресивної краніектомії шляхом застосування біополімерних біодеградуючих плівкових матеріалів на основі колагену, хітозану і желатину.

Відновлення цілісності ТМО за допомогою біодеградуючих плівкових матеріалів пропонується для вивчення впливу зазначених біополімерів на регенерацію сполучної тканини.

2. Оцінку вираженості рубцево-спайкових процесів в зоні трепанації пропонується визначати за модифікованою шкалою STRYKER.

3. Оцінку інтенсивності регенерації ушкодженої ТМО в зоні операції рекомендується визначати за запропонованою 7-ми ознаковою шкалою.

4. Кількісну оцінку фіброзного матриксу регенерованої твердої мозкової оболони пропонується оцінювати методом конфокальної мікроскопії, за рівнем аутофлюорисценції колагенових волокон.

5. Показники ІЧ-спектроскопії пропонується використовувати для якісної оцінки біодеградації імплантованих плівок, а також для якісної оцінки молекулярних характеристик регенерованої тканини ТМО.

6. Подальша розробка методів пластики ТМО за допомогою біополімерних біодеградуючих плівкових матеріалів дозволяє рекомендувати обрані матеріали для клінічного випробування і впровадження в клінічну практику. В перспективі це може покращити результати лікування пацієнтів з важкими проникаючими ЧМТ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. MacEwan MR Comparative analysis of a fully-synthetic nanofabricated dura substitute and bovine collagen dura substitute in a large animal model of dural repair/ MR MacEwan, T Kovacs, J Osbun, Ray Wilson Z// *Interdisciplinary Neurosurgery* 2018 September (13) 145–150. doi: 10.1016/j.inat.2018.05.001.4.
2. Kinaci A, Algra A, Heuts S, O'Donnell D, van der Zwan A, van Doormaal T. Effectiveness of Dural Sealants in Prevention of Cerebrospinal Fluid Leakage After Craniotomy: A Systematic Review. *World Neurosurg.* 2018 Oct;118:368-376.e1. doi: 10.1016/j.wneu.2018.06.196. Epub 2018 Jun 30. PMID: 29969744.
3. Montano N, Giordano M, Caccavella VM, Ioannoni E, Polli FM, Papacci F, Olivi A. Hemopatch® with fibrin glue as a dural sealant in cranial and spinal surgery. A technical note with a review of the literature. *J Clin Neurosci.* 2020 Sep;79:144-147. doi: 10.1016/j.jocn.2020.07.011. Epub 2020 Aug 5. PMID: 33070884.
4. Tang R, Mao S, Li D, Ye H, Zhang W. Treatment and Outcomes of Iatrogenic Cerebrospinal Fluid Leak Caused by Different Surgical Procedures. *World Neurosurg.* 2020 Nov;143:e667-e675. doi: 10.1016/j.wneu.2020.08.069. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32805467.
5. Fang C, Zhu T, Zhang P, Xia L, Sun C. Risk factors of neurosurgical site infection after craniotomy: A systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control.* 2017 Nov 1;45(11):e123-e134. doi: 10.1016/j.ajic.2017.06.009. Epub 2017 Jul 24. PMID: 28751035.
6. Khatiwala RV, Shastri KS, Peris-Celda M, Kenning T, Pinheiro-Neto CD. Endoscopic Endonasal Reconstruction of High-Flow Cerebrospinal Fluid Leak with Fascia Lata "Button" Graft and Nasoseptal Flap: Surgical Technique and Case Series. *J Neurol Surg B Skull Base.* 2020 Dec;81(6):645-650. doi: 10.1055/s-0039-1693124. Epub 2019 Jul 31. PMID: 33381368; PMCID: PMC7755515.
7. Hawryluk G et al. Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury: 2020 Update of the Decompressive Craniectomy Recommendations.

Neurosurgery. 2020 Sep 1;87(3):427-434. doi: 10.1093/neuros/nyaa278. PMID: 32761068; PMCID: PMC7426189.

8. Hutchinson PJ, et al. Consensus statement from the International Consensus Meeting on the Role of Decompressive Craniectomy in the Management of Traumatic Brain Injury : Consensus statement. *Acta Neurochir (Wien)*. 2019 Jul;161(7):1261-1274. doi: 10.1007/s00701-019-03936-y. Epub 2019 May 28. PMID: 31134383; PMCID: PMC6581926.

9. Sun H, et al. Large retrospective study of artificial dura substitute in patients with traumatic brain injury undergo decompressive craniectomy. *Brain Behav*. 2018 Mar 25;8(5):e00907. doi: 10.1002/brb3.907. PMID: 29761002; PMCID: PMC5943738.

10. Liu W et al. *In vivo* Evaluation of Fibrous Collagen Dura Substitutes. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Feb 18;9:628129. doi: 10.3389/fbioe.2021.628129. PMID: 33681163; PMCID: PMC7930396.

11. Sahuquillo J, Dennis JA. Decompressive craniectomy for the treatment of high intracranial pressure in closed traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Dec 31;12(12):CD003983. doi: 10.1002/14651858.CD003983.pub3. PMID: 31887790; PMCID: PMC6953357.

12. Goedemans T. et al. Outcome After Decompressive Craniectomy for Middle Cerebral Artery Infarction: Timing of the Intervention. *Neurosurgery*. 2020 Mar 1;86(3):E318-E325. doi: 10.1093/neuros/nyz522. PMID: 31943069; PMCID: PMC7061200.

13. Reinink H, et al. Surgical Decompression for Space-Occupying Hemispheric Infarction: A Systematic Review and Individual Patient Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol*. 2021 Feb 1;78(2):208-216. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.3745. PMID: 33044488; PMCID: PMC7551237.

14. Janatpour ZC, Szuflika NS, Spinelli J, Coughlin DJ, Rosenfeld JV, Bell RS. Inadequate Decompressive Craniectomy Following a Wartime Traumatic Brain Injury - An Illustrative Case of Why Size Matters. *Mil Med*. 2019 Dec 1;184(11-12):929-933. doi: 10.1093/milmed/usz008. PMID: 30793187.

15. Shackelford SA, Del Junco DJ, Reade MC, Bell R, Becker T, Gurney J, McCafferty R, Marion DW. Association of time to craniectomy with survival in patients with severe combat-related brain injury. *Neurosurg Focus*. 2018 Dec 1;45(6):E2. doi: 10.3171/2018.9.FOCUS18404. PMID: 30544314.

16. Сірко А.Г., Пилипенко М.М., Гук А.П., Комок О.А. Бойова травма та поранення голови, шиї та хребта. Сучасні принципи невідкладної допомоги. Навчальний посібник. За редакцією академіка НАМН України, д-ра мед.н., проф.Є.Г.Педаченко. – К. Задруга, 2020. – 199с.).

17. Di G et al. Postoperative complications influencing the long-term outcome of head-injured patients after decompressive craniectomy. *Brain Behav*. 2019 Jan;9(1):e01179. doi: 10.1002/brb3.1179. Epub 2018 Dec 4. PMID: 30511376; PMCID: PMC6346640.

18. Honeybul S, Ho KM, Gillett GR. Long-term outcome following decompressive craniectomy: an inconvenient truth? *Curr Opin Crit Care*. 2018 Apr;24(2):97-104. doi: 10.1097/MCC.0000000000000481. PMID: 29369063.

19. Giese H, Meyer J, Unterberg A, Beynon C. Long-term complications and implant survival rates after cranioplastic surgery: a single-center study of 392 patients. *Neurosurg Rev*. 2021 Jun;44(3):1755-1763. doi: 10.1007/s10143-020-01374-4. Epub 2020 Aug 26. PMID: 32844249; PMCID: PMC8121727.

20. Maehara N, Morioka T, Shimogawa T, Suzuki SO, Mizoguchi M, Haga S. Massive Ossification with Hematopoietic Marrow on Both Surfaces of the Expanded Polytetrafluoroethylene Artificial Dura Mater. *World Neurosurg*. 2020 Jul;139:405-409. doi: 10.1016/j.wneu.2020.04.068. Epub 2020 Apr 25. PMID: 32339733.

21. Yuksel U, Bakar B, Ozdemir A, Zengin M, Comert S, Ogden M. Using of the synthetic dural graft as described in bogota bag technique to decrease the adhesions in decompressive craniectomy. *Turk Neurosurg*. 2020 Jul 16. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.31128-20.2. Epub ahead of print. PMID: 33759157.

22. Schmalz P Use of an absorbable synthetic polymer dural substitute for repair of dural defects: a technical note./P Schmalz, C Griessenauer, CS Ogilvy, AJ

Thomas // *Cureus*. 2018 Jan;10 (1):e2127 doi: 10.7759/cureus.2127. PubMed PMID: 29607275; PubMed Central PMCID: PMC5875978

23. Fang Z, Tian R, Jia YT, Xu TT, Liu Y. Treatment of cerebrospinal fluid leak after spine surgery. *Chin J Traumatol*. 2017 Apr;20(2):81-83. doi: 10.1016/j.cjtee.2016.12.002. Epub 2017 Feb 24. PMID: 28336418; PMCID: PMC5392710.

24. Vlok AJ, Naidoo S, Kamat AS, Lamprecht D. Evaluation of locally manufactured patient-specific custom made implants for cranial defects using a silicone mould. *S Afr J Surg*. 2018 Sep;56(3):38-42. PMID: 30264941.

25. Reyes-Moreno I, Verheggen R. Time-sparing and effective procedure for dural closure in the posterior fossa using a vicryl mesh (Ethisorb). *Neurocirugia (Astur)*. 2006 Dec;17(6):527-31. doi: 10.1016/s1130-1473(06)70316-5. PMID: 17242840.

26. Raghavan A, Wright JM, Huang Wright C, Sajatovic M, Miller J. Effect of Dural Substitute and Technique on Cranioplasty Operative Metrics: A Systematic Literature Review. *World Neurosurg*. 2018 Nov;119:282-289. doi: 10.1016/j.wneu.2018.08.024. Epub 2018 Aug 13. PMID: 30114536.

27. Kongwad LI, Nair RP. The Divine Intervention with Bovine Pericardium, the Elusive Dural Substitute-Facts and Figures. *World Neurosurg*. 2019 Jul;127:640-641. doi: 10.1016/j.wneu.2019.03.168. PMID: 31266098.

28. Flanagan KE, Tien LW, Elia R, Wu J, Kaplan D. Development of a sutureless dural substitute from Bombyx mori silk fibroin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015 Apr;103(3):485-94. doi: 10.1002/jbm.b.33217. Epub 2014 Jun 12. PMID: 24919581.

29. Bi X et al. Applications of materials for dural reconstruction in pre-clinical and clinical studies: Advantages and drawbacks, efficacy, and selections. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020 Dec;117:111326. doi: 10.1016/j.msec.2020.111326. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32919680.

30. Entezami P, Field NC, Qian J, Yamamoto J. Delayed hypersensitivity reaction to a dural repair substitute. *Br J Neurosurg.* 2021 Aug 16;1-4. doi: 10.1080/02688697.2021.1967879. Epub ahead of print. PMID: 34397313.

31. Гольбин Д. А., Миндлин С. Н. Тактика пластического закрытия базальных дефектов после удаления срединных новообразований передних отделов основания черепа. Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. 2017;81(3):77-87. <https://doi.org/10.17116/neiro201781377-87>.

32. Danilova D.A., Gorbunova L.I., Tsybusov S.N., Uspensky I.V., Kravets L.Ya. Materials for plastic surgery of the dura mater: history and current state of the problem (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(3): 194–203, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.3.24>).

33. Пеннер В.А., Коваленко А.П. Морфологическое обоснование формирования и применения аутотрансплантатов из серпа большого мозга человека. Украинський журнал клінічної та лабораторної медицини 2013; 8(3): 76–84.

34. Azzam D. et al. Dural Repair in Cranial Surgery Is Associated with Moderate Rates of Complications with Both Autologous and Nonautologous Dural Substitutes. *World Neurosurg.* 2018 May;113:244-248. doi: 10.1016/j.wneu.2018.01.115. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29374609.

35. Costantino PD, Wolpoe ME, Govindaraj S, Chaplin JM, Sen C, Cohen M, Gnoy A. Human dural replacement with acellular dermis: clinical results and a review of the literature. *Head Neck.* 2000 Dec;22(8):765-71. doi: 10.1002/1097-0347(200012)22:8<765::aid-hed4>3.0.co;2-7. PMID: 11084636.

36. Turchan A. et al. Duraplasty using amniotic membrane versus temporal muscle fascia: A clinical comparative study. *J Clin Neurosci.* 2018 Apr;50:272-276. doi: 10.1016/j.jocn.2018.01.069. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29428266.

37. Eichberg DG, Ali SC, Buttrick SS, Komotar RJ. The use of dehydrated amniotic membrane allograft for augmentation of dural closure in craniotomies and endoscopic endonasal transphenoidal surgeries. *Br J Neurosurg.* 2018

Oct;32(5):516-520. doi: 10.1080/02688697.2018.1490943. Epub 2018 Jul 10. PMID: 29989435.

38. Huang YH, Lee TC, Chen WF, Wang YM. Safety of the nonabsorbable dural substitute in decompressive craniectomy for severe traumatic brain injury. *J Trauma*. 2011;71(3):533-537. doi:10.1097/TA.0b013e318203208a.

39. Oladunjoye AO, Schrot RJ, Zwienenberg-Lee M, Muizelaar JP, Shahlaie K. Decompressive craniectomy using gelatin film and future bone flap replacement. *J Neurosurg*. 2013 Apr;118(4):776-82. doi: 10.3171/2013.1.JNS121475. Epub 2013 Feb 8. PMID: 23394343.

40. Mizuno Y, Taguchi T. Fish Gelatin-Based Absorbable Dural Sealant with Anti-inflammatory Properties. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021 Oct 11;7(10):4991-4998. doi: 10.1021/acsbomaterials.1c00734. Epub 2021 Oct 1. PMID: 34596382.

41. Hemstapat R, Suvannapruk W, Thammarakcharoen F, Chumnanvej S, Suwanprateeb J. Performance evaluation of bilayer oxidized regenerated cellulose/poly ϵ -caprolactone knitted fabric-reinforced composites for dural substitution. *Proc Inst Mech Eng H*. 2020 Aug;234(8):854-863. doi: 10.1177/0954411920926071. Epub 2020 May 19. PMID: 32423302.

42. Kharchenko AV, Stupak V. Bacterial nanocellulose as a plastic material for closure of defects of the dura mater: literature review. *Spine Surgery*. 2019 Sept;16(3):62-73. DOI:10.14531/ss2019.3.62-73.

43. Rosen CL et al. Results of the prospective, randomized, multicenter clinical trial evaluating a biosynthesized cellulose graft for repair of dural defects. *Neurosurgery*. 2011 Nov;69(5):1093-103; discussion 1103-4. doi: 10.1227/NEU.0b013e3182284aca. PMID: 21670715.

44. Jin S et al. A double-layer dura mater based on poly(caprolactone-co-lactide) film and polyurethane sponge: preparation, characterization, and biodegradation study. *J Mater Chem B*. 2021 May 12;9(18):3863-3873. doi: 10.1039/d1tb00454a. PMID: 33928320.

45. Shin H, Nichol JW, Khademhosseini A. Cell-adhesive and mechanically tunable glucose-based biodegradable hydrogels. *Acta Biomater*. 2011 Jan;7(1):106-

14. doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.014. Epub 2010 Jul 18. PMID: 20647064; PMCID: PMC2967634.

46. Dey J, Xu H, Shen J, Thevenot P, Gondi SR, Nguyen KT, Sumerlin BS, Tang L, Yang J. Development of biodegradable crosslinked urethane-doped polyester elastomers. *Biomaterials*. 2008 Dec;29(35):4637-49. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.08.020. Epub 2008 Sep 17. PMID: 18801566; PMCID: PMC2747515.

47. Mumert ML, Altay T, Couldwell WT. Technique for decompressive craniectomy using Seprafilm as a dural substitute and anti-adhesion barrier. *J Clin Neurosci*. 2012 Mar;19(3):455-7. doi: 10.1016/j.jocn.2011.09.004. Epub 2012 Jan 14. PMID: 22245275.

48. Go KO, Hwang K, Han JH. Surgical Nuances to Reduce and Manage Cerebrospinal Fluid Leaks after Microvascular Decompression. *J Clin Med*. 2020 Mar 25;9(4):902. doi: 10.3390/jcm9040902. PMID: 32218220; PMCID: PMC7230255.

49. Basara G, Yue X, Zorlutuna P. Dual Crosslinked Gelatin Methacryloyl Hydrogels for Photolithography and 3D Printing. *Gels*. 2019 Jul 3;5(3):34. doi: 10.3390/gels5030034. PMID: 31277240; PMCID: PMC6787727.

50. Pogorielov M. et al. Experimental evaluation of new chitin-chitosan graft for duraplasty. *J Mater Sci Mater Med*. 2017 Feb;28(2):34. doi: 10.1007/s10856-017-5845-3. Epub 2017 Jan 21. PMID: 28110458.

51. Xie J, Macewan MR, Ray WZ, Liu W, Siewe DY, Xia Y. Radially aligned, electrospun nanofibers as dural substitutes for wound closure and tissue regeneration applications. *ACS Nano*. 2010;4(9):5027-5036. doi:10.1021/nn101554u

52. Shi Z, Xu T, Yuan Y, Deng K, Liu M, Ke Y, Luo C, Yuan T, Ayyad A. A New Absorbable Synthetic Substitute With Biomimetic Design for Dural Tissue Repair. *Artif Organs*. 2016 Apr;40(4):403-13. doi: 10.1111/aor.12568. Epub 2015 Nov 2. PMID: 26526152.

53. Lewis KM, Sweet J, Wilson ST, Rousselle S, Gulle H, Baumgartner B. Safety and Efficacy of a Novel, Self-Adhering Dural Substitute in a Canine

Supratentorial Durotomy Model. *Neurosurgery*. 2018 Mar 1;82(3):397-406. doi: 10.1093/neuros/nyx216. PMID: 28575349; PMCID: PMC6018778.

54. Velasco-Torres HS, Gómez Amador JL, Feinholz SR. Mass Effect Due to Hypertrophic Pericranial Flap in the Reconstruction of Dural Defect. *World Neurosurg*. 2015 Dec;84(6):2077.e11-4. doi: 10.1016/j.wneu.2015.07.070. Epub 2015 Aug 14. PMID: 26278866.

55. Pathrose Kamalabai R. et al. Rationale Behind the Use of Double-Layer Polypropylene Patch (G-patch) Dural Substitute During Decompressive Craniectomy as an Adhesion Preventive Material for Subsequent Cranioplasty with Special Reference to Flap Elevation Time. *World Neurosurg*. 2018 Mar;111:e105-e112. doi: 10.1016/j.wneu.2017.12.005. Epub 2017 Dec 9. PMID: 29233748.

56. Nguyen KD, Reddy V, Rahimi SY. Dural Sandwich Technique for Hemicraniectomy and Benefits During Cranioplasty. *World Neurosurg*. 2019 Jan 11:S1878-8750(19)30030-0. doi: 10.1016/j.wneu.2018.12.162. Epub ahead of print. PMID: 30641235.

57. Pierson M, Birinyi PV, Bhimireddy S, Coppens JR. Analysis of Decompressive Craniectomies with Subsequent Cranioplasties in the Presence of Collagen Matrix Dural Substitute and Polytetrafluoroethylene as an Adhesion Preventative Material. *World Neurosurg*. 2016 Feb;86:153-60. doi: 10.1016/j.wneu.2015.09.078. Epub 2015 Dec 22. PMID: 26433096.

58. Kim YH, Lee CH, Kim CH, Son DW, Lee SW, Song GS, Sung SK. Clinical Efficacy and Safety of Silicone Elastomer Sheet during Decompressive Craniectomy: Anti-Adhesive Role in Cranioplasty. *Brain Sci*. 2021 Jan 18;11(1):124. doi: 10.3390/brainsci11010124. PMID: 33477608; PMCID: PMC7831326.

59. Zheng Zhang, Ophir Ortiz, Ritu Goyal and Joachim Kohn. Biodegradable Polymers. In *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)* 2014, P. 441-473. Academic press. doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00023-9

60. Арутюнов А. И., Месхия Н. Ш. Некоторые актуальные вопросы пластики дефектов твёрдой мозговой оболочки. Вопросы нейрохирургии. 1972. 3. С. 3-9
61. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004 Apr 1;428(6982):487-92. doi: 10.1038/nature02388. PMID: 15057821.
62. Pagán AJ, Ramakrishnan L. The Formation and Function of Granulomas. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36:639-665. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100022. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29400999.
63. Witherel CE, Abebayehu D, Barker TH, Spiller KL. Macrophage and Fibroblast Interactions in Biomaterial-Mediated Fibrosis. *Adv Healthc Mater*. 2019 Feb;8(4):e1801451. doi: 10.1002/adhm.201801451. Epub 2019 Jan 18. PMID: 30658015; PMCID: PMC6415913.
64. Klopfleisch R, Jung F. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. *J Biomed Mater Res A*. 2017 Mar;105(3):927-940. doi: 10.1002/jbm.a.35958. Epub 2016 Nov 25. PMID: 27813288.
65. Ito K, Yamada M, Horiuchi T, Hongo K. Microanatomy of the dura mater at the craniovertebral junction and spinal region for safe and effective surgical treatment. *J Neurosurg Spine*. 2020 Mar 20:1-7. doi: 10.3171/2020.1.SPINE191424. Epub ahead of print. PMID: 32197248.
66. Chu C, Liu L, Rung S, Wang Y, Ma Y, Hu C, Zhao X, Man Y, Qu Y. Modulation of foreign body reaction and macrophage phenotypes concerning microenvironment. *J Biomed Mater Res A*. 2020 Jan;108(1):127-135. doi: 10.1002/jbm.a.36798. Epub 2019 Oct 6. PMID: 31515867.
67. Schick B, Wolf G, Romeike BF, Mestres P, Praetorius M, Plinkert PK. Dural cell culture. A new approach to study duraplasty. *Cells Tissues Organs*. 2003;173(3):129-37. doi: 10.1159/000069469. PMID: 12673095.
68. Deng K, Ye X, Yang Y, Liu M, Ayyad A, Zhao Y, et al. Evaluation of efficacy and biocompatibility of a new absorbable synthetic substitute as a dural

onlay graft in a large animal model. *Neurol Res.* 2016 Sep;38(9):799-808. doi: 10.1080/01616412.2016.1214418. PMID: 27487559.

69. Chuan D, Wang Y, Fan R, Zhou L, Chen H, Xu J, Guo G. Fabrication and Properties of a Biomimetic Dura Matter Substitute Based on Stereocomplex Poly(Lactic Acid) Nanofibers. *Int J Nanomedicine.* 2020 May 27;15:3729-3740. doi: 10.2147/IJN.S248998. PMID: 32547025; PMCID: PMC7266401.

70. Liao J, Li X, He W, Guo Q, Fan Y. A biomimetic triple-layered biocomposite with effective multifunction for dura repair. *Acta Biomater.* 2021 Aug;130:248-267. doi: 10.1016/j.actbio.2021.06.003. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34118449.

71. Xu Y, Shi G, Tang J, Cheng R, Shen X, Gu Y, Wu L, Xi K, Zhao Y, Cui W, Chen L. ECM-inspired micro/nanofibers for modulating cell function and tissue generation. *Sci Adv.* 2020 Nov 25;6(48):eabc2036. doi: 10.1126/sciadv.abc2036. PMID: 33239291; PMCID: PMC7688331.

72. Xu Y, Cui W, Zhang Y, Zhou P, Gu Y, Shen X, Li B, Chen L. Hierarchical Micro/Nanofibrous Bioscaffolds for Structural Tissue Regeneration. *Adv Healthc Mater.* 2017 Jul;6(13). doi: 10.1002/adhm.201601457. Epub 2017 Apr 13. PMID: 28407447.

73. Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG, Sánchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol.* 2018 Feb;17(1):20-26. doi: 10.1111/jocd.12450. Epub 2017 Nov 16. PMID: 29144022.

74. Wenbo Liu, Wang X, Su J, Jiang Q, Wang J, Xu Y, et al. Guidance of Technical Review for Product Registration of Dura Substitute (NMPA No. 48). (in Chinese). In «In vivo Evaluation of Fibrous Collagen Dura Substitutes» Beijing: NMPA. 2020.

75. Chowdhury SR, Mh Busra MF, Lokanathan Y, Ng MH, Law JX, Cletus UC, Binti Haji Idrus R. Collagen Type I: A Versatile Biomaterial. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1077:389-414. doi: 10.1007/978-981-13-0947-2_21. PMID: 30357700.

76. Liu X, Zheng C, Luo X, Wang X, Jiang H. Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure, modification and biomedical

applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Jun;99:1509-1522. doi: 10.1016/j.msec.2019.02.070. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30889687.

77. Busra MFM, Lokanathan Y. Recent Development in the Fabrication of Collagen Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Curr Pharm Biotechnol*. 2019;20(12):992-1003. doi: 10.2174/1389201020666190731121016. PMID: 31364511.

78. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004 Nov 15;71(2):343-54. doi: 10.1002/jbm.b.30096. PMID: 15386396.

79. Ellison AJ, Dempwolff F, Kearns DB, Raines RT. Role for Cell-Surface Collagen of *Streptococcus pyogenes* in Infections. *ACS Infect Dis*. 2020 Jul 10;6(7):1836-1843. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00073. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32413256; PMCID: PMC7354224.

80. Bonzano C, Di Zazzo A, Barabino S, Coco G, Traverso CE. Collagen Cross-Linking in the Management of Microbial Keratitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2019;27(3):507-512. doi: 10.1080/09273948.2017.1414856. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29308960.

81. Adamiak K, Sionkowska A. Current methods of collagen cross-linking: Review. *Int J Biol Macromol*. 2020 Oct 15;161:550-560. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075. Epub 2020 Jun 10. PMID: 32534089.

82. Karna E, Szoka L, Huynh TYL, Palka JA. Proline-dependent regulation of collagen metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2020 May;77(10):1911-1918. doi: 10.1007/s00018-019-03363-3. Epub 2019 Nov 18. PMID: 31740988; PMCID: PMC7228914.

83. Panwar P, Butler GS, Jamroz A, Azizi P, Overall CM, Brömme D. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases. *Matrix Biol*. 2018 Jan;65:30-44. doi: 10.1016/j.matbio.2017.06.004. Epub 2017 Jun 17. PMID: 28634008.

84. Ghazanfari S, Driessen-Mol A, Bouten CV, Baaijens FP. Modulation of collagen fiber orientation by strain-controlled enzymatic degradation. *Acta*

Biomater. 2016 Apr 15;35:118-26. doi: 10.1016/j.actbio.2016.02.033. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26923531.

85. Shekhter AB, Balakireva AV, Kuznetsova NV, Vukolova MN, Litvitsky PF, Zamyatnin AA Jr. Collagenolytic Enzymes and their Applications in Biomedicine. *Curr Med Chem.* 2019;26(3):487-505. doi: 10.2174/0929867324666171006124236. PMID: 28990520.

86. Wojtas M, Lausch AJ, Sone ED. Glycosaminoglycans accelerate biomimetic collagen mineralization in a tissue-based in vitro model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jun 9;117(23):12636-12642. doi: 10.1073/pnas.1914899117. Epub 2020 May 27. PMID: 32461359; PMCID: PMC7293698.

87. Catoira MC, Fusaro L, Di Francesco D, Ramella M, Boccafoschi F. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2019 Oct 10;30(10):115. doi: 10.1007/s10856-019-6318-7. PMID: 31599365; PMCID: PMC6787111.

88. (Нахаба О. О. Відстрочена краніопластика післяопераційних дефектів черепа (експериментальні дослідження) [Текст] : автореф. дис. на здоб. наук. ступ. к.м.н. : спец. 14.01.05 "Нейрохірургія" / Олександр Олександрович Нахаба ; НАМНУ Ін-т нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова НАМНУ. – К., 2017. – 28с.).

89. Nakayama Y, Tanaka T, Teshigawara A, Nogami R, Tachi R, Fuga M, Tochigi S, Hasegawa Y, Murayama Y. [Technical "Tips" for Epidural Tenting Using DuraGen[®] for Surgical Management of Large Dural Defects:A Technical Note]. *No Shinkei Geka.* 2020 Oct;48(10):903-907. Japanese. doi: 10.11477/mf.1436204294. PMID: 33071225.

90. Shekhter, A. B., Guller, A. E., Istranov, L. P., Istranova, E. V., Butnaru, D. V., Vinarov, A. Z., Zakharkina, O. L., Kurkov, A. V., Kantimerov, D. F., Antonov, E. N., Marisov, L. V., & Glybochko, P. V. (2015). *Arkhiv patologii*, 77(6), 29–38. <https://doi.org/10.17116/patol201577629-38>

91. Echave MC, Hernáez-Moya R, Iturriaga L, Pedraz JL, Lakshminarayanan R, Dolatshahi-Pirouz A, Taebnia N, Orive G. Recent advances in gelatin-based

therapeutics. *Expert Opin Biol Ther.* 2019 Aug;19(8):773-779. doi: 10.1080/14712598.2019.1610383. Epub 2019 May 7. PMID: 31009588.

92. Wolkow N, Jakobiec FA, Yoon MK. Gelatin-Based Hemostatic Agents: Histopathologic Differences. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* 2018 Sep/Oct;34(5):452-455. doi: 10.1097/IOP.0000000000001048. PMID: 29334539.

93. Jaipan P, Nguyen A, Narayan RJ. Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. *MRS Communications.* 2017;7(3):416-426. doi:10.1557/mrc.2017.92

94. Krüger-Genge A, Tondera C, Hauser S, Braune S, Görs J, Roch T, Klopffleisch R, Neffe AT, Lendlein A, Pietzsch J, Jung F. Immunocompatibility and non-thrombogenicity of gelatin-based hydrogels. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2021;77(3):335-350. doi: 10.3233/CH-201028. PMID: 33337355.

95. Chawla D, Kaur T, Joshi A, Singh N. 3D bioprinted alginate-gelatin based scaffolds for soft tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2020 Feb 1;144:560-567. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.127. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31857163.

96. Stucchi S, Colombo D, Guizzardi R, D'Aloia A, Collini M, Bouzin M, Costa B, Ceriani M, Natalello A, Pallavicini P, Cipolla L. Squarate Cross-Linked Gelatin Hydrogels as Three-Dimensional Scaffolds for Biomedical Applications. *Langmuir.* 2021 Dec 7;37(48):14050-14058. doi: 10.1021/acs.langmuir.1c02080. Epub 2021 Nov 22. PMID: 34806889.

97. Kim BY, Lee Y, Son JY, Park KM, Park KD. Dual Enzyme-Triggered In Situ Crosslinkable Gelatin Hydrogels for Artificial Cellular Microenvironments. *Macromol Biosci.* 2016 Nov;16(11):1570-1576. doi: 10.1002/mabi.201600312. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27558086.

98. Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Int J Biol Macromol.* 2017 Dec;105(Pt 2):1358-1368. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28735006.

99. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Shafi ME, Zabermawi NM, Arif M, Batiha GE, Khafaga AF, Abd El-Hakim YM, Al-Sagheer AA. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A

review. *Int J Biol Macromol.* 2020 Dec 1;164:2726-2744. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153. Epub 2020 Aug 22. PMID: 32841671.

100. Guimarães MF, Pighinelli L, Paz RL, Kmiec M, Zehetmeyer G, Becker CM, Escobar CF, Dos Santos LA. Chemical and physical properties of nanocrystalline chitosan by the method: Modified nanochitosan complex and process of obtaining modified nanochitosan. *Carbohydr Res.* 2020 Jul;493:108035. doi: 10.1016/j.carres.2020.108035. Epub 2020 May 21. PMID: 32497942.

101. Ma J, Zhong L, Peng X, Xu Y, Sun R. Functional Chitosan-based Materials for Biological Applications. *Curr Med Chem.* 2020;27(28):4660-4672. doi: 10.2174/0929867327666200420091312. PMID: 32310039.

102. Sandoval-Sánchez JH, Ramos-Zúñiga R, de Anda SL, López-Dellamary F, Gonzalez-Castañeda R, Ramírez-Jaimes Jde L, Jorge-Espinoza G. A new bilayer chitosan scaffolding as a dural substitute: experimental evaluation. *World Neurosurg.* 2012 Mar-Apr;77(3-4):577-82. doi: 10.1016/j.wneu.2011.07.007. Epub 2011 Nov 7. PMID: 22120335.

103. Pyatikop, V. O., Kravtsova, A. V., Sergiyenko, Y. G., & Abramova, L. P. (2019). Склад спинномозкової рідини після пластики твердої мозкової оболонки різними замінниками в ранній та пізній післяопераційний період (експериментальне дослідження). *Ukrainian Neurosurgical Journal*, 25(4), 50–56. <https://doi.org/10.25305/unj.179831>.

104. Wang W, Xue C, Mao X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. *Int J Biol Macromol.* 2020 Dec 1;164:4532-4546. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32941908.

105. Boominathan T, Sivaramakrishna A. Recent Advances in the Synthesis, Properties, and Applications of Modified Chitosan Derivatives: Challenges and Opportunities. *Top Curr Chem (Cham).* 2021 Apr 8;379(3):19. doi: 10.1007/s41061-021-00331-z. PMID: 33829312.

106. Duttgupta DS, Jadhav VM, Kadam VJ. Chitosan: a propitious biopolymer for drug delivery. *Curr Drug Deliv.* 2015;12(4):369-81. doi: 10.2174/1567201812666150310151657. PMID: 25761010.

107. de Farias BS, Grundmann DDR, Rizzi FZ, Martins NSS, Sant'Anna Cadaval Junior TR, de Almeida Pinto LA. Production of low molecular weight chitosan by acid and oxidative pathways: Effect on physicochemical properties. *Food Res Int.* 2019 Sep;123:88-94. doi: 10.1016/j.foodres.2019.04.051. Epub 2019 Apr 23. PMID: 31285033.

108. Hu Z, Lu S, Cheng Y, Kong S, Li S, Li C, Yang L. Investigation of the Effects of Molecular Parameters on the Hemostatic Properties of Chitosan. *Molecules.* 2018 Nov 30;23(12):3147. doi: 10.3390/molecules23123147. PMID: 30513622; PMCID: PMC6321099.

109. Furlani F, Sacco P, Decleva E, Menegazzi R, Donati I, Paoletti S, Marsich E. Chitosan Acetylation Degree Influences the Physical Properties of Polysaccharide Nanoparticles: Implication for the Innate Immune Cells Response. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019 Mar 13;11(10):9794-9803. doi: 10.1021/acsami.8b21791. Epub 2019 Feb 26. PMID: 30768897.

110. El Knidri H, Belaabed R, Addaou A, Laajeb A, Lahsini A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *Int J Biol Macromol.* 2018 Dec;120(Pt A):1181-1189. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139. Epub 2018 Aug 30. PMID: 30172808.

111. Miguel SP, Moreira AF, Correia IJ. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review. *Int J Biol Macromol.* 2019 Apr 15;127:460-475. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.072. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30660567.

112. Yaroslavov AA, Efimova AA, Krasnikov EA, Trosheva KS, Popov AS, Melik-Nubarov NS, Krivtsov GG. Chitosan-based multi-liposomal complexes: Synthesis, biodegradability and cytotoxicity. *Int J Biol Macromol.* 2021 Apr 30;177:455-462. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.169. Epub 2021 Feb 23. PMID: 33636261.

113. Rodríguez-Vázquez M, Vega-Ruiz B, Ramos-Zúñiga R, Saldaña-Koppel DA, Quiñones-Olvera LF. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue

Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int.* 2015;2015:821279. doi: 10.1155/2015/821279. Epub 2015 Oct 4. PMID: 26504833; PMCID: PMC4609393.

114. Oliveira SM, Mijares DQ, Turner G, Amaral IF, Barbosa MA, Teixeira CC. Engineering endochondral bone: in vivo studies. *Tissue Eng Part A.* 2009 Mar;15(3):635-43. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0052. PMID: 18759673; PMCID: PMC2751848.

115. Hua Y, Ma C, Wei T, Zhang L, Shen J. Collagen/Chitosan Complexes: Preparation, Antioxidant Activity, Tyrosinase Inhibition Activity, and Melanin Synthesis. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 2;21(1):313. doi: 10.3390/ijms21010313. PMID: 31906476; PMCID: PMC6982129.

116. Re F et al. 3D gelatin-chitosan hybrid hydrogels combined with human platelet lysate highly support human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *J Tissue Eng.* 2019 May 2;10:2041731419845852. doi: 10.1177/2041731419845852. PMID: 31105928; PMCID: PMC6507314.

117. Vishnoi T, Singh A, Teotia AK, Kumar A. Chitosan-Gelatin-Polypyrrole Cryogel Matrix for Stem Cell Differentiation into Neural Lineage and Sciatic Nerve Regeneration in Peripheral Nerve Injury Model. *ACS Biomater Sci Eng.* 2019 Jun 10;5(6):3007-3021. doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b00242. Epub 2019 May 10. PMID: 33405655.

118. Huang F, Cui L, Peng CH, Wu XB, Han BS, Dong YD. Preparation of three-dimensional macroporous chitosan-gelatin B microspheres and HepG2-cell culture. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016 Dec;10(12):1033-1040. doi: 10.1002/term.1888. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24729421.

119. Sánchez-Cardona Y, Echeverri-Cuartas CE, López MEL, Moreno-Castellanos N. Chitosan/Gelatin/PVA Scaffolds for Beta Pancreatic Cell Culture. *Polymers (Basel).* 2021 Jul 20;13(14):2372. doi: 10.3390/polym13142372. PMID: 34301129; PMCID: PMC8309518.

120. Mengistu Lemma S, Bossard F, Rinaudo M. Preparation of Pure and Stable Chitosan Nanofibers by Electrospinning in the Presence of Poly(ethylene

oxide). *Int J Mol Sci.* 2016 Oct 26;17(11):1790. doi: 10.3390/ijms17111790. PMID: 27792192; PMCID: PMC5133791.

121. Zhou JC, Zhang JJ, Zhang W, Ke ZY, Zhang B. Efficacy of chitosan dressing on endoscopic sinus surgery: a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017 Sep;274(9):3269-3274. doi: 10.1007/s00405-017-4584-x. Epub 2017 Apr 29. PMID: 28456847.

122. Erak M, Bellmann-Sickert K, Els-Heindl S, Beck-Sickinger AG. Peptide chemistry toolbox - Transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorg Med Chem.* 2018 Jun 1;26(10):2759-2765. doi: 10.1016/j.bmc.2018.01.012. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29395804.

123. Panteleichuk A., Kadzhaya M, Biloschytsky V, Shmeleva A, Petriv T, Gnatyuk O, Dovbeshko G, Kozakevych R, Tyortyh V. Composite chitosan/polyethylene oxide film for duraplasty in traumatic brain injury model in rats. *Cell Organ Transpl.* 2020; 8(1):26-31. doi:10.22494/cot.v8i1.105).

124. Taskin MB, Xia D, Besenbacher F, Dong M, Chen M. Nanotopography featured polycaprolactone/polyethyleneoxide microfibers modulate endothelial cell response. *Nanoscale.* 2017 Jul 6;9(26):9218-9229. doi: 10.1039/c7nr03326e. PMID: 28654129).

125. Li Y, Zhu C, Fan D, Fu R, Ma P, Duan Z, Li X, Lei H, Chi L. A Bi-Layer PVA/CMC/PEG Hydrogel with Gradually Changing Pore Sizes for Wound Dressing. *Macromol Biosci.* 2019 May;19(5):e1800424. doi: 10.1002/mabi.201800424. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30840367.)

126. Shao C, Zhu Y, Lai Z, Tan P, Shan A. Antimicrobial peptides with protease stability: progress and perspective. *Future Med Chem.* 2019 Aug;11(16):2047-2050. doi: 10.4155/fmc-2019-0167. PMID: 31538527.

127. Andriy B. Panteleychuk, Nikolay V. Kadzhaya, Anna A. Shmeleva, Tatyana A. Malysheva, Olena P. Hnatyuk, Galina I. Dovbeshko. (2019). Theoretical substantiation of the efficiency of biopolymers application in experimental TBI (literature review and own results). *Ukr Neurosurg J,* 25(4):64-71 doi: 10.25305/unj.184031.

128. Jing Y, Ma X, Xu C, Tian HL, Chen SW. Repair of dural defects with electrospun bacterial cellulose membranes in a rabbit experimental model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020 Dec;117:111246. doi: 10.1016/j.msec.2020.111246. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32919624.

129. Mecheri B, Paris F, Lübbert H. Histological investigations on the dura mater vascular system of mice. *Acta Histochem*. 2018 Nov;120(8):846-857. doi: 10.1016/j.acthis.2018.09.009. Epub 2018 Oct 4. PMID: 30292321.

130. Jeitner TM, Kalogiannis M, Patrick PA, Gomolin I, Palaia T, Ragolia L, Brand D, Delikatny EJ. Inflaming the diseased brain: a role for tainted melanins. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May;1852(5):937-50. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.01.004. Epub 2015 Jan 10. PMID: 25585261; PMCID: PMC5113040.

131. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom*. 2020 Mar;92(1):e68. doi: 10.1002/cpcy.68. PMID: 31876974; PMCID: PMC6961134.

132. Sanderson J. Fundamentals of Microscopy. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2020 Jun;10(2):e76. doi: 10.1002/cpmo.76. PMID: 32497416.

133. Seo J, Choe M, Kim SY. Clearing and Labeling Techniques for Large-Scale Biological Tissues. *Mol Cells*. 2016 Jun 30;39(6):439-46. doi: 10.14348/molcells.2016.0088. Epub 2016 May 30. Erratum in: *Mol Cells*. 2019 Jan 31;42(1):96. PMID: 27239813; PMCID: PMC4916395.

134. Petazzi RA, Aji AK, Chiantia S. Fluorescence microscopy methods for the study of protein oligomerization. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2020;169:1-41. doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.12.001. Epub 2019 Dec 27. PMID: 31952683.

135. Wilcox RK, Bilston LE, Barton DC, Hall RM. Mathematical model for the viscoelastic properties of dura mater. *J Orthop Sci*. 2003;8(3):432-4. doi: 10.1007/s10776-003-0644-9. PMID: 12768491.

136. Makarov M.S., Storozheva M.V., Borovkova N.V. Collagen fiber autofluorescence level in evaluating the biological properties of tissue grafts.

Sovremennye tehnologii v medicine 2017; 9(2): 83–90, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.10>.

137. Panteleichuk, A. B.; Shmeleva, A. A.; Kadzhaya, M. V.; Hnatiuk, O. P.; Karakhim, S. I.; Dovbeshko, G. I.; Savosko, S. I. & Kozakevych, R. B. Quantitative evaluation of the regenerated dura mater in a decompressive skull trepanation model in rats. *Int. J. Morphol.*, 39(6):1731-1736, 2021. DOI: doi.org/10.4067/S0717-95022021000601731.

138. Hackshaw KV, Miller JS, Aykas DP, Rodriguez-Saona L. Vibrational Spectroscopy for Identification of Metabolites in Biologic Samples. *Molecules*. 2020 Oct 15;25(20):4725. doi: [10.3390/molecules25204725](https://doi.org/10.3390/molecules25204725). PMID: 33076318; PMCID: PMC7587585.

139. Wu Y, Zhang L, Jung YM, Ozaki Y. Two-dimensional correlation spectroscopy in protein science, a summary for past 20years. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2018 Jan 15;189:291-299. doi: [10.1016/j.saa.2017.08.014](https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.08.014). Epub 2017 Aug 9. PMID: 28823970.

140. Song Y, Cong Y, Wang B, Zhang N. Applications of Fourier transform infrared spectroscopy to pharmaceutical preparations. *Expert Opin Drug Deliv*. 2020 Apr;17(4):551-571. doi: [10.1080/17425247.2020.1737671](https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1737671). Epub 2020 Mar 11. PMID: 32116058.

141. Morais CLM, Lima KMG, Singh M, Martin FL. Tutorial: multivariate classification for vibrational spectroscopy in biological samples. *Nat Protoc*. 2020 Jul;15(7):2143-2162. doi: [10.1038/s41596-020-0322-8](https://doi.org/10.1038/s41596-020-0322-8). Epub 2020 Jun 17. PMID: 32555465.

142. Beć KB, Grabska J, Huck CW. Biomolecular and bioanalytical applications of infrared spectroscopy - A review. *Anal Chim Acta*. 2020 Oct 9;1133:150-177. doi: [10.1016/j.aca.2020.04.015](https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.015). Epub 2020 Apr 12. PMID: 32993867.

143. Querido W, Kandel S, Pleshko N. Applications of Vibrational Spectroscopy for Analysis of Connective Tissues. *Molecules*. 2021 Feb 9;26(4):922. doi: [10.3390/molecules26040922](https://doi.org/10.3390/molecules26040922). PMID: 33572384; PMCID: PMC7916244.

144. Salvador E, Burek M, Förster CY. An In Vitro Model of Traumatic Brain Injury. *Methods Mol Biol.* 2018;1717:219-227. doi: 10.1007/978-1-4939-7526-6_17. PMID: 29468595.
145. Marten Risling and Johan Davidsson (eds.), *Animal Models of Neurotrauma, Neuromethods*, vol.149. Springer Science+Business Media 2019. doi.org/10.1007/978-1-4939-9711-4_5
146. Ma X, Aravind A, Pfister BJ, Chandra N, Haorah J. Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Mol Neurobiol.* 2019 Aug;56(8):5332-5345. doi: 10.1007/s12035-018-1454-5. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30603958.
147. Günther M, Davidsson J, Plantman S, Norgren S, Mathiesen T, Risling M. Neuroprotective effects of N-acetylcysteine amide on experimental focal penetrating brain injury in rats. *J Clin Neurosci.* 2015 Sep;22(9):1477-83. doi: 10.1016/j.jocn.2015.03.025. Epub 2015 Jun 19. PMID: 26100161.
148. Белолицкий В.В. Принципы моделирования черепно-мозговой травмы в эксперименте/ В.В. Белолицкий // Український нейрохірургічний журнал 2008, №4, стр.9-15
149. Witcher KG, Bray CE, Dziabis JE, McKim DB, Benner BN, Rowe RK, Kokiko-Cochran ON, Popovich PG, Lifshitz J, Eiferman DS, Godbout JP. Traumatic brain injury-induced neuronal damage in the somatosensory cortex causes formation of rod-shaped microglia that promote astrogliosis and persistent neuroinflammation. *Glia.* 2018 Dec;66(12):2719-2736. doi: 10.1002/glia.23523. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30378170; PMCID: PMC7542609.
150. Berg RWV, Davidsson J, Lidin E, Angéria M, Risling M, Günther M. Brain tissue saving effects by single-dose intralesional administration of Neuroprotectin D1 on experimental focal penetrating brain injury in rats. *J Clin Neurosci.* 2019 Jun;64:227-233. doi: 10.1016/j.jocn.2019.03.032. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30948313.
151. Brady RD, Casillas-Espinosa PM, Agoston DV, Bertram EH, Kamnaksh A, Semple BD, Shultz SR. Modelling traumatic brain injury and posttraumatic

epilepsy in rodents. *Neurobiol Dis.* 2019 Mar;123:8-19. doi: 10.1016/j.nbd.2018.08.007. Epub 2018 Aug 16. PMID: 30121231; PMCID: PMC6348144.

152. Zulazmi NA, Arulsamy A, Ali I, Zainal Abidin SA, Othman I, Shaikh MF. The utilization of small non-mammals in traumatic brain injury research: A systematic review. *CNS Neurosci Ther.* 2021 Apr;27(4):381-402. doi: 10.1111/cns.13590. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33539662; PMCID: PMC7941175.

153. Keith KA, Huang JH. *Animal Models of Post-Traumatic Epilepsy. Diagnostics (Basel).* 2019 Dec 19;10(1):4. doi: 10.3390/diagnostics10010004. PMID: 31861595; PMCID: PMC7169449.

154. Williams AJ, Hartings JA, Lu XC, Rolli ML, Dave JR, Tortella FC. Characterization of a new rat model of penetrating ballistic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005 Feb;22(2):313-31. doi: 10.1089/neu.2005.22.313. PMID: 15716636.

155. Plantman S, Ng KC, Lu J, Davidsson J, Risling M. Characterization of a novel rat model of penetrating traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2012 Apr 10;29(6):1219-32. doi: 10.1089/neu.2011.2182. Epub 2012 Apr 2. PMID: 22181060.

156. Nyanzu M, Siaw-Debrah F, Ni H, Xu Z, Wang H, Lin X, Zhuge Q, Huang L. Improving on Laboratory Traumatic Brain Injury Models to Achieve Better Results. *Int J Med Sci.* 2017 Apr 9;14(5):494-505. doi: 10.7150/ijms.18075. PMID: 28539826; PMCID: PMC5441042.

157. Miao Q, Ge M, Huang L. Up-regulation of GBP2 is Associated with Neuronal Apoptosis in Rat Brain Cortex Following Traumatic Brain Injury. *Neurochem Res.* 2017 May;42(5):1515-1523. doi: 10.1007/s11064-017-2208-x. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28239766.

158. Kayvan Dehlaghi Jadid, Johan Davidsson, Erik Lidin, Anders Hånell, Maria Angéria, Tiit Mathiesen, Mårten Risling¹ and Mattias Günther. COX-2 Inhibition by Diclofenac Is Associated With Decreased Apoptosis and Lesion Area

After Experimental Focal Penetrating Traumatic Brain Injury in Rats published: 30 July 2019 doi: 10.3389/fneur.2019.00811.

159. Pre-Clinical Evaluation of Collagen Dura Substitutes in a Rabbit Duraplasty Model: DuraMatrixSuturable. 2015.

<https://cmf.stryker.com/assets/files/3i/duramatrixsuturable---white-paper.pdf>

ДОДАТОК А

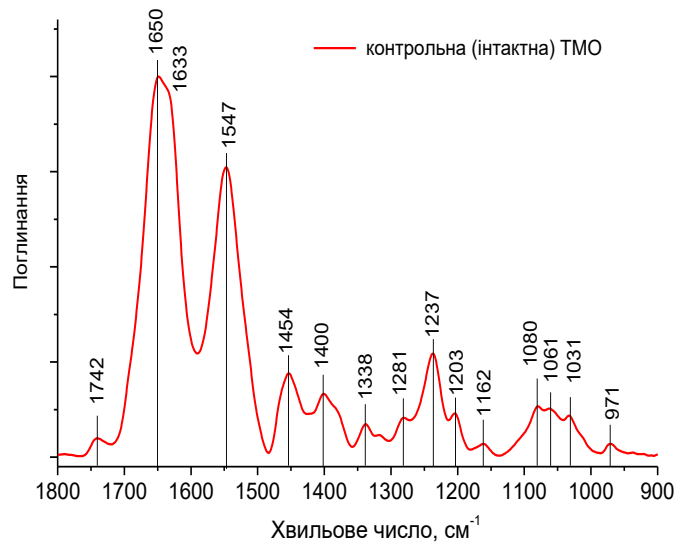


Рис. 1. FTIR спектр одержаний з інтактної ТМО.

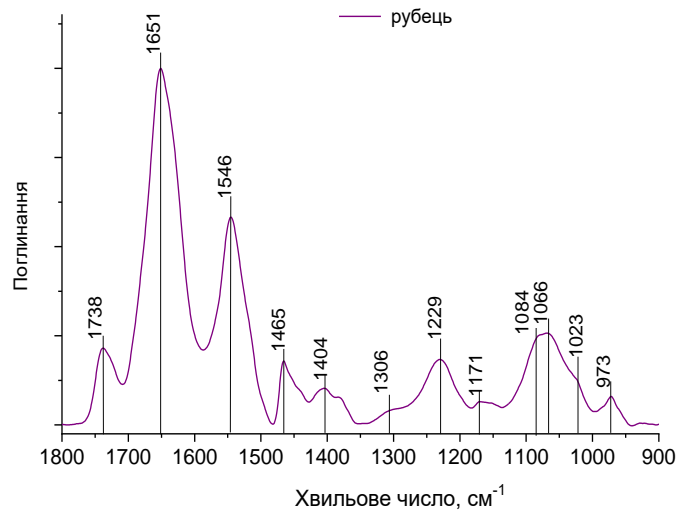


Рис. 2. FTIR спектр одержаний з рубця у регенованій ТМО.

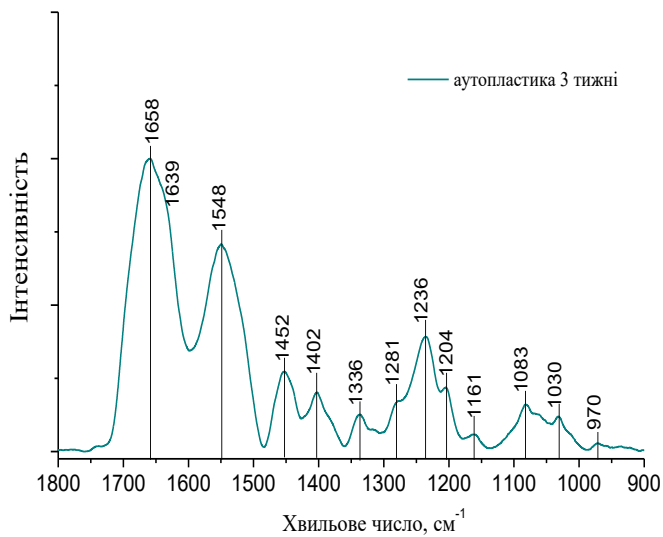


Рис. 3. FTIR спектр у групі аутопластики. Термін спостереження 3 тижні.

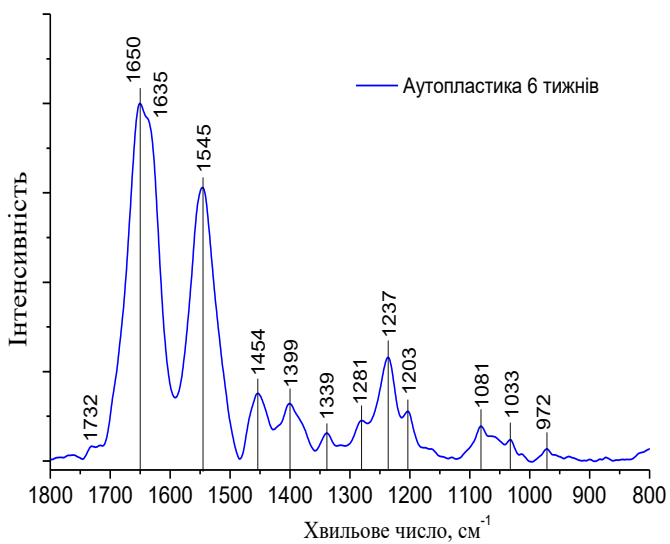


Рис. 4. FTIR спектр у групі аутопластики. Термін спостереження 6 тижнів.

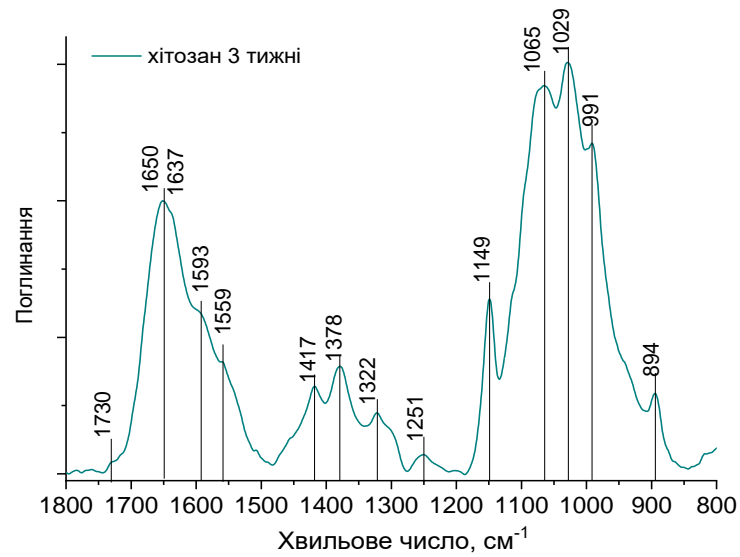


Рис. 5. FTIR спектр у групі з хітозаном. Термін спостереження 3 тижні.

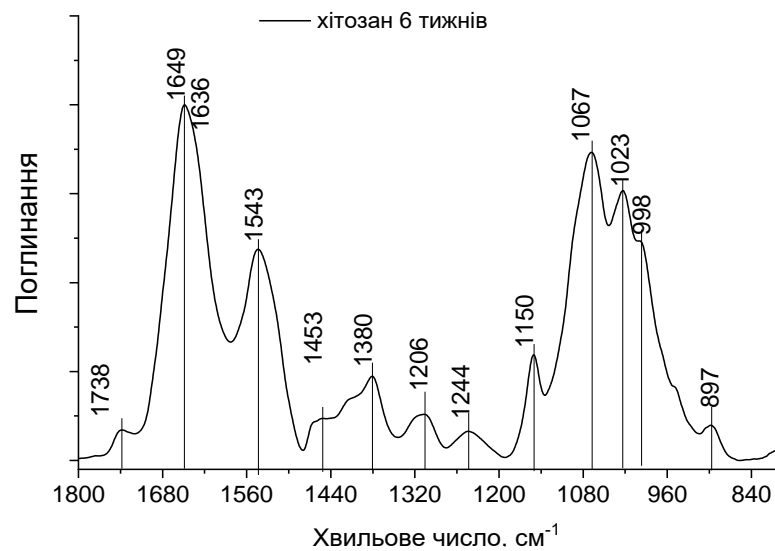


Рис. 6. FTIR спектр у групі з хітозаном. Термін спостереження 6 тижнів.

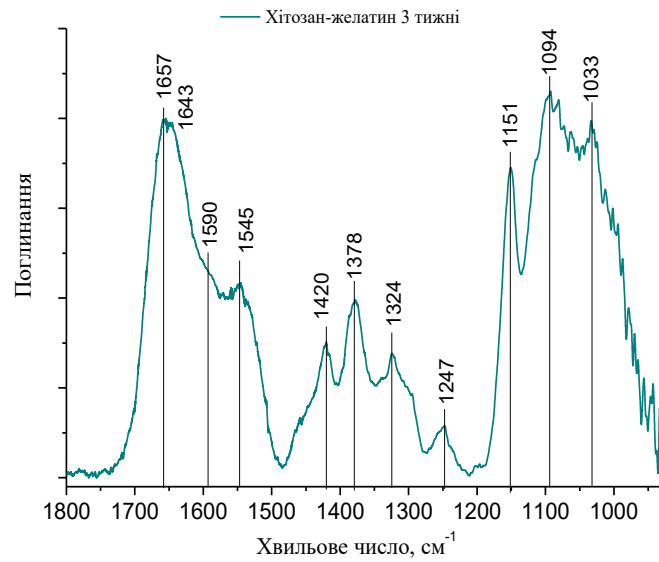


Рис. 7. FTIR спектр у групі з хітозаном та желатином. Термін спостереження 3 тижні.

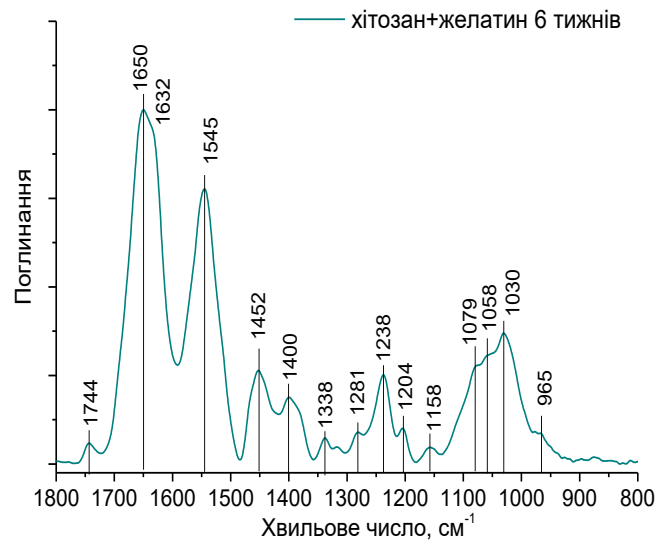


Рис. 8. FTIR спектр у групі з хітозаном та желатином. Термін спостереження 6 тижнів.

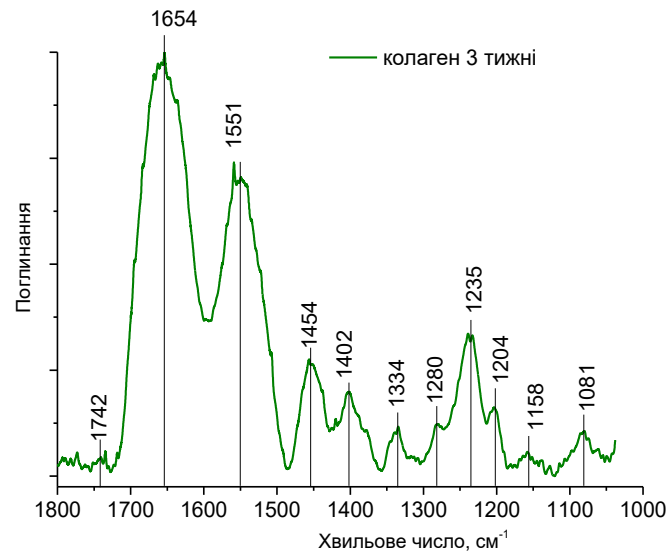


Рис. 9. FTIR спектр у групі з колагеном. Термін спостереження 3 тижні.

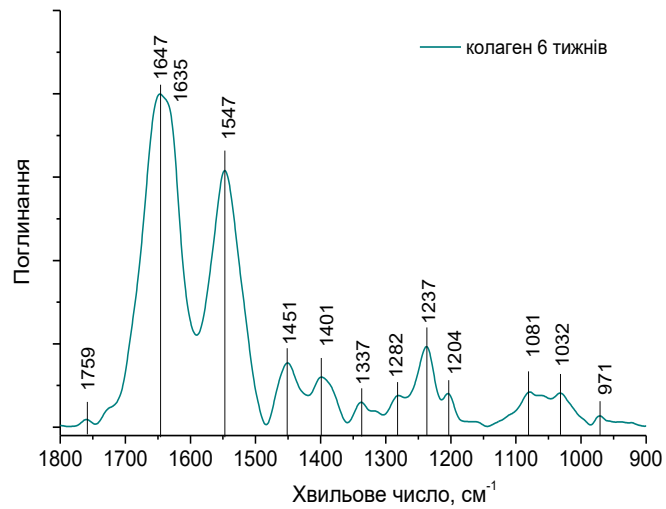


Рис. 10. FTIR спектр у групі з колагеном. Термін спостереження 6 тижнів.

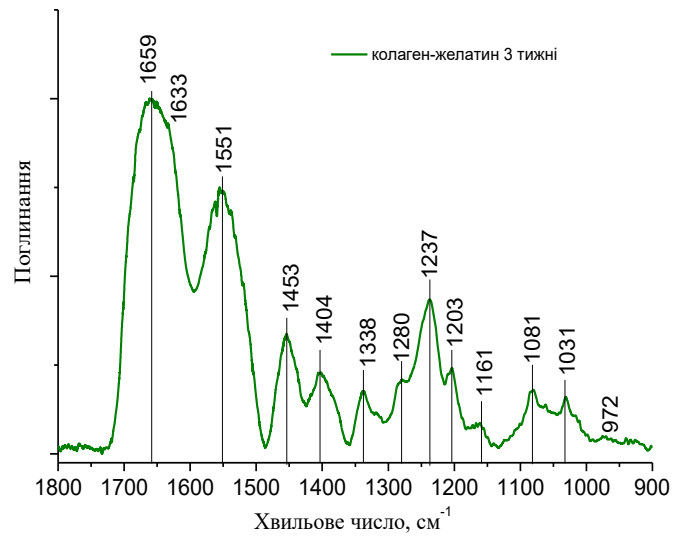


Рис. 11. FTIR спектр у групі з колагеном та желатином. Термін спостереження 3 тижні.

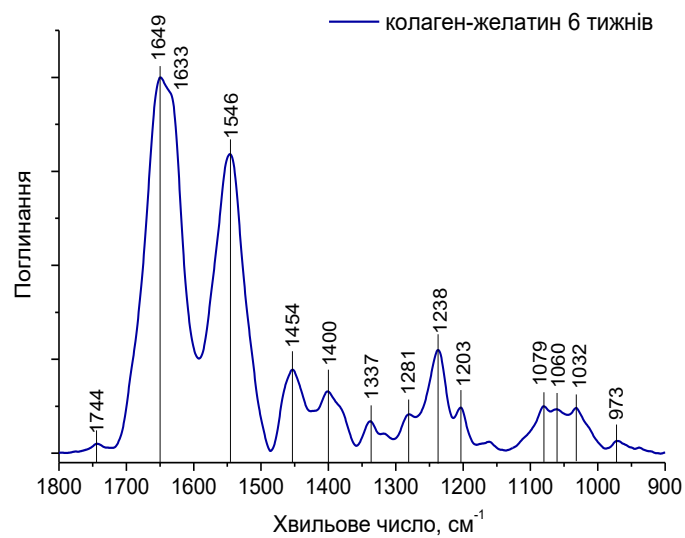


Рис. 12. FTIR спектр у групі з колагеном та желатином. Термін спостереження 6 тижнів.

ДОДАТОК Б

Таблиця 1

Оцінка спайково-рубцевих процесів у ділянці дефекту ТМО за умов різних способів дуопластики за модифікованою шкалою STRYKER

| Група | Термін спостереження | |
|-----------------|----------------------|----------|
| | 3 тижні | 6 тижнів |
| Контроль | - | - |
| Аутопластика- | 3,6±0,2 | 3,6±0,2 |
| Хітозан | 1,0±0,0* | 1,5±0,2* |
| Хітозан+желатин | 1,4±0,2* | 1,6±0,2* |
| Колаген | 1,0±0,0* | 1,8±0,4* |
| Колаген+желатин | 2,6±0,4 | 2,6±0,4 |

Примітка: * - P<0,05 достовірно щодо аутопластики

Таблиця 2

Інтегральна оцінка інтенсивності регенеративних процесів у ТМО за 7-ми ознаковою шкалою

| Група | Термін спостереження | |
|-----------------|----------------------|--------------|
| | 3 тижні | 6 тижнів |
| Контроль | 7,0±0,0 | 7,0±0,0 |
| Аутопластика- | 17,4±1,9* | 18,8±1,3* |
| Хітозан | 10,6±0,9*,** | 12,2±1,5*,** |
| Хітозан+желатин | 10,0±0,8*,** | 12,4±1,1*,** |
| Колаген | 13,4±0,9* | 14,4±1,5*,** |
| Колаген+желатин | 11,6±1,5*,**,# | 13,2±2,1* |

Примітка: * - P<0,05 достовірно щодо контролю; ** - P<0,05 достовірно щодо аутопластики; # - P<0,05 достовірно щодо колагену

Таблиця 3

Товщина ТМО за даними морфометрії, мкм

| Група | Термін спостереження | |
|-----------------|----------------------|-------------------|
| | 3 тижні | 6 тижнів |
| Контроль | 91,6±7,5 | |
| Аутопластика | 202,7±33,8* | 272,6±25,3* |
| Хітозан | 313,8±72,7* | 407,1±48,8* |
| Хітозан+желатин | 231,1±35,6* | 529,7±68,0* |
| Колаген | 220,2±34,9* | 205,2±25,3*,**, # |
| Колаген+желатин | 185,2±49,8* | 270,4±33,8*,**, # |

Примітка: * - $P < 0,05$ достовірно щодо контролю; ** - $P < 0,05$ достовірно щодо хітозану; # - $P < 0,05$ достовірно щодо хітозан+желатин.

ДОДАТОК В

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Публікації, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Andriy B. Panteleychuk, Nikolay V. Kadzhaya, Anna A. Shmeleva, Tatyana A. Malysheva, Olena P. Hnatyuk, Galina I. Dovbeshko. (2019). Theoretical substantiation of the efficiency of biopolymers application in experimental TBI (literature review and own results). Ukr Neurosurg J, 25(4):64-71 doi: 10.25305/unj.184031. <https://doi.org/10.25305/unj.184031>).

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, розробці дизайну дослідження, проведенні хірургічної частини експерименту, відборі післяопераційного матеріалу, написанні основного тексту статті та підготовці статті до друку).

2. Panteleichuk A., Kadzhaya M, Biloschytsky V, Shmeleva A, Petriv T , Gnatyuk O, Dovbeshko G, Kozakevych R, Tyortyh V. Composite chitosan/polyethylene oxide film for duraplasty in traumatic brain injury model in rats. Композитна хітозан/поліетилен оксидна плівка для пластики твердої мозкової оболони на моделі черепно-мозкової травми у щурів. Cell Organ Transpl. 2020; 8(1):26-31. doi:10.22494/cot.v8i1.105

(Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, розробці дизайну дослідження, відборі плівкових матеріалів для хірургічної частини експерименту, проведенні хірургічної частини експерименту, відборі післяопераційного матеріалу, написанні основного тексту статті та підготовці статті до друку).

3. Panteleichuk, A. B.; Shmeleva, A. A.; Kadzhaya, M. V.; Hnatiuk, O. P.; Karakhim, S. I.; Dovbeshko, G. I.; Savosko, S. I. & Kozakevych, R. B. Quantitative evaluation of the regenerated dura mater in a decompressive skull trepanation model in rats. Int. J. Morphol., 39(6):1731-1736, 2021. doi.org/10.4067/S0717-95022021000601731

http://www.intjmorphol.com/wp-content/uploads/2021/11/art_34_396.pdf

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

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

4. Каджая М.В. , Пантелейчук А.Б. Доповідь : «Сучасний стан проблеми пластики ТМО». Науково-практична конференція нейрохірургів України з міжнародною участю «Організація та сучасні принципи надання спеціалізованої нейрохірургічної допомоги хворим на мозковий інсульт» у вересні 2018 р. Україна. Вінниця. С. 126.

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

5. Пантелейчук А.Б.«Досвід застосування біополімерних плівок на основі хітозану для пластики ТОГМ в експериментальній ЧМТ». Восьмий міжнародний медичний конгрес. Науково-практична конференція «Інноваційні технології в нейрохірургії» С . 87-88. 17-19 квітня 2019р. Україна.Київ.

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

6. Kozakevych R., Tertykh V., Panteleichuk A. «Preparation and characterization of biodegradable biopolymer film for Dural Substituans» International research and practice conferens «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2019) 27-30 August 2019 Lviv,Ukraine С. 232.

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

7. Olena Gnatiuk, Andrii Panteleichuk, Anna Shmeleva, Mykola Kadzhaya, Roman Kozakevych, Galina Dovbeshko «Chitosan and collagen as scaffold mathrics for dura mater healing studied by vibrational spectroscopy» . International Conferens Nanobiophysics : fundamental and appied aspects. October 1-4,2019.C. 46.

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

8. Пантелейчук А.Б., Каджая М.В., Шмельова А.А., Малишева Т.А. «Пластика дефектів твердої оболонки головного мозку біополімерними плівками на основі колагену в експериментальній черепно-мозковій травмі» Науково-практична конференція нейрохірургів України з міжнародною участю «Високі технології у підвищенні якості життя нейрохірургічних хворих» 23-25 жовтня 2019р . Київ. Україна. С. 12.

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

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

9. Пантелейчук А.Б., Каджая М.В., Шмельова А.А., Васлович В.В., Гнатюк О.П., Карахім С.О., Довбешко Г.І. «Можливості конфокальної мікроскопії для оцінки ефективності пластики твердої мозкової оболони в експерименті», VII з'їзд нейрохірургів України з міжнародною участю 11-18 травня 2021р. Сіде, Туреччина.

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