

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ГОНЧАРУК ОЛЕКСІЙ ОЛЕГОВИЧ

УДК 616.833-089.85-089.881-003.93:57.084

ДИСЕРТАЦІЯ
ОСОБЛИВОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ ПЕРИФЕРИЧНОГО НЕРВА ПРИ
РІЗНИХ ВАРІАНТАХ ЙОГО З'ЄДНАННЯ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

22 – Охорона здоров'я

222 – Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

Науковий керівник: Цимбалюк Віталій Іванович, доктор медичних наук, професор, академік НАН і НАМН України.

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Гончарук О.О. Особливості регенерації периферичного нерва при різних варіантах його з'єднання в експерименті. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22 Охорона здоров'я за спеціальністю 222 Медицина.– Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ, 2021.

Вивчення особливостей регенерації травматично ушкодженого периферичного нерва при використанні різних варіантів з'єднання його проксимального і дистального сегментів залишається відкритою проблемою для сучасної практичної нейрохірургії. Ефективність мікрохірургічної техніки має безпосередній вплив на результат відновлення травмованого периферичного нерва, як на рівні структурної регенерації нерва і реіннервації м'язів, так і функціонального відновлення кінцівки. Впродовж тривалого часу мікрохірургічне відновлення травмованого периферичного нерва виконували кількома техніками мікрошвів (епі- та периневральний шви). Але такий підхід, хоч і вважається золотим стандартом у мікрохірургії нервів, має свої недоліки. По-перше, ця нейрорафія вимагає високого технічного рівня виконання. По-друге, виконання шва пов'язано з додатковим травмуванням кінців нерва. По-третє, недостатня адгезія кінців нерва може сповільнювати регенеративні процеси і зменшити міцність нейрорафії нерва. Для уникнення цих труднощів і недоліків запропоновано використання додаткових адгезивних субстратів у ділянці шва ушкодженого периферичного нерва, наприклад, на основі поліетиленгліколю гідрогелю та фібрину. У нашому дослідженні висунуто гіпотезу, що застосування адгезивних клеїв (гідрогелів) дасть змогу спростити мікрохірургічне відновлення ушкодженого нерва, покращити відновні процеси або не перешкоджати їм. З метою одержання доказів було проведено експериментальні дослідження на лабораторних тваринах (80 білих безпородних щурів-самців, масою 250 ± 25 г,

віком 5-6 місяців). Алгоритм дослідження полягав у моделюванні травматичного ушкодження периферичного нерва й оцінюванні відновних процесів у динаміці. За модель досліду обрано повний перетин сідничого нерва на рівні його верхньої третини. Усім дослідним щурам здійснювали перетин сідничого нерва і далі тварин розділяли на 3 основні групи: 1) група з епіневральним швом – кукси нерва з'єднували 4-6 епіневральними швами; 2) група із застосуванням гідрогелю – кукси нерва поєднували поліетиленгліколем гідрогелем, але додатково виконували 2 фіксуючі шви; 3) група із застосуванням фібрину – кукси нерва поєднували фібриновим клеєм, але додатково виконували 2 фіксуючі шви. В якості контрольних груп були сформовані групи: 1) інтактних щурів; 2) псевдооперованих щурів (здійснювали доступ до сідничого нерва без перетину); 3) щурів з повним перетином нерва (сідничий нерв залишали без з'єднання пересічених кінців). Для аналізу динаміки відновних процесів були обрані три терміни – 14, 30 і 60 доба. Методи дослідження: а) функціональний тест – «тест ходи по доріжці» («Walking track analysis»), де вираховували функціональний індекс сідничого нерва (Sciatic Functional Index, SFI) – широко використовуваний показник стану кінцівки при оцінці ефективності відновлення ушкодженого нерва; б) електронейроміографія (ЕНМГ) – за параметрами амплітуди М-відповіді, латентного періоду М-відповіді та швидкості проведення збудження оцінювали рівень нервово-м'язового відновлення; в) гістологічні методи – досліджували регенерацію нервових волокон через ділянку шва у дистальній сегмент, морфометрично оцінювали кількість регенерованих мієлінових нервових волокон у дистальному кінці нерва, досліджували морфологічні зміни м'язових волокон у денервованих м'язах, гістохімічно та морфометрично оцінювали процеси фіброзу у денервованих м'язах; г) молекулярно-біологічні методи – виявляли наявність і рівень активності матриксної металопротеїнази-9 у м'язах для вивчення процесів гіпотрофії та фіброзу при денервації. Були використані статистичні методи і кореляційний

аналіз для встановлення міжгрупової різниці та визначення найбільш ефективного методу з'єднання кукс перетнутого сідничого нерва.

За результатами функціональних тестів (згідно індексу SFI) встановлено позитивну динаміку відновлення моторної функції у всіх дослідних щурів з 2 тижня, яким здійснювали нейрорафію або комбіноване з'єднання кукс нерва епіневральними швами і гідрогелями. За умов повного перетину, без нейрорафії, ознаки відновлення за SFI були відсутні. Достовірне зростання показника SFI реєстрували до 4 тижня включно, і тільки за умов застосування поліетиленгліколю гідрогелю встановлено збільшення значень функціонального індексу. Не виявлено різниці між групою тварин із застосуванням епіневральних швів та фібринового клею. Одержані результати дозволили зробити висновок, що використання поліетиленгліколю гідрогелю дозволяє досягти швидшого функціонального відновлення порівняно з стандартним епіневральним швом.

Результати ЕНМГ дали можливість одержати більше даних про функціональні показники нервово-м'язового відновлення. У дослідженні оцінено три параметри М-відповіді, за якими встановлено статистично значущу різницю. По-перше, у всіх трьох групах з мікрохірургічним відновленням встановлено достовірно меншу амплітуду М-відповіді скелетних м'язів гомілки до 30 доби, а на 60 добу амплітуда негативно-позитивного піка майже досягла вихідних значень (статистично значуща різниця між групами відсутня). При цьому, після застосування фібринового клею амплітуда М-відповіді залишалась меншою, що вказує на менше відновлення рухових одиниць. По-друге, тривалість латентного періоду М-відповіді у тварин в групі після повного перетину сідничого нерва і наступного мікрохірургічного відновлення зростає відносно контрольних значень. Встановлено статистично достовірну різницю між групами порівняння. Так, після епіневральних швів та застосування швів з фібриновим клеєм відбувалось збільшення латентного періоду на 60 добу, тривалість якого була більшою контрольних показників, тоді як у групі

тварин із застосуванням поліетиленгліколю гідрогелю відмічені зміни не виявлено. Результати М-відповіді литкового м'яза у групах з комбінованою технікою з'єднання кукс перетнутого сідничого нерва мали високу кореляцію з рівнем регенерації нерва на 30 добу. Характеристика показника латентного періоду М-відповіді на 2 місяці відновлення пояснюється збільшенням кількості “тонких” слабо мієлінізованих нервових волокон після застосування епіневрального шва і фібринового гелю та швидшою ремієлінізацією нервових волокон у групі з поліетиленгліколем гідрогелем. По-третє, швидкість проведення збудження на різних термінах регенерації периферичного нерва відрізняється. Після нейрорафії встановлено зменшення даного показника, що також можна пояснити додатковим збільшенням щільності тонких нервових волокон на ранніх етапах ремієлінізації на 60 добу. Не виявлено подібної динаміки після застосування поліетиленгліколю гідрогелю і фібринового гелю, тобто рівень регенерації нервових волокон у дистальний кінець нерва за такої мікрохірургічної техніки був більшим. Для одержання морфологічних доказів отриманих результатів було проведено мікроскопічне та електронномікроскопічне дослідження дистального кінця сідничого нерва.

За результатами гістологічного дослідження три використані мікрохірургічні техніки дозволили забезпечити проростання нервових волокон у дистальний сегмент сідничого нерва. Проте, між групами порівняння встановлено деякі відмінності. На рівні епіневрального шва відбувалось формування регенераційної невроми, що позначилось у збільшенні товщини нерва (за рахунок потовщення епіневрію, збільшення колагенових волокон), а за умов застосування поліетиленгліколю гідрогелю і фібриновго гелю додатково реєстрували інкапсуляцію введених субстанцій в епіневрії. Зроблено висновок, що їх розподіл і діаметр неоднорідні, а інкапсульовані речовини елімінуються впродовж терміну регенерації нерва. Так, фокальні і мультифокальні осередки фібрину (від 100 до 200 μm) менші і швидше елімінуються порівняно з гідрогелем (від 90 до 1600 μm), а біодеградація й

елімінація фібрину і гідрогелю є послідовною, без появи інфільтрату запальня. Фасцикулярна будова дистального кінця нерва зберігається і нервові волокна регенерують у збережені фасцикули.

Проведено ультраструктурне дослідження та морфометрію мієлінових нервових волокон у дистальному сегменті сідничого нерва. Встановлено, що найбільш істотне зростання щільності регенеруючих нервових волокон відбувається між 14 і 30 добою. При цьому, не виявлено статистично значущої різниці щільності регенерованих мієлінових нервових волокон за трьох варіантів мікрохірургічного відновлення на ранніх етапах, а починаючи з 30 доби їх щільність статистично достовірно зростає. Встановлено деякі відмінності регенерації мієлінових нервових волокон. Так, на 14 добу діаметр нервових волокон був статистично достовірно більшим при комбінованих техніках з'єднання кукс нерва, а на 30 добу у групі з поліетиленгліколем гідрогелем активність ремієлінізації істотно зростала, хоча на 60 добу ультраструктурні особливості мієлінових нервових волокон не мали суттєвої різниці між групами порівняння. Тобто, в кінцевому рахунку три застосовані техніки мікрохірургічного відновлення травмованого периферичного нерва були ефективні: за використання поліетиленгліколю гідрогелю і фібриновго гелю у рівній мірі збільшується щільність регенерації нервових волокон, а ремієлінізація нервових волокон була швидшою тільки за умов застосування поліетиленгліколю гідрогелю.

Важливе значення у нервово-м'язовому відновленні відіграє денервований м'яз, оскільки його морфофункціональний стан безпосередньо впливає на ефективність функціонального відновлення. Дослідження структурних змін литкового м'яза полягало в аналізі гістологічних і морфометричних змін м'язових волокон та процесів фіброзу. За результатами досліджень зроблено висновок, що вже на 14 добу після перетину сідничого нерва виявляється гіпотрофія м'язових волокон гістологічними методами (зменшення товщини м'яза та поперечної посмугованості) і у наступні терміни ці зміни не відновлювались, тобто гіпотрофія розвивалась досить

швидко. Після нейрорафії сідничого нерва також встановлено гіпотрофію, що підтверджено морфометричними методами, при цьому змін морфометричних показників у кінцевий термін спостереження не відбувалось. Після застосування поліетиленгліколю гідрогелю гіпотрофія м'яза на 14-30 добу доповнювалась гіпертрофією окремих м'язових волокон на 60 добу (збільшення діаметра м'язового волокна, збільшення числа міоядер). У групі з фібриновим клеєм процеси гіпотрофії реєстрували з 30 доби, що може вказувати на часткову затримку структурних змін у денервованому м'язі. З структурними змінами м'язових волокон встановлено ділянки із збільшеною щільністю колагенових волокон, що оцінено як прояв фіброзних змін у денервованому м'язі. Щільність колагенових волокон збільшувалась від ділянки доступу в міони литкового м'яза головним чином по перимізії та вздовж судин, а щільність колагенових волокон між окремими м'язовими волокнами зростала при їх значній гіпотрофії.

Молекулярно-біологічні методи дослідження дозволили виявити активність матриксної металопротеїнази-9 (ММП-9) при повному перетині нерва та після нейрорафії, а також високу позитивну кореляцію цих змін з колагеногенезом, що є новим у дослідженні гіпотрофічних змін при ушкодженні периферичного нерва. За умов застосування фібринового клею фіброзні процеси і активність ферменту, який ремоделює позаклітинний матрикс, були достовірно меншими, а після використання поліетиленгліколю гідрогелю зміни стромальних елементів у литковому м'язі не мали суттєвої різниці від змін м'язів у групі псевдооперованих щурів, а активність ММП-9 не відмічалась, в тому числі проактивної форми, тобто показник не відрізнявся від показника у інтактному м'язі. Як підсумок, тривала денервація викликала гіпотрофію м'яза та ініціювала фіброзні процеси, при цьому виявлені структурні зміни суттєво не відрізнялись від морфологічної картини після застосування епіневральних швів. Водночас, після комбінованої техніки з'єднання кукс перетнутого нерва достовірно затримуються фіброзні процеси при застосуванні фібринового клею і ще

більше – після поліетиленгліколю гідрогелю, що доведено статистичними методами і кореляційним аналізом.

Отже, застосування адгезивних клеїв на основі полетиленгліколю гідрогелю і фібрину можуть бути альтернативою епіневральному шву для відновлення ушкоджених периферичних нервів, це зменшує час коаптації та травматичність, створює оболонку з клею навколо травмованого нерва, забезпечує швидше проростання нерва, затримує розвиток фіброзних змін у денервованих м'язах і параневральному оточенні та дозволяє швидше досягти функціонального відновлення.

Ключові слова: травма периферичного нерва, регенерація периферичного нерва, нейрорафія, поліетиленгліколь гідрогель, фібриновий клей, електронейроміографія, морфометрія, матриксна металопротеїназа.

ANNOTATION

Goncharuk O.O. Features of peripheral nerve regeneration with different variants of its connection in the experiment. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for a Doctor of Philosophy Degree in the field of knowledge 22 "Health Care", specialty 222 "Medicine". - Bogomolets National Medical University, Kyiv, 2021.

The study of the features of regeneration of traumatically damaged peripheral nerve using different options for connecting its proximal and distal segments remains an open problem for modern practical neurosurgery. The effectiveness of microsurgical techniques has a direct impact on the outcome of the recovery of the injured peripheral nerve, both at the level of structural nerve regeneration and muscle reinnervation, and functional recovery of the limb. For a long time, microsurgical repair of the injured peripheral nerve was performed by several microsuture techniques (epi- and perineural sutures). But this approach, although considered the gold standard in nerve microsurgery, has its disadvantages. First, this neurorrhaphy requires a high technical level of performance. Second, suturing involves additional injury to the nerve stumps.

Third, decreased nerve stumps adhesion can decelerate regenerative processes and the strength of nerve neurorrhaphy. To avoid these difficulties and disadvantages, it is proposed to use additional adhesive substrates in the area of the suture of the damaged peripheral nerve, such as hydrogels based on polyethylene glycol and fibrin. In our study, we hypothesized that the use of adhesives (hydrogels) will simplify the microsurgical repair of the damaged nerve, improve the recovery process or not interfere with it. In order to obtain evidence, experimental studies were performed on laboratory animals (80 white outbred male rats weighing 250 ± 25 g, aged 5-6 months). The research algorithm consisted of modeling traumatic damage to the peripheral nerve and assessment of regenerative processes in the dynamics. The full cross-section of the sciatic nerve at the level of the upper third was chosen as the model of the experiment. All experimental rats had section of a sciatic nerve and were further divided into 3 main groups: 1) group with epineural suture (ES) – nerve stumps were connected by 4-6 epineural sutures; 2) group with the use of polyethylene glycol hydrogel (PEG) – nerve stumps were combined with hydrogel, but additionally performed 2 fixating epineural sutures; 3) group using fibrin glue (FG) – nerve stumps were combined with fibrin glue, but additionally performed 2 fixating epineural sutures. The following groups were selected as control groups: 1) intact rats; 2) sham-operated rats (accessed the sciatic nerve without neurotomy); 3) rats with complete neurotomy of the nerve (sciatic nerve was left without connecting the nerve stumps). To analyze the dynamics of recovery processes, three terms were chosen – 14, 30 and 60 day. Research methods: a) functional test – «Walking track analysis» with Sciatic Functional Index (SFI) – a widely used indicator of the condition of the limb in assessing the effectiveness of recovery of the damaged nerve; b) ENMG – the level of neuromuscular recovery was assessed by the parameters of the amplitude of the M-response, the latent period of the M-response and the speed of nerve excitation; c) histological methods – studied the regeneration of nerve fibers through the suture area into the distal nerve segment, morphometrically assessed the number of regenerated myelinated nerve fibers in the distal nerve segment, studied the

morphological changes of muscle fibers in denervated muscles, histochemically and morphometrically evaluated fibrosis processes in denervated muscles; d) molecular biological methods – revealed the presence and level of activity of matrix metalloproteinase-9 in muscles, to study the processes of muscle hypotrophy and fibrosis during denervation. Statistical methods and correlation analysis were used to establish the intergroup difference and determine the most effective method of connecting the stumps of the crossed sciatic nerve.

According to the results of functional tests (SFI), a positive dynamics of recovery of motor function was found in all experimental rats from the 2nd week, which underwent neurorrhaphy or combined connection of nerve stumps with suture and hydrogels. At full cross-section, without neurorrhaphy, there were no signs of recovery according to SFI. Significant increases in SFI were recorded up to week 4, and only with use of PEG increase in the values of the functional test was found. No difference was found between the ES group and with FG group. The obtained results allowed us to conclude that the use of PEG allows to achieve faster functional recovery compared to a standard epineural suture.

The results of ENMG made it possible to obtain more data on the functional indicators of neuromuscular recovery. The study evaluated three parameters of the M-response, between which a statistically significant difference was found. First, in all three groups with microsurgical repair there was significantly smaller amplitude of the M-response of the skeletal muscles of the shin to the 30th day, and on the 60th day amplitude of the negative-positive peak almost reached baseline values (no statistically significant difference between groups). At the same time, after the application of FG, the amplitude of the M-response remained smaller; this indicates less recovery of motor units. Second, the duration of the latent period of the M-response after complete crossing of the sciatic nerve and subsequent microsurgical repair increases relatively to the control values. A significant difference was found between the comparison groups. Thus, after epineural suture and application of sutures with FG, there was an increase in the latency period on the 60th day, the duration of which was higher than the control

values, while in the group with PEG such changes were not detected. The results of the M-response of the shin muscles in the groups with the combined technique of connecting the stumps of the crossed sciatic nerve were highly correlated with the level of nerve regeneration on the 30th day. The characteristic of the indicator at the second month of recovery is explained by the increase in the number of "thin" weakly myelinated nerve fibers after the application of epineural sutures and FG and faster remyelination of nerve fibers in the group with PEG. Third, the rate of excitation conduction at different stages of peripheral nerve regeneration differs. After ES, a decrease in this indicator was found, which can also be explained by an additional increase in the density of thin nerve fibers in the early stages of remyelination on the 60th day. No such dynamics was detected after the use of PEG and FG, that is the level of regeneration of nerve fibers into the distal nerve with this microsurgical technique was higher. Histological and electron microscopic examination of the distal sciatic nerve was performed to obtain morphological evidence of these results.

According to the results of histological examination, three used microsurgical techniques allowed to ensure the regeneration of nerve fibers in the distal part of sciatic nerve. However, some differences were found between the comparison groups. At the level of the epineural suture, regenerative neuroma was formed, which resulted in an increase in nerve thickness (due to epineural thickening, collagen fibers enlargement), and under the use of PEG and FG an encapsulation of the injected substances was additionally recorded. It is concluded that their distribution and diameter are inhomogeneous and are eliminated during the period of nerve regeneration. Thus, focal and multifocal fibrin cells (from 100 to 200 μm) are smaller and are eliminated faster compared to the hydrogel (from 90 to 1600 μm), and the biodegradation and elimination of FG and PEG is consistent, without the appearance of inflammatory infiltrate. The fascicular structure of the distal part of the nerve is preserved and the nerve fibers are regenerated into the preserved fascicles.

Ultrastructural examination and morphometry of myelin nerve fibers in the distal segment of the sciatic nerve were performed. It is found that the most significant increase in the density of regenerating nerve fibers occurs between the 14th and the 30th day. There was no significant difference in the density of regenerated myelin nerve fibers in the three variants of microsurgical repair in the early stages, and from the 30th day their density increases statistically significantly. Some differences in the regeneration of myelin nerve fibers have been found. Thus, on day 14, the diameter of the nerve fibers was significantly larger with the use of combined techniques of nerve stump connection, and on day 30, in the group with PEG, the remyelination activity increased significantly. Although at day 60, the ultrastructural features of myelin nerve fibers did not differ significantly between the comparison groups. That is, eventually the three techniques used for microsurgical repair of the injured peripheral nerve were effective, using PEG and FG equally increased the density of nerve fiber regeneration, and only with PEG remyelination of nerve fibers was faster.

Denervated muscle plays an important role in neuromuscular recovery, as its morphofunctional state directly affects the effectiveness of functional recovery. The study of structural changes in the shin muscles consisted in the analysis of histological and morphometric changes in muscle fibers and fibrosis processes. According to the results of research, it was concluded that on the 14th day the hypotrophy of muscle fibers after the sciatic nerve section is detected by histological methods (reduction of thickness and transverse striation). And in the following terms these changes were not restored, that is hypotrophy developed rather quickly. After sciatic nerve neurorrhaphy muscle hypotrophy was also found. The morphometric parameters were not changed by the end of the observation period. After application of PEG, hypotrophy on the 14th-30th day was supplemented by hypertrophy of single muscle fibers on the 60th day (increase in muscle fiber diameter, increase in the number of myonuclei). In the FG group, hypotrophy was recorded from day 30, which may indicate a partial delay in structural changes in the denervated muscles. Simultaneously with the structural

changes of the muscle fibers, areas with increased collagen fibers density were identified, which was assessed as a manifestation of fibrous changes in the denervated muscle. Collagen fibers density increased from the area of surgical access to the calf muscle myons mainly along the perimysium and along the vessels, and the collagen density between single muscle fibers increased with their significant hypotrophy.

Molecular biological methods allowed to reveal the activity of metalloproteinase-9 at full nerve intersection and after neurorrhaphy, as well as a high positive correlation of these changes with collagenogenesis, which is a novelty in the study of hypotrophy in peripheral nerve damage. Under the use of FG, fibrous processes and the activity of the enzyme that remodels the extracellular matrix were significantly lower, and after the use of PEG, changes in stromal elements in the calf muscle did not differ significantly from the group of sham-operated rats, and the activity of metalloproteinase-9 was not detected, including the proactive form, that is, the value did not differ from the value in the intact muscle. Namely, prolonged denervation caused muscle hypotrophy and initiated fibrotic processes, and the detected structural changes did not differ significantly after epineural neurorrhaphy. However, after the use of combined techniques for connection of the stumps of the crossed nerve, muscle hypotrophy is significantly delayed with the use of FG and even more after the use of PEG, as confirmed by statistical methods and correlation analysis.

Thus, the use of adhesives based on PEG and FG can be an alternative to epineural suture to repair damaged peripheral nerves, it reduces the time of coaptation and associated trauma, creates an environment of adhesive around the injured nerve, provides faster regeneration, delays the development of fibrotic changes in the denervated muscles and paraneural environment and allows to achieve functional recovery faster.

Key words: peripheral nerve injury, peripheral nerve regeneration, neurorrhaphy, polyethylene glycol hydrogel, fibrin glue, electroneuromyography, morphometry, matrix metalloproteinase.

Список публікацій здобувача

1. Goncharuk O, Savosko S, Petriv T, Tatarchuk M, Medvediev V, Tsymbaliuk V. Epineurial sutures, polyethylene glycol hydrogel and fibrin glue in the sciatic nerve repair in rats: functional and morphological assessments in experiment. *Georgian Med News*. 2020 Dec;(309):124-31.
2. Goncharuk OO, Savosko SI, Petriv TI, Medvediev VV, Tsymbaliuk VI. Morphometric study of rat sciatic nerve recovery after three nerve repair techniques: epineural suture, polyethylene glycol hydrogel and fibrin sealant. *Int J Morphol*. 2021;39(3):677-82.
3. Goncharuk O, Savosko S, Medvediev V, Tsymbaliuk V. Quantitative histological assessment of skeletal muscle hypotrophy after sciatic nerve neurotomy and repair in rat model. *Georgian Med News*. 2021 Apr;(313):169-72.
4. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Кореляційний аналіз параметрів електронейроміографії, функціонального тесту з рівнем регенерації травмованого сідничного нерва. *Укр. нейрохірург. журн*. 2021;27(2):34-40. doi: 10.25305/unj.227615.
5. Цимбалюк ВІ, Гончарук ОО, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Лузан БМ. Оцінка функціонального відновлення нервово-м'язового апарату у ранні терміни за умов різних видів з'єднань сідничного нерва при його травматичному ушкодженні в експерименті. В: Зб. наук. праць XVIII з'їзду ортопедів-травматологів України; 2019 Жовт 9-11; Івано-Франківськ. Івано-Франківськ; 2019. с. 197.
6. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Дослідження гіпотрофії скелетних м'язів при травмі сідничного нерва та різних способах його з'єднання. *Укр. наук.-мед. молодіж. журн*. 2021; Спецвип 1, XII Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «спеціальні питання та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору; 2020 Берез 26-27):6-7.

7. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Цимбалюк ВІ. Порівняльний аналіз ефективності мікрохірургічного відновлення сідничного нерва за використання трьох технік: епіневрального шва, гідрогелю поліетиленгліколю та фібринового клею. In: Abstracts VI Ukrainian Winter Neurosurgical Ski Meeting; 2021 Берез 1-3; Bukovel, Ukraine; 2021. с, 54.

8. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Показники електронейроміографії литкового м'язу корелюють з рівнем регенерації сідничного нерва за різних способів мікрохірургічного відновлення. Укр. наук.-мед. молодіж. журн. 2021;(Спецвип 1, XIII Міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених Спеціальні питання та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору; 2021 Берез 18-19; Київ):30.

9. Goncharuk OO, Savosko SI, Petriv TI, Medvediev VV, Tsymbaliuk VI. Comparative analysis of the use of epineural suture, hydrogel DuraSeal and fibrin sealant Tisseel in the restoration of damaged sciatic nerve. Wiad Lek. 2021;74(3 cz 2, International scientific and practical conference, dedicated to the World health day, 2021 April 02; Kyiv):795. doi: 10.36740/WLek202103242.

10. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук М.М., Цимбалюк ВІ. Аналіз ефективності мікрохірургічного з'єднання кінців нерва епіневральним швом, DuraSeal та Tisseel. В: Тези доп. VII з'їзду нейрохірургів України з міжнар. участю; 2021 Трав 11-18; Сиде, Туреччина. с. 34-5.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. Сучасний етап вивчення проблеми нейротомії і особливості використання клеєвих основ для відновлення периферичних нервів при їх ушкодженні.....	27
1.1. Вивчення процесів ушкодження і регенерації периферичних нервів, що розвивається після їхнього повного перетину.....	27
1.2. Застосування фібринового клею та поліетиленгліколю гідрогелю при відновленні ушкоджених нервів.....	43
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження.....	60
РОЗДІЛ 3. Функціональні показники відновлення сідничого нерва при різних способах його з'єднання.....	70
3.1. Результати оцінки функції кінцівки після ушкодження сідничого нерва.....	70
3.2. Результати електронеуроміографії скелетних м'язів кінцівки після з'єднання сідничого нерва.....	75
РОЗДІЛ 4. Морфологічні дослідження травмованого сідничого нерва після мікрохірургічного відновлення.....	82
4.1. Результати мікроскопічних та ультраструктурних досліджень сідничого нерва після різних технік мікрохірургічного відновлення.....	82
4.2. Результати кореляційного аналізу залежності параметрів електронеуроміографії та ефективності регенерації у дистальному сегменті сідничого нерва.....	111
РОЗДІЛ 5. Дослідження структурних змін у денервованих скелетних м'язах після мікрохірургічного відновлення сідничого нерва.....	117
5.1. Результати гістологічних та морфометричних досліджень денервованих скелетних м'язів після невротомії сідничого нерва та відновлення.....	117

5.2. Дослідження фіброзних змін у денервованих м'язах кінцівки щурів після травматичного ушкодження сідничого нерва та мікрохірургічного відновлення.....	127
5.3. Дослідження колагенолітичної активності матричних металопротеїназ у денервованих скелетних м'язах.....	130
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	138
ВИСНОВКИ.....	153
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	155
ДОДАТКИ.....	181

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЕНМГ – електронейроміографія

ЕШ – група щурів із застосуванням епіневральних швів

ММП-9 – матриксна металопротеїназа-9

НО – група неоперованих щурів

ПЕГ – група щурів із застосуванням поліетиленгліколю гідрогелю

ПКМ – позаклітинний матрикс

ПН – периферичний нерв

ПНС – периферична нервова система

ПО – група псевдооперованих щурів

ПП – група щурів з повним перетином сідничого нерва без з'єднання кінців

ФК – група щурів із застосуванням фібринового клею

ЦНС – центральна нервова система

ШПЗ – швидкість проведення збудження

BDNF – нейротрофічний фактор мозку

CNTF – ціліарний нейротрофічний фактор

GDNF – нейротрофічний фактор гліальних клітин

GFAP – гліальний фібрилярний кислий білок

IGF – інсуліновий ростовий фактор

IL – інтерлейкін

NGF – фактор росту нервів

NT – нейротрофін

PDGF – тромбоцитарний фактор росту

SFI – Sciatic Functional Index (з англ. функціональний індекс сідничого нерва)

TNF- α – фактор некрозу пухлин

VEGF – фактор росту ендотелію судин

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Травматичні ураження периферичних нервів кінцівок складають 1,3-6,0 % у структурі загального травматизму [1, 2], а за частотою втрати загальної і, особливо, фахової працездатності зазначений варіант нейротравми у різних країнах світу посідає 2-4 місце у рейтингу нейроушкоджень. Травми та ушкодження нервових стовбурів і, особливо, периферичних нервів кінцівок, складають 2-3 % у населення Канади та Австралії [3]. В США щорічно проводяться приблизно 50000 оперативних втручань на периферичних нервах, при цьому переважають травми периферичних нервів верхньої кінцівки (77 % серед травматичних уражень нервів) [1]. В Україні щорічно діагностується понад 2500 травматичних ушкоджень периферичних нервів. Ураження периферичних нервів нерідко призводить до важких наслідків, адже 28-77 % травмованих стає інвалідами, а інвалідами I-II груп – відповідно 15,5 % постраждалих, переважно молодого та середнього віку, тобто працездатного періоду життя [2]. Серед основних чинників, що впливають на інвалідизацію пацієнтів з травмами периферичних нервів, виділені кілька основних: виражений, постійний больовий синдром; підвищена чутливість до холоду; час, що минув після отримання травми; характер роботи пацієнта та його вік; психологічні фактори; відповідність (адекватність) лікування отриманій травмі [4].

На сьогодні проблема лікування пацієнтів даної категорії є надзвичайно важливою і складною. Вона далека від остаточного вирішення, особливо в плані повноцінного відновлення функції периферичних нервів [4]. Одним з найбільш складних аспектів є першочергове і повноцінне відновлення структурної організації нерва. Ефективність відновних процесів в ушкодженому периферичному нерві безпосередньо залежить від якості оперативного втручання, використання відповідних нейрохірургічних технік і технологій лікування, оперативної практики нейрохірурга, особливостей

проведеного відновлюючого лікування, що залежить від розміру діастазу між центральним і периферичним сегментами розірваного (ушкодженого) периферичного нерва [5-8].

На сучасному етапі розвитку нейрохірургії периферичних нервів вважається загально визнаним, що травматичне ушкодження нерва з невеликим діастазом (<2 см) підлягає прямому хірургічному з'єднанню швами ушкоджених проксимального і дистального сегментів нерва за методом «кінець-в-кінець» [9]. Основною вимогою в даному випадку стає відсутність натягу у хірургічно відновленому нерві, що суттєво порушує перебіг процесів відновлення його функціональної активності в післяопераційному періоді. У клінічних випадках, пов'язаних з важким ураженням периферичних нервів і значною втратою тканини нерва (особливо при комбінованих і вогнепально-вибухових варіантах ураження утворень периферичної нервової системи), має місце не лише значна втрата тканини нерва, але і поява значного діастазу (≥ 2 см), або навіть кількох діастазів. Регенерація нерва у людини в таких умовах стає неможливою без виконання відповідних нейрохірургічних реконструктивно-відновлюючих втручань [10]. В таких випадках надають перевагу аутонейропластиці, невротизації або різним варіантам тубажу периферичного нерва при одночасному виконанні оперативного втручання з метою проведення нейрорафії інших ділянок ушкодженого нерва, або кількох нервів при ушкодженні відповідних сплетінь.

Різні варіанти хірургічного з'єднання сегментів ураженого нерва з використанням шовного матеріалу з метою відновлення цілісності нерва і його функцій мають значну кількість недоліків. В першу чергу незадовільні результати є наслідком неадекватного (неконгруентного) з'єднання проксимального та дистального кінців ушкодженого периферичного нерва. Застосування шовного матеріалу є додатковим травматичним чинником, який впливає на формування невроми, що, в свою чергу, суттєво гальмує

процес посттравматичної регенерації нервових волокон і відповідного функціонального відновлення нерва [11].

Вищезазначене стало науковим підґрунтям для поглибленого та порівняльного аналізу застосування шовного матеріалу та найчастіше використовуваних в нейрохірургічній практиці варіантів з'єднання проксимального і дистального кінців ушкодженого периферичного нерва. В якості альтернативи епіневральним швам розглядаються методики ефективного з'єднання кінців нерва різними клеями (ціаноакрилат, поліетиленгліколь), в першу чергу біологічного походження (фібрин) [12-16]. Спостерігається тенденція до застосування не лише епіневрального шва, але і фібринового клею, окремо або у виді їх комбінації. На сучасному етапі розвитку нейрохірургії лікування нейротомій клейовим з'єднанням та комбінацією різних сучасних нейрохірургічних підходів є прогресивним і науково обґрунтованим [22, 23, 25, 26].

Іншим важливим і мало дослідженим аспектом даної проблеми є ефективність структурного та функціонального відновлення периферичного нерва при зазначених варіантах його відновлюючого з'єднання. В опублікованих матеріалах практично відсутні результати систематизованих досліджень щодо ступеню та послідовності відновлення структурних та ультраструктурних показників нейротомованих сегментів периферичного нерва, органів-ефекторів – відповідних поперечнопосмугованих м'язів, нервово-м'язових синапсів [10, 12, 13, 27]. Важливим залишається також питання метаболічних порушень у денервованих м'язах, які призводять до їх гіпотрофії [28]. Процеси гіпотрофії та наступної атрофії у тривало денервованих м'язах є поширеною проблемою після ушкодження периферичних нервів кінцівки та можуть мати руйнівні наслідки [29, 30]. Тому вдале мікрохірургічне відновлення ушкодженого нерва і своєчасна реіннервація м'язів є тими чинниками, які забезпечать функціональне відновлення кінцівки і попередять структурні зміни у м'язах. Дослідження останніх, а саме змін сполучної тканини у м'язах, розвитку фіброзних

процесів і участі місцевих регуляторів, особливо ферментів, які ремоделюють колагенові волокна, впливають на ступінь їх утворення, є окремою малодослідженою проблемою при відновленні ушкодженого нервово-м'язового апарата [31, 32].

Особливе значення приділяється питанням оцінки функціонального відновлення нервово-м'язового апарата, адаптуються вже відомі і розробляються нові підходи у електрофізіологічних (ЕНМГ) дослідженнях і методи оцінки реіннервації (функціональні тести і проби) [33, 34, 35]. Саме тому комплексному дослідженню структурних основ і регенерації ушкодженого периферичного нерва, змінам у денервованих м'язах та функціональним методам оцінки відновлення після нейрорафії та комбінації швів з фібриновим клеєм, гідрогелем з поліетиленгліколю присвячено дисертаційне дослідження.

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

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідних робіт Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця - «Прогнозування віддалених результатів лікування травми периферичних нервів з використанням сучасних мікрохірургічних та електротехнічних засобів» (термін виконання – 2021-2023 рр.; № державної реєстрації 0118U000154), «Дослідити ефективність новітніх біоінженерних засобів відновлення цілісності периферичного нерва і спинного мозку при їхньому лацераційному ушкодженні» (термін виконання – 2021-2023 рр.; № державної реєстрації 0121U108052).

Мета дослідження.

Покращення результатів хірургічного лікування експериментальної травми периферичного нерва шляхом оптимізації засобів клейового з'єднання його частин.

Завдання дослідження:

1. Дослідити динаміку відновлення моторної функції кінцівки щурів за функціональним індексом сідничого нерва (SFI) після нейротомії сідничого

нерва і з'єднання епіневральними швами, поліетиленгліколем гідрогелем і фібриновим клеєм на 14, 30 і 60 добу.

2. Дослідити електрофізіологічні параметри М-відповіді скелетних м'язів кінцівки на 14, 30 і 60 добу після мікрохірургічного відновлення сідничого нерва.

3. Дослідити гістологічні та морфометричні особливості регенерації сідничого нерва на рівні регенераційної невроми і дистального відрізка нерва на 14, 30 і 60 добу після з'єднання епіневральними швами, поліетиленгліколем гідрогелем і фібриновим клеєм.

4. Дослідити структурні зміни скелетних м'язів на 14, 30 і 60 добу після травматичного ушкодження сідничого нерва і мікрохірургічного відновлення епіневральними швами, з'єднанням поліетиленгліколем гідрогелем і фібриновим клеєм.

5. Дослідити металопротеїназну активність у скелетних м'язах на 60 добу після мікрохірургічного відновлення сідничого нерва епіневральними швами, з'єднанням поліетиленгліколем гідрогелем і фібриновим клеєм.

Об'єкт дослідження: травма периферичного нерва.

Предмет дослідження: функціонально-анатомічні, електронейроміографічні, патогістологічні й морфометричні кореляти відновлення сідничого нерва щура на тлі його повного перетину і різних видів хірургічного з'єднання.

Методи дослідження: експериментальний (моделювання невротомії сідничого нерва), функціональний (функціональні проби денервованої кінцівки, Walking Track Analysis, SFI індекс), електрофізіологічні (амплітуда і латентний період М-відповіді та швидкість розповсюдження біоелектричних потенціалів (імпульсів, мс/мм)), гістологічні (дослідження структурних змін сідничого нерва і скелетних м'язів), гістохімічні (дослідження змін розподілу колагену), електронно-мікроскопічні (дослідження ультраструктурних змін нервових волокон), морфометричні, молекулярно-біологічні (зимограма активності ММП-9), статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів.

1. У дисертації вперше проведено порівняльне дослідження ефективності мікрохірургічного відновлення периферичного нерва шляхом з'єднання кінців нерва епіневральним швом, поліетиленгліколем гідрогелем і фібриновим клеєм.

2. Вперше проведено аналіз морфометричних показників регенерації у дистальному відрізку ушкодженого нерва за трьох технік мікрохірургічного відновлення.

3. Показано, що застосування гідрогелю і фібринового клею збільшує регенерацію мієлінових нервових волокон через ділянку шва нерва, а за результатами SFI тесту і параметрів М-відповіді задньої групи м'язів литки з'єднання кінців нерва гідрогелем пришвидшувало функціональне відновлення нервово-м'язового апарата.

4. Вперше визначено активність ММП-9 у денервованих м'язах кінцівки після ушкодження периферичного нерва, встановлено пряму залежність активності ММП-9 з розвитком фіброзу в м'язах. На основі денситометричних, морфометричних та статистичних методів вперше виявлено пригнічення розвитку фіброзних змін у скелетних м'язах після застосування поліетиленгліколю гідрогелю і фібринового клею.

5. Доведено, що найбільш ефективною мікрохірургічною технікою з'єднання кінців травмованого нерва є комбінація поліетиленгліколю гідрогелю з фіксуючими епіневральними швами.

Практичне значення отриманих результатів.

У дисертаційній роботі з'ясовано переваги клейового з'єднання кукс перетнутого нерва з додатковими фіксувальними швами над класичною нейрорафією, які полягають у скороченні процедури з'єднання, обмеженні хірургічної травматизації кукс нерва, в ізолюванні зони з'єднання від оточуючих тканин і зменшенні локальних побічних тканинних реакцій, що загалом аргументує клінічне використання даної техніки з'єднання. Результати досліджень також можуть бути використані у розробці

методичних рекомендацій, інформаційних листів, матеріалів для практичних занять, семінарів і лекцій.

Особистий внесок здобувача.

Дисертація є власною науковою роботою автора. Спільно з науковим керівником акад. НАН та НАМН України, д-ром мед. наук, проф. В. І. Цимбалюком здобувачем сформовано тему і мету дослідження, завдання роботи. Автором особисто проведено патентно-інформаційний пошук, аналітичний огляд фахової літератури. Самостійно розроблено схему експериментів та обрано методичні підходи до реалізації дослідницької роботи. Особисто та за участі співробітників Інституту нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України виконував експерименти на 80 дослідних тваринах, зокрема разом з канд. мед. наук Т. І. Петрівим здійснював оцінку функціонального індексу сідничого нерва, разом з канд. мед. наук М. М. Татарчуком проведено ЕНМГ дослідження скелетних м'язів. Разом з доц. кафедри гістології на ембріології НМУ ім. О. О. Богомольця канд. біол. наук С. І. Савосько проведено забір матеріалів для гістологічного та електронно-мікроскопічного досліджень сідничого нерва та скелетних м'язів, біохімічних досліджень скелетних м'язів. Здобувачем проведено статистичний аналіз електрофізіологічних досліджень, підрахунки та інтерпретацію SFI-тестів, проведено статистичну обробку результатів морфометричних досліджень. Особисто написано усі розділи дисертації, статті у фахові наукові журнали та підготовлено тези доповідей на наукових конференціях. Здобувач висловлює вдячність за допомогу у виконанні біохімічних досліджень та аналізу результатів співробітникам Інституту біохімії ім. О. В. Паладіна НАН України канд. біол. наук М. М. Гузику та канд. біол. наук А. О. Тихомирову. Глибоку вдячність здобувач висловлює науковому керівнику, а також проф. кафедри нейрохірургії НМУ ім. О.О. Богомольця д-ру мед. наук В. В. Медведєву за допомогу в узагальненні результатів досліджень, обґрунтуванні теоретичних та практичних значень дисертаційної роботи.

Автор висловлює вдячність колегам за підтримку та допомогу в проведенні досліджень.

Апробація результатів дисертації.

Основні теоретичні, методичні та практичні положення дисертації оприлюднені на XVIII з'їзді ортопедів-травматологів України (Івано-Франківськ, Україна, 9-11 жовтня 2019 р.), XII науково-практичній конференції з міжнародною участю "Спеціальні питання діагностики та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору" (Київ, Україна, 26-27 березня 2020 р.), VI з'їзді асоціації нейрохірургів України «VI Ukrainian Winter Neurosurgical Ski Meeting», (Буковель, Україна, 1-3 березня 2021 р.), XIII науково-практичній конференції з міжнародною участю "Спеціальні питання діагностики та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору" (Київ, Україна, 18-19 березня 2021 р.), науково-практичній конференції з міжнародною участю до Всесвітнього Дня Здоров'я (Варшава, Польща, 2 квітня 2021 р.), VII з'їзді нейрохірургів України з міжнародною участю (Сіде, Туреччина, 11-18 травня 2021 р.).

Публікації.

За матеріалами дисертації опубліковано 4 наукові статті, з них 3 індексуються у наукометричній базі Scopus (Q3, Q4) та 6 тез у збірниках наукових конгресів і конференцій.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація викладена українською мовою на 154 сторінках основного тексту і складається зі вступу, п'яти розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, додатків. Список літератури складається з 219 наукових джерел, з яких кирилицею – 21, латиницею – 198. Робота містить 12 таблиць та ілюстрована 48 рисунками.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ ЕТАП ВИВЧЕННЯ ПРОБЛЕМИ НЕЙРОТОМІЇ І ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ КЛЕЄВИХ ОСНОВ ДЛЯ ВІДНОВЛЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНИХ НЕРВІВ ПРИ ЇХ УШКОДЖЕННІ

1.1. Вивчення процесів ушкодження і регенерації периферичних нервів, що розвиваються після їхнього повного перетину

Вивчення травмування периферичних нервів (ПН), різних їх варіантів і типів на сучасному етапі розвитку нейронауки стало надзвичайно актуальною проблемою, незважаючи на понад 170-річну історію її вивчення. Вона була започаткована в 1850 р. А. Waller разом із відкриттям розвитку відповідного типу посттравматичної нейродегенерації [36]. Результати класичних і сучасних досліджень даного типу дегенерації свідчать про існування певної послідовності розвитку морфо-структурних змін у дистальному сегменті нерва. Стадійність розвитку цих змін залежить від типу травми та деяких інших чинників (типу уражених нервових волокон, змін в сомі мотонейронів, характеру процесу й особливостей розвитку патоморфологічних порушень в проксимальному і дистальному сегментах нейротомованого нерва тощо) [37, 39]. Але в будь-якому випадку нейротравма викликає стандартну послідовність розвитку реакцій в різних структурних елементах ПН. В першу чергу спостерігається розвиток так званої «валерівської дегенерації», що супроводжується швидкою структурною дезорганізацією мієлінових оболонок нервових волокон ПН, сформованих в процесі мієлінізації аксонів нерва нейролемоцитами (клітини Шванна) [40]. Цей процес демієлінізації спостерігається, в першу чергу, через 1-2 доби після повного перетину ПН (нейротомії). Одночасно активується розвиток відповідних системних реакцій в шванівських клітинах нерва, супроводжуючись швидким прогресуванням нейродегенеративних реакцій і в інших структурних елементах ПН. В першу чергу це стосується органел

нейронів і спостерігається в мітохондріях, нейрофіламентах і системі мікротрубочок аксонів проксимального кінця ПН після повного механічного перетину [41].

Слід зазначити, що в цих умовах спостерігається реакція некрозу та апоптозу певної кількості мотонейронів, розташованих в передніх рогах спинного мозку. Травма аксонів відповідних нейронів призводить до блокади або порушення активації регенеративних процесів і адекватності розвитку внутрішньоклітинної посттравматичної регенерації аксонів та, відповідно, нервово-м'язових синапсів [37]. У результаті ушкодження мотонейронів і загибелі певної їх кількості в майбутньому кількість новоутворених (тобто регенеруючих) аксонів різко зменшується, а процеси структурно-функціонального та метаболічного відновлення не забезпечують ефективну репаративну активність м'язової системи в посттравматичному періоді [38].

Встановлено, що процес постнейротомічної деструкції ушкоджених аксонів ПН в шарах мієлінової оболонки відповідних аксонів реалізується за безпосередньої участі резидентних функціонально активних нейролемоцитів. Якщо в нормальних умовах у відповідний період онтогенезу ці клітини забезпечують процеси мієлінізації аксонів, то після травматичного ушкодження ПН спостерігається діаметрально протилежна реакція [40, 48]. Мова йде про фрагментацію, тотальне ушкодження й утворення так званих «овоїдів» мієлінових оболонок, розташованих в дистальному сегменті ушкодженого нерва. Дегенеративні процеси розвиваються не лише в дистальному, але і в проксимальному сегментах ушкодженого ПН. Цей процес отримав назву ретроградної дегенерації компонентів нерва (на відміну від антероградної) [49]. Спостерігається зміна хімічного середовища нерва на тлі розвитку імунодефіцитного стану та інших невідкорегованих порушень метаболічного гомеостазу і рН тканин в зоні ураження її клітинного складу. Одночасно розвиваються й інші зміни, які сприяють активному проникненню в сегменти нерва лімфоїдних клітин (лімфоцитів, макрофагів), накопиченню медіаторів запальних реакцій. Це призводить до

активації процесів поглинання клітинами некротизованих або нежиттєздатних клітин та їх фрагментів, речовин дегенерованих тканин в зоні ураження, що сприяє поступовому знищенню та ліквідації цих об'єктів іншими клітинами (в тому числі за рахунок фагоцитарного механізму) [50].

Активація та послідовний розвиток системних захисних реакцій організму (в тому числі за рахунок індукції активованими шванівськими клітинами окремих класів макрофагоцитів та інших клітин) створюють умови для ліквідації дегенеративної мієлінової оболонки. Це відбувається також внаслідок утворення і виділення не лише в тканини, але і в кровообіг біологічно активних речовин і факторів різними типами клітин (і, особливо, макрофагами і лімфоїдними). На початкових етапах процесу існує велика кількість факторів і чинників тканинного ушкодження, розвитку реакцій запалення, апоптозу і некрозу, реалізації так званих «санаційних реакцій» і процесів (прозапальні цитокіни, TNF- α , оксидативні радикали, пептиди, деякі інші) [52, 53]. Розвиток цих реакцій, ґрунтовне вивчення яких є предметом дослідження патофізіологів, створюють основні передумови для того, щоб на більш пізніх етапах розпочались і завершилися послідовні процеси регенерації аксонів до достатнього функціонального рівня [54]. Ці процеси розвиваються в умовах суттєво зміненого нейрохімічного мікрооточення в зонах ураження ПН, а також вираженого перерозподілу і накопичення певних типів клітин, в тому числі й поліпотентних стовбурових клітин (особливо їх біохімічної гетерогенності та синтезу різних речовин активності) [55].

Процеси регенерації аксонів мотонейронів практично не відбуваються в умовах, коли порушуються процеси інтенсивної проліферації нейролемоцитів. Усі клітини при цьому синтезують значну кількість біологічно активних речовин, тому це питання вимагає більш детального розгляду.

Регенеративний потенціал шванівських клітин є дуже важливим питанням. Мітоз-асоційований процес проліферації цих клітин спостерігається вже в перші дні після повного перетину ПН, досягаючи

максимальної активності впродовж другої і третьої декад першого місяця після нанесення травми. Проліферація значної кількості нейролемоцитів та їх концентрування в області ушкодженого ПН супроводжується поступовим утворенням повздожньо орієнтованих мультиформних утворень – так званих «стрічок Бюнгнера», що локалізуються в області дистального сегмента ПН після його перетину або інших травматичних уражень нерва [56]. Синтез і виділення цими клітинами певних речовин (циторегуляторів) активує процеси регенерації аксонів мотонейронів, які активно використовують ці «стрічки» з метою спрямованого проростання регенеруючих нейритів в зони органів-мішеней. Відповідним чином реагують й інші численні структурні компоненти регенеруючого нерва – судини різних типів, оболонки нерва (наприклад, періневрій, ендоневрій) та інші. В умовах активного і спрямованого проростання аксонів спостерігається не лише активна проліферація шванівських клітин, але і суттєві зміни хімічного складу мікрооточення регенеруючого нерва. В ендоневрії, наприклад, змінюється склад і кількість основних компонентів сполучної тканини, таких як гіалуронова кислота, кислих мукополісахаридів, зменшується вміст колагенових волокон [57].

Структурними особливостями регенерації аксонів є формування відповідних нейритів з проксимального сегмента травматично ураженого нерва – не одного, а одночасно кількох відростків та їх гілок (спраутінг) від термінальної області («потовщення») проксимального відрізка периферичного нерва [58]. Біологічний сенс появи даного типу новоутворених нервових волокон полягає в тому, щоб вони могли досягти дистального сегмента і прорости в нього до «стрічок Бюнгнера», сформованих із залученням в реакцію нейролемоцитів. Після цього відповідні регенеруючі аксони отримують потужний хімічний спрямовуючий вплив щодо напрямку проростання. В той же час інші регенеруючі відростки поступово втрачаються, тобто підлягають редукції [45]. Як зазначалось вище, подальше проростання регенеруючого аксона відбувається у напрямку органа-

мішені (наприклад, м'яза). Цей процес відбувається надзвичайно сповільнено. Враховуючи той факт, що механічна нейротравма, яка супроводжується повним перетином ПН, відбувається на значній відстані від тіл мотонейронів, це суттєво сповільнює процеси регенерації і всебічного відновлення нормальної іннервації м'язів кінцівок [46, 47]. Клінічно було доведено, що цей процес у пацієнтів часто залишається незавершеним або неефективним. Це суттєво погіршує клінічні результати, ефективність лікування і, внаслідок цього, відновлення професійних здібностей та ресоціалізацію осіб [59].

Процеси регенерації аксонів відбуваються завдяки кільком (відомим на сьогодні) основним дієвим механізмам. Доведено, що після повного перетину ПН і прогресування механізмів антеградного (в першу чергу) і ретроградного типів дегенерації аксонів мотонейронів значна кількість нервових клітин зберігає значний потенціал для відновлення (тобто регенерації) ушкоджених власних відростків. Процеси, що могли б викликати деструкцію проксимальної частини нейрита внаслідок розвитку нейродегенеративних процесів, блокуються внаслідок активації інтранейрональних цитопротекторних процесів (наприклад, механізмів мембраностабілізації), а також впливу на нейрони ендогенних нейротрофічних факторів [60]. До цього класу речовин відносяться молекули нейротрофінів нейронального (NGF, BDNF, NT 4/5), гліального (GDNF) походження, а також нейрокіни (VGNF, CNTF тощо). Ця група цитокінів нейротрофічного походження синтезується різними типами клітин, що формували ЦНС і периферичну нервову систему (ПНС) [61]. Молекули вказаних речовин в різній мірі активують механізми нейропротекції, сприяють активному перебігу проліферативних процесів. Іншим важливим механізмом дії молекул нейротрофінів і нейрокінів, на який звертають увагу дослідники проблеми, є поєднання їх високої проліферативної активності з одночасним активуючим впливом на процеси диференціації відповідних типів нервових клітин [62, 63, 66]. Це питання вимагає більш детального обговорення і висвітлення

теоретичних і практичних аспектів даної проблеми. Так, було встановлено, що нейротрофічні фактори, в першу чергу NGF, BDNF, здійснюють вплив, направлений на збільшення кількості стовбурових клітин і клітин-попередників в області травматичного ушкодження і дистального сегмента ПН, та мають потужний активуючий вплив на процеси диференціації клітин для відновлення клітинного гомеостазу [64]. Молекули інших речовин, що входять в групу ендогенних клітинних регуляторів, володіють цілим рядом інших механізмів дії. Деякі з них корегують реакцію мотонейронів на ушкодження аксонів ПН, що передують активації процесів диференціації незрілих клітин (попередників) та компенсації втрачених мотонейронів [65]. Таким потужним впливом володіє нейротрофічний фактор BDNF, в той час, як нейротрофіни NT3 та NT-4/5 володіють гліопротекторною дією, направленою на резидентні нейролемоцити, локалізовані в області уражених нервів [66]. Аналогічну дію здійснюють й інші фактори тканинного росту, наприклад, PDGF. Для молекул факторів росту загальним в їх механізмах дії є захист клітин від загибелі і поступове відновлення клітинного складу моторних і сенсорних клітинних утворень спинного мозку. Це стає цитологічним підґрунтям для подальшого відновлення утворень даного відділу локомоторного аналізатора [67].

Процеси регенерації моторних нейронів супроводжуються активацією процесів росту аксонів, що забезпечує ефективне проростання через зону травматичної альтерації в дистальний сегмент ушкодженого ПН. Під впливом нейротрофінів виживання моторних і сенсорних нейронів забезпечує системне відновлення ураженого периферичного нерва і, нарешті, реіннервацію скелетних м'язів [68]. Такою дією володіють не лише ендогенні фактори (CNTF – представник групи нейрокінів), але і деякі інші біологічно і фармакологічно активні речовини [69]. Було також встановлено, що фактор росту, який синтезується гліоцитами (GDNF, як і BDNF), володіє надзвичайно потужною нейротрофічною дією, яка реалізується переважно в мотонейрональну протекторну дію. Вони також активують відновні процеси і

ріст аксонів після експериментальної нейротравми. Одночасно з цим відбуваються активні процеси мієлінізації, або ремієлінізації збережених осьових циліндрів [70]. Комплекс цих реакцій і відповідь клітин на ушкодження власних відростків спрямовані не лише на виживання клітин, регенерацію нейритів, їх проростання через зону ушкодження в дистальний сегмент ПН, але і утворення сполучнотканинного рубця. Нейробіологічним сенсом всіх цих відновлювальних процесів є максимально швидка реабілітація та реіннервація під впливом трофічних факторів порушеної іннервації скелетних м'язів і попередження гіпо- і атрофічних процесів, що розвинулись на тлі посттравматичної денервації. Ці події взаємопов'язані, а повноцінність розвитку регенеративних процесів в руховому нерві і м'язах обумовлені дією різних факторів, а не лише специфічних (для нервової системи) нейротрофічних факторів. Так, на процеси регенерації шванівських клітин активно впливають тромбоцитарний фактор росту (PDGF). Окремі нейротрофіни (CNTF, BDNF, NGF) реалізують гліопротекторну дію, а на більш пізніх етапах – активують процеси спрямованої диференціації цього типу нервових клітин [71]. Інсуліновий ростовий фактор (IGF) і ціліарний нейротрофічний фактор (CNTF) володіють іншими механізмами відновлювальної дії, особливо у тому випадку, коли їх вміст зростає у денервованих позмугованих м'язах одночасно із активацією процесів синтезу факторів м'язового походження [12, 13]. Ця група факторів (як і GDNF), активує процеси клітинного виживання в цілому і спрямованого диференціювання сенсорних і моторних нейронів спинного мозку. Як зазначалось вище, цитопротекторна дія нейрокінів і нейротрофінів супроводжується стимулюючим впливом на спраутинг аксонів збережених клітин [72].

Вказані результати були отримані також і на моделі перетину сідничого нерва, коли з метою поліпшення результатів нервово-м'язового відновлення були застосовані нейротрофічні фактори і ламінін у штучному протезному матеріалі [73, 74]. Іншим важливим чинником регенерації нерва виявився

фактор росту ендотелію судин (VEGF), який ефективно впливав на зазначені процеси навіть в умовах гіпоксії [27]. Додатково VEGF забезпечує швидкі процеси реваскуляризації ПН, що покращує процеси регенерації аксонів, а також міграцію нейролемоцитів і стовбурових клітин в ділянку проростання новоутворених аксонів. Таким чином, всі ці процеси не лише безпосередньо, але і опосередковано направлені на відновлення структурної і функціональної цілісності ушкодженого ПН. Але основним в цьому процесі залишається інше – відновлення рухової функції кінцівки (або кінцівок) в результаті поновлення іннервації посмугованих м'язів, подолання в них наслідків розвитку часткових гіпотрофічних або важких атрофічних процесів. Слід зазначити, що часто ці події відбуваються протягом тривалого часу і характеризуються низькою терапевтичною ефективністю, що відбувається внаслідок малої активності перебігу відновних і регенеративних процесів, недостатності синтезу і виділення в міжклітинний простір і кровотік окремих факторів або через невідповідне залучення різних типів клітин.

На сучасному етапі розвитку нейронауки і, особливо, нейрохірургії, існує кілька основних шляхів для вирішення глобальної проблеми відновлення периферичних нервів за умов їх травматичного ушкодження. Розглянемо основні. В першу чергу, необхідно відзначити так звану «тканинну інженерію», яка є центральним і багатообіцяючим напрямом досліджень [75]. З цією метою розробляються системи доставки ліків, регуляторних факторів і клітин в ділянку ураження ПН. Зазначені чинники здатні ефективно спрямовувати ріст відростків або впливати на проникність нейритами новоутвореної рубцевої тканини. Іншим технологічним рішенням «тканинної інженерії» при вирішенні питань лікування травматичних ушкоджень нервової системи є доставка в зону ушкодження специфічних нейротрофічних та інших регуляторних факторів (медіаторів процесів регенерації, фармакологічних препаратів) [73]. Вагомим напрямом даного шляху вирішення проблеми є застосування нових синтетичних протезних

конструкцій відповідних форм і розмірів, які використовуються з метою лікування уражень не лише периферичної, але і центральної нервової системи шляхом, наприклад, ефективного з'єднання сегментів ушкодженого периферичного нерва для забезпечення успішної нейропластики і структурного відновлення [5-7]. Теоретичне обґрунтування та аналіз практичного використання вищезазначених підходів стало підґрунтям для їх комбінованого використання.

Доставка в ділянку ушкодження ПН певних типів стовбурових клітин, лікарських засобів або пептидів і ростових факторів, факторів екстрацелюлярного матриксу відбувається в порожнинах розроблених технологічних конструкцій (наприклад, протезах різної форми і складності) [18]. Це забезпечує ефективне й орієнтоване проростання регенеруючих нейритів в період їх індукованого спраутингу [15-17]. Проведення додаткового нейрохірургічного втручання забезпечує покращення структурно-функціональних особливостей відновлення ПН.

Як варіант лікування повного перетину ПН окремо розглядаються різні методики і технології з'єднання кінців периферичного нерва з метою покращення регенерації нерва та профілактики розвитку атрофічних і дегенеративних процесів в посмугованих м'язах. При цьому вивчаються не лише класичні варіанти епіневральної фіксації сегментів нерва, але і використовуються деякі біосумісні адгезивні речовини (фібриновий клей, поліетиленгліколь гідрогель та ін.) [15, 16, 19-21]. Ці типи лікування вважаються основними сучасними напрямками вирішення проблеми ефективного з'єднання і відновлення травматичних ушкоджень ПНС.

За рахунок чого досягаються позитивні результати? Розглянемо ці основні напрями сучасної нейрохірургії ПНС. В першому випадку, що ґрунтується на використанні інноваційних клітинних технологій (і в тому числі поліпотентних стовбурових клітин), було встановлено, що прискорення процесів регенерації аксонів і перебігу відновних процесів в гіпотрофічних посмугованих м'язах відбувається не лише у зв'язку з різким збільшенням

незрілих поліпотентних клітин в області регенеруючих тканин. Це пов'язано також з виділенням клітинами в міжклітинний параневральний простір значної кількості ростових і нейротрофічних факторів, речовин-регуляторів прискороного тканинного відновлення, молекул-інгібіторів запальних реакцій, внаслідок гальмування нейродегенеративних та міоатрофічних процесів, що супроводжують нейротравму ПН [86, 87]. Введення в ділянку нейротравми стовбурових недиференційованих клітин (на відміну від зрілих) забезпечує активні процеси їх фіксації в тканинах організму, активує проліферативні реакції та їх кількісний ріст, встановлення активних структурно-функціональних взаємовідносин з клітинами організму реципієнта [88, 89]. Залученням екзогенних стовбурових, а не аутологічних клітин вдається досягти активації відновних процесів в травматично ушкоджених ПН. Це відбувається за рахунок кількісного збільшення в нерві шванівських клітин, збільшення їх функціональної активності. Останні виконують основні регенеративні процеси щодо відновлення ушкодженого нерва, попередження розвитку реакцій апоптозу (в т.ч. і в мотонейронах) і незворотніх атрофічних змін в посмугованих м'язах кінцівок [91]. Використання стовбурових клітин з метою покращення регенерації травматично ушкодженого нерва при повному перетині стає ефективним фактором реалізації цієї мети лише у тому випадку, коли внаслідок кількісного зростання клітин з направленим типом диференціювання стовбурових клітин збільшується кількість шванівських клітин. Специфічна активність цих клітин під впливом введення в культуральну рідину реагентів і факторів не змінює профіль (лінію) і диференціацію використаних незрілих клітин (шванівських клітин, мезенхімальних клітин червоного кісткового мозку) [93, 99]. Порушені процеси диференціювання стовбурових клітин і погіршення результатів їх використання автори пов'язують з трансдиференційними змінами новоутворених спеціалізованих клітин нервової системи, порушенням процесів їх асоціації з клітинами периферичного нерва, його натуральним клітинним складом і хімічним

оточенням [91]. Особливо часто це трапляється у ситуації, коли під час поступового нарощування кількості відповідних клітин в культуральному середовищі, необхідних для відновлення, відбувається застосування додаткових речовин і ростових факторів, порушення процесів диференціації клітин [94, 95]. При цьому відбувається кардинальна зміна їх біологічних властивостей, і навіть значна кількість імплантованих клітин в зону ураження не забезпечує досягнення відповідного лікувального ефекту, достатню кількість контактів з резидентними клітинами і виживання цих клітин в нейрохімічному середовищі нейротомованого периферичного нерва [96]. Таким чином, найбільш ефективним для вирішення цієї проблеми вважається використання незрілих поліпотентних стовбурових клітин, або їх аналогів – трансдиференційованих або предиференційованих клітин з фенотиповими проявами шванівських спеціалізованих нервових клітин в області периферичних нервів [97]. Про це свідчать не лише їх структурно-функціональні особливості, але і здатність активувати процеси проростання терміналей аксонів в «стрічки Бюнгнера», успішно виживати клітинам після імплантації в нове для них середовище, а також здатність стовбурових, але частково диференційованих клітин, до активного синтезу та виділення в мікросередовище ПН значної кількості біологічно активних речовин і факторів [98].

Взаємодія між клітинами різних типів з імплантованими клітинами, їх здатність інтегруватись в загальний клітинний кластер ПН та виділення значної кількості нейротрофінів і ангиогенних факторів забезпечують основні регенераторні функції елементів ураженого ПН. В першу чергу це стосується впливу даних чинників на процеси ремієлінізації існуючих аксонів та мієлінізації проростаючих новоутворених аксонів [99-101]. Процеси регенерації нейритів в значній мірі визначаються ступенем диференціювання неаутологічних імплантованих клітин [102]. Мультитерапевтична та нейропротекторна дія зазначених клітин і продуковані ними молекули речовин крім активації процесів мієлінізації додатково впливають на зміни,

що відбуваються в екстрацелюлярному матриксі. Імплантовані клітини не лише впливають на процеси синтезу в клітинах сполучної тканини молекул колагенів I та IV типів, ламініну і деяких інших речовин, що оптимізують і синхронізують процеси регенерації ПН [98].

Як і зазначалось, імплантація клітин також суттєво впливає на функціональну активність ендогенних клітин організму, в першу чергу шванівських і термінальних нейролемоцитів. Це, в свою чергу, прямо і опосередковано пришвидшує нейритогенез і повноцінне відновлення ушкодження нейротомованого нерва [101]. У цих типів клітин виявлено явище утворення і секреції фактора росту нерва, нейротрофічного фактора, а також нейротрофіну 3 (NT3). Більшість з цих факторів продукуються як імплантованими клітинами, так і власними (ендогенними) шванівськими клітинами макроорганізму [103].

Дія цих факторів суттєво підсилюється або коригується нейроімуниними факторами, що активно і тривало здатні синтезуватись стовбуровими клітинами. До цієї групи речовин відносяться деякі колонієстимулюючі фактори, інтерлейкіни (IL1, IL6, IL7, IL8, IL11) і фактор некрозу пухлин [104]. Молекули вказаних речовин є активними нейроімунокоригуючими факторами, що володіють вираженою протизапальною дією. Вони також гальмують утворення (після оперативного втручання на ПН і алогенних клітинах) фіброзних і рубцевих формувань в області повного перетину нерва [88]. Подібні результати були отримані при проведенні структурно-морфологічних і електроміографічних досліджень в експериментальних систематизованих оглядах [107, 108]. На сьогодні використання саме мезенхімальних стовбурових клітин є загально визнаним, незважаючи на значний проліферативний потенціал ембріональних стовбурових клітин [105, 106] або стовбурових клітин, отриманих з певних відділів мозку (нюхової цибулини, зубчатої звивини гіпокампу, субвентрикулярної зони великих півкуль головного мозку) [109, 110]. Результати інших досліджень дозволили встановити, що ці клітини за рахунок активного виділення молекул різних

ростових факторів і білків здійснюють інші механізми дії. При їх імплантації в зону ураження ПН одночасно з клітинами Шванна набагато ефективніше стимулюються процеси регенерації в ушкодженому периферичному нерві [51]. Авторами доведено позитивний вплив вищезначених стовбурових клітин на процеси активації функцій нейролемоцитів периферичного нерва, забезпечення перебігу реакцій активної мієлінізації регенеруючих, тобто новоутворених, аксонів проксимального сегмента цього ж нерва [111, 112]. Необхідно підкреслити, що ще одним важливим джерелом стовбурових клітин, що використовуються для регенерації ушкоджених периферичних нервів, ґрунтовно досліджені та останнім часом перевірені з цією метою клітини нервового гребеня [124]. Ці клітини утворюються в період ембріогенезу. Формування специфічної осьової структури – нервової трубки – відбувається із спеціальних клітин ектодермального походження. На більш пізніх етапах ембріогенезу ці клітини мігрують у відповідні відділи мозку, з яких і відбувається формування клітинних та системних утворень периферичної нервової системи [113]. Імплантація цих клітин, які в умовах культивування в дефінітивному стані стають зрілими нейронами, і частково шванівськими клітинами і навіть ендокриноцитами-фіброластами і міофібробластами, посилює процеси росту нейронів і гліоцитів ПНС, що здатні на кількісне збільшення в зоні імплантації [114-117]. В культурі *in vitro* ці клітини також здатні до клонального росту і мультилінійного диференціювання. При експериментально спрямованій зміні умов культивування цих стовбурових клітин спостерігалось перетворення останніх не лише в нейрони, але і в гліальні клітини, про що свідчила експресія GFAP та інших нейроспецифічних молекул. Ці перетворення дозволили їх використання для імплантації, що, в свою чергу, активувало процеси регенерації ПН в експерименті при значному дефекті ПН і використанні різних моделей його ушкодження [120]. Спостерігалось відновлення не лише клітинної структури, мієлінізація аксонів, але і відновлення функціональної активності ПН [118, 121, 124, 125]. Слід відзначити значну тривалість впливу

стовбурових і диференційованих клітин не лише на процеси регенерації аксонів у ПН, але і на активність ремієлінізації новоутворених нейритів мотонейронів [123]. Таким чином, на сучасному етапі розвитку нейрохірургії для вирішення актуальної проблеми відновлення травматично ушкоджених ПН (особливо при наявності значних дефектів нерва) можуть успішно використовуватись різні варіанти клітинних технологій, серед яких стовбурові клітини (особливо нервового походження) і спрямовано диференційовані клітини здійснюють особливо виражену дію в цьому напрямі. Але отримані результати практичного використання клітин в клінічній практиці, як виявилось, не задовольняють нагальних потреб фахівців і пацієнтів.

Використовуючи створений нейронауковий фундамент, фахівці, як зазначалось вище, звернули увагу і на практичну реалізацію принципів і засобів тканинної інженерії [126], метою якої є розробка і використання певних конструктів або субститутів, що забезпечують тканинне відновлення, оптимізують або покращують функцію ушкодженого периферичного нерва. Автори робіт підкреслюють, що оптимальним варіантом лікування травми ПН, яка супроводжується повним його перетином, є використання не одного варіанту, а комплексного підходу із використанням клітин (наприклад, мультипотентних стовбурових клітин) і різних біоінженерних систем (природних або хімічних матеріалів), разом із молекулами екстрацелюлярного середовища, ростовими факторами [82, 84].

Різні способи мікрохірургічного з'єднання давно і успішно використовуються для етапного або послідовного відновлення структури і проведення нервових імпульсів по волокнам регенеруючого периферичного нерва. З цією метою, використовуються наступні основні підходи і методи – застосування шовних матеріалів і різних типів зшивання сегментів нерва, аутонейропластика, невротизація, використання не лише алотрансплантації сегментів інших периферичних нервів, але і різних ксенобіотичних матриксів. Ці методики спрямовані на активацію процесів регенерації,

зближення сегментів ушкодженого ПН і їх з'єднання в умовах, що виключають можливість повторної травматизації проксимального і дистального кінців нерва [127]. Аутонейропластика (в різних модифікаціях) успішно використовується при неможливості спонтанної регенерації ПН, наприклад, при дефекті значного розміру, що перевищує 3 см [128]. Суттєве покращення результатів оперативного лікування було досягнуто в 50-60 роки минулого століття завдяки розробці і практичному використанню мікрохірургічних методик [129, 130, 131]. В той же час, цей тип клініко-хірургічних втручань має і цілий ряд суттєвих недоліків. Так, їх виконання для відновлення ушкодженого моторного нерва за рахунок чутливих нервів, які не відповідають структурно-функціональним і нейрохімічним особливостям рухового ушкодженого нерва, впливають на функціональне відновлення останнього. Виконання цих операцій не лише пов'язане із необхідністю додаткового оперативного втручання (з метою отримання сегмента нерва для трансплантації), але і утворення двох зон нейрорафії, формування невром і рубців в області нейрорафій [132]. Ці процеси викликають погіршення або повне гальмування процесів проростання новоутворених аксонів мотонейронів в дистальний сегмент ушкодженого ПН. При цьому порушуються процеси проліферації нейролемоцитів (шванівських клітин), що, в свою чергу, погіршує здатність цих клітин брати участь в процесах мієлінізації аксонів спинальних мотонейронів [133, 134, 135].

Особливу увагу було приділено вивченню і використанню в нейрохірургії різних синтетичних компонентів з метою успішного відновлення ушкоджених ПН. На відміну від ало- та ксенотрансплантації сегментів нерва використання позбавленого клітин (тобто, ацелюлярного) трансплантанта периферичного нерва і, фактично, біологічного матриксу, повино було забезпечувати направлене проростання новоутворених аксонів. Але виявилось, що сама методика підготовки трансплантанта (використовувалась дія факторів, методів, хімічних речовин і ензимів

(хондроїтиназа)) викликала значну деструкцію клітин і тканин не лише донора, але і реципієнта [79, 77, 136].

Отримані негативні результати клінічного застосування ацелюлярного алотрансплантанта також вимагали вирішення питання розробки більш перспективних методик оперативного лікування дефектів периферичних нервів [137, 138]. Для їх вирішення були застосовані 2 основних типи оперативних втручань. Мова йде про методики тубажу, коли кінці ушкодженого нерва з'єднуються природними чи синтезованими матеріалами у виді порожнистих і паралельно направлених трубчастих утворень. Відповідна орієнтація трубок, отриманих з полігліколевої кислоти забезпечувала покращене проростання аксонів проксимального кінця в дистальний сегмент ПН [139, 140, 141]. Але і ця оперативна методика лікування виявила обмежену здатність (в експерименті, а пізніше – клінічно) активувати процеси відновлення ПН [94]. В той же час, ця здатність суттєво зростає при комбінованому використанні шарів порожнистих трубок з різними факторами і шванівськими клітинами, застосування яких можливе при невеликих дефектах нервів [142, 143].

Одночасно розроблялись й інші, тобто альтернативні, варіанти лікування значних ушкоджень дефектів периферичних нервів. Слід зупинитись на цих методиках і впливі різних модифікацій з'єднання проксимального і дистального елементів ПН на процеси регенерації нерва, а також на попередження розвитку атрофічних процесів в денервованих посмугованих м'язах. Вважається, що досягти цієї мети можливо також завдяки комбінованому використанню епіневрального варіанту фіксації обох кінців ушкодженого нерва (при відсутності діастазу) і використанні різних типів адгезивних речовин (фібринвмісних, поліетиленгліколю та інших типів гідрогелів). Перевагами використання цього варіанту пластики дефекта нейротомованих ПН є активне зменшення кількості міофіброblastів в длянці травми, попередження інфільтрації і набрякання області шва, гальмування процесів утворення невром і, особливо, рубцевої системи в регенеруючому

нерві, і, можливо, утворення відповідного мікрохімічного оточення, що зможе забезпечити позитивну динаміку цих процесів. Детальному розгляду цих та інших питань проблеми присвячено наступний розділ дисертаційного дослідження.

1.2. Застосування фібринового клею та поліетиленгліколю гідрогелю при відновленні ушкоджених периферичних нервів

Незважаючи на здатність периферичної нервової системи (ПНС) до регенерації, функціональні ушкодження нерва зазвичай лікують методом, вибір якого залежить від тяжкості та тривалості ушкодження нерва, від використання пасивних і активних вправ після травми та диспозиції культів нерва [14, 144-146]. Після розриву нерва відбувається прогресуюче скорочення культів нерва. Особливо це впливає на затримку його регенерації. Крім того, більші розриви погіршують перспективи функціонального відновлення [14].

Результати мікрохірургічного поєднання кінців периферичного нерва у людини в аспектах рухового і сенсорного відновлення є непередбачуваними і часто розчаровують. Загалом, чим дистальніше місце травми нерва та більш молодий пацієнт, тим кращим є функціональний прогноз. Пошук техніки з'єднання культів нерва, що дає результати, які б перевершували традиційні методи, залишається важливим завданням. Коаптація розрізаних кінців нерва за допомогою швів є ефективною, але і травматичною для нерва [16].

На сьогодні існують три основні методи відновлення пересіченого нерва: наскрізна нейрорафія, пластика нерва та тубулізація. Золотим стандартом коаптації ушкоджених периферичних нервів залишається наскрізна нейрорафія завдяки забезпеченню найкращих функціональних результатів [147-149].

Також, за сучасними уявленнями, успішне поєднання кінців нервів повинно бути без напруження нерва. Отже, аутологічні нервові

трансплантанти зазвичай вважають необхідною процедурою у випадку втрати тканини і неможливості прямого оперативного втручання [72, 148]. Проте, даний підхід має деякі обмеження, наприклад, необхідність виконання двох хірургічних процедур на різних ділянках, що призводить до більших ускладнень та зменшенню доступних нервових донорських ділянок, а також дефіциту чутливості в області, з якої видалили донорський нерв [14].

Тубулізація – це хірургічна процедура, в якій культі нерва вводяться і закріплюються всередині трубчастого протезу, що слугує для росту нервів, блокуванню інвазії тканинного рубця й уникненню утворення невроми. Тубулізація також дозволяє оптимізувати регенерацію шляхом додавання прорегенеративних факторів в протез, таких як стовбурові клітини або нейротрофічні фактори [75, 150-152]. Для відновлення розривів нерва використовуються різні біологічні та небіологічні трубки. Біорозкладні полімери мають перевагу при використанні внаслідок уникнення необхідності другої операції з видалення протеза, а також збереження регенованого нерва [150-155].

Незважаючи на конкретний тип техніки, що використовується для відновлення ушкодженого нерва, наскрізна нейрорафія або тубулізація, звичною формою для повторного з'єднання ушкоджених кінців нерва є їх ушивання. Однак, наявність шовного матеріалу може впливати на точне вирівнювання культів нерва і формування невроми в ділянці анастомозу, що зумовлено гранулематозною реакцією на шовну нитку [149]. Крім того, кількість шовного матеріалу, що перетинає прооперовану ділянку, може негативно впливати на результати відновлення нерва [14, 149]. Використання альтернативних способів, таких як фібриновий клей, у деяких випадках може замінити шов. Застосування фібринового клею є швидким і простим у використанні, що скорочує час операції і дозволяє склеїти тканини швидко, без необхідності накладання швів і з меншим ризиком інфікування [14]. Проте, залишається сумнівним забезпечення задовільних гістологічних

результатів після використання даної техніки відновлення (наприклад, направлених нервових волокон, спраутинг аксонів тощо).

Потенційні переваги використання біологічних клеїв для відновлення нервових закінчень полягають у зменшенні часу хірургічних втручань, зменшенні часу відновлення, а також зниженні фіброзу та запалення. Водночас, це забезпечує коаптацію розірваних нервових пучків з мінімальною індукованою травмою і нервовою рубцевою тканиною [15]. Використання хірургічних швів у комбінації з штучними або біологічними клеями може подолати ряд проблем, пов'язаних з нервовими анастомозами, таких як розрив останнього в післяопераційному періоді [156, 157].

Хоча досконалого фібринового клею на сьогодні не виявлено, як аутологічні, так і комерційно доступні суміші є популярними і зручними засобами в нейрохірургії [16].

Використання фібринового клею для відновлення периферичних нервів почалося в 1970 рр. з появою першого комерційно доступного засобу «Tisseel» («Baxter», США) [158]. До того моменту головним підходом до відновлення периферичних нервів було накладання мікрохірургічних швів, незважаючи на те, що це могло викликати ушкодження і запальні реакції, які б впливали на процес регенерації нерва [156].

В табл. 1.1 охарактеризовано основні клеї, які використовуються для відновлення ушкоджених нервів. Найбільш поширений засіб «Tisseel», наприклад, являє собою двокомпонентну суміш, яка містить фібриноген, білки плазми і фактор XIII, які змішуються з тромбіном, хлоридом кальцію та апротиніном. Це з'єднання імітує кінцеві стадії каскаду згортання і утворює стабільний, взаємопов'язаний фібриновий згусток, який діє як «адгезивний циліндр» та утримує розірвані нервові кінці разом [17, 157]. В той же час, антифібринолітичний компонент зберігав структурну цілісність протягом приблизно 3 тижнів, «циліндр» захищав процес відновлення від утворення рубця і дозволяв загоєнню відбуватися в межах епіневрію [17, 18, 158]. З початку 1990 рр. найбільш широкого використання фібринові клеї отримали

в Європі та зростає зацікавленість в них як в ефективній альтернативі методам мікрохірургії [15, 19].

Проведений аналіз літературних джерел показав, що дослідники використовували низку фібринових гелів для порівняння з традиційною технікою мікрохірургічного відновлення (табл. 1.2). Основною методикою для порівняння було накладання нейлонових або шовкових епіневральних швів. У табл. 1.2 можна побачити як змінювалася методологія досліджень на тваринах, починаючи з 1980 рр. і до нашого часу. Починаючи від гістологічного аналізу, дослідження в подальшому фокусувалися на електрофізіологічних та біомеханічних експериментах.

Аналіз літературних джерел показав, що результати порівняння ефективності використання різних методик при відновленні ушкоджених периферичних нервів має різноспрямований характер (табл. 1.3). Можна відмітити широке використання тесту ходьби на доріжці в аспекті порівняння ефективності відновлення ушкодженого нерва при використанні різних методик. Фібриновий герметик «Quixil» не тільки знижував запальну реакцію, але також призводив до більш швидкої регенерації нерва. Окрім покращення функціональних результатів, герметик «Quixil» був більш швидким та простішим у використанні в порівнянні з мікрохірургічним відновленням нерва, що може бути особливо важливим в умовах ситуацій, обмежених недостатнім постачанням або відсутністю співробітників, які знайомі з методами мікрокорекції [15]. Також результати досліджень свідчать, що герметик людського фібрину («Quixil») викликає меншу запальну реакцію, менший фіброз, та, відповідно, кращу регенерацію аксонів порівняно з герметиком з бичачого фібрину («Tissucol») [16].

Більшість гістопатологічних досліджень показали еквівалентні або кращі результати при використанні фібринового клею, ніж традиційні методики. Це можливо пояснити утворенням з фібрину «кокону» або циліндру, який забезпечує бар'єр від утворення рубця та підтримує загальне вирівнювання травмованих кінців нерва. Однак, за даними одних з перших

дослідників Cruz та співавт. (1985), для групи після мікрохірургічного лікування були характерні тільки реакція на чужорідне тіло; група з використанням швів та фібрину показали формування більшого рубця; водночас, в групі тільки з фібриновим клеєм у 8 з 10 випадків цілісність нерва була порушена [161]. Можна відмітити, що подальші дослідження не показували подібних результатів, що може свідчити про суттєвий прогрес у використанні фібринових клеїв та використанні нових засобів.

На моделях повного перетину сідничого нерва порівнювали результат регенерації нерва після виконання епіневрального шва, застосування фібринового клею та клею «DuraSeal» (Covidien, США) [200]. Через 8 тижнів після мікрохірургічного відновлення нерва моторна функція та електрофізіологічні параметри були статистично достовірно вищими у випадку застосування клею «DuraSeal» порівняно з стандартною нейрорафією і внесенням фібринового клею. Імуногістохімічними методами підтверджено збільшення щільності регенеруючих нервових волокон на основі виявлення нейрофіламентів.

Попередні результати окремих наукових груп показали кращий результат регенерації периферичних нервів та нервово-м'язового відновлення на тлі використання поліетиленгліколю гідрогелю порівняно з фібрином або без будь-якої обробки кінців травмованого нерва. Безпосередні результати не показали нейротоксичності досліджуваних засобів, вони не викликали помітного підвищення запалення або апоптозу клітин Шванна у місці шва. Автори відмічають, що біомеханічна міцність відновленого нерва відрізняється при різних способах нейрорафії і залежить від того, який гідрогель було застосовано. Так, розриви нервів частіше виникали у випадках відновлення з використанням фібринового клею, але не в групах із застосуванням епіневральних швів або групах з гідрогелями на основі поліетиленгліколю [23]. Останні у меншій мірі викликають розвиток рубцевої сполучної тканини у ділянці з'єднання нерва, зокрема у периневрії [195]. На думку авторів, це сприяє кращому відновленню ушкодженого

нерва, оскільки зменшується щільність рубцевих тканин, які стають бар'єром на шляху регенерації нервових волокон. Додатковою перевагою є те, що поліетиленгліколь гідрогель може володіти властивостями, що інгібують адгезію, тим самим запобігаючи появі рубців на периневрії [24]. Проте, якщо виконання шва нерва з поліетиленгліколем здійснюється несвоєчасно або неправильно, то результати мікрохірургічного відновлення будуть аналогічними результатам, одержаним лише після нейрорафії (нервово-м'язове відновлення є нефункціональним, атрофія цільової групи м'язів починається протягом тижнів, алотрансплантація неуспішна) [21]. Тому гідрогелі на основі поліетиленгліколю є перспективною технологією у відновлюванні травмованих периферичних нервів в якості адгезивних клеїв; проте їх біосумісність, деградація і міцність з'єднання кінців нерва потребують подальшого вивчення. Зокрема, актуальним є ґрунтовне вивчення клітинних реакцій на рівні шва нерва за наявності у місці з'єднання поліетиленгліколю і порівняння цих результати з аналогічною дією фібринового клею.

Таким чином, починаючи від першого комерційно доступного фібринового клею наприкінці 1970 рр., його використання з метою коаптації кінців ушкодженого нерва поступово збільшувалося. Відновлення периферичних нервів за допомогою фібринового клею та гідрогелю на основі поліетиленгліколю має багато потенційних переваг, таких як зниження тривалості оперативного втручання і термінів регенерації, зменшення фіброзу і запалення, крім того забезпечення коаптації нервових пучків з мінімальною індукованою травмою і рубцем нерва. Результати комплексної оцінки впливу адгезивних клеїв на регенерацію травмованих нервів показали, що за їх використання прогноз та ефективність нервово-м'язового відновлення є кращими, ніж після стандартної нейрорафії.

Таблиця 1.1

Характеристика основних наявних гелів для відновлення ушкоджених нервів

Назва	Виробник	Доступні дозування	Активні компоненти	Характеристика дії
Tisseel	Baxter (США)	2, 4 та 10 мл	Тромбін, апротинін, фібріноген, фактор XIII	Імітує кінцеві стадії каскаду згортання і формує речовину, що нагадує фізіологічний згусток крові
Evicel	Ethicon (США)	2, 4 та 10 мл	Фібріноген, тромбін	Імітує кінцеві стадії каскаду згортання і формує речовину, що нагадує фізіологічний згусток крові
DuraSeal	Covidien (США)	5 мл	Поліетіленгліколь гідрогель	Коли водорозчинний поліетіленгліколь змішується з трилізином, комбінація утворює гідрогель, який добре розсмоктується

Продовження табл. 1.1

Назва	Виробник	Доступні дозування	Активні компоненти	Характеристика дії
Thrombin-JMI (з бичачим компонентом)	King Pharmaceuticals (США)	5 та 20 мл	Тромбін (бичачий)	Імітує кінцеві стадії каскаду згортання і формує речовину, що нагадує фізіологічний згусток крові
Quixil	OMRIX Biopharmaceuticals Ltd. (США)	1, 2 та 5 мл	Тромбін та фактори згортання людського походження	Імітує кінцеві стадії каскаду згортання і формує речовину, що нагадує фізіологічний згусток крові
Tissucol (з бичачим компонентом)	Baxter (США)	1, 2, 4 та 10 мл	Апротинін (бичачий), фактор XIII, фібриноген, фібронектин, плазміноген, тромбін	Імітує кінцеві стадії каскаду згортання і формує речовину, що нагадує фізіологічний згусток крові
Beriplast (з бичачим компонентом)	CSL Behring (США)	0,5, 1 та 3 мл	Фібриноген людського походження, фактор XIII, апротинін (бичачий)	Імітує кінцеві стадії каскаду згортання і формує речовину, що нагадує фізіологічний згусток крові

Таблиця 1.2

Аналіз досліджень використання фібринових клеїв при відновленні ушкоджених периферичних нервів

Автор дослідження	Чисельність вибірки та її характеристика	Характеристика дослідження	Методологія оцінки результатів
Cruz et al., 1985	40 самців щурів лінії Sprague Dawley	Ушкодження сідничного нерва. Накладання 10/0 нейлонових швів, двох перекривних швів та фібринового клею, тільки фібриновий клей	Гістологічний аналіз на 8 тиждень після операції
Voedts, 1987	25 лабораторних щурів (лінія невідома)	Ушкодження сідничного нерва. Накладання периневральних 10/0 нейлонових швів, фібриновий клей, поєднання тубулізації та біологічного клею	Гістологічний аналіз на 12 тиждень після операції
Povlsen, 1994a	35 щурів лінії Sprague Dawley, віком 3 місяці	Ушкодження сідничного нерва. Накладання 10/0 нейлонових швів, клей «Tisseel Duo», «Tisseel Kit»	Електронна мікроскопія для оцінки регенерації та розміру тканини на 2 тиждень після операції

Продовження табл. 1.2

Автор дослідження	Чисельність вибірки та її характеристика	Характеристика дослідження	Методологія оцінки результатів
Povlsen, 1994b	10 щурів лінії Sprague Dawle, віком 3 місяці	Ушкодження сідничного нерва, фібриновий клей	Електрофізіологічні дослідження через 3 місяці після операції
Inalöz et al., 1997	45 щурів лінії Wistar-Albino	Ушкодження сідничного нерва, накладання 10/0 шовкових швів, клей «Tisseel»	Електроміографія, гістопатологічна оцінка через 1 місяць після операції
Menovsky and Beek, 2001	24 самця щурів лінії Wistar	Ушкодження сідничного нерва. Лазерне відновлення нерва, фібриновий клей та мікрохірургічна техніка	Оцінка функціонального відновлення за допомогою теста на розтягування пальця через 8 та 16 тижнів після операції
Tetik et al., 2002	27 щурів лінії Lewis	Ушкодження сідничного нерва. Накладання 10/0 нейлонових швів, епіневральний рукав з двома швами, епіневральний рукав з фібриновим клеєм, епіневральний рукав з фібриновим клеєм і два шви	Функціональна оцінка (тест ходьби на доріжці, тест згинання щиколотки, окружність кінцівки, індекс потоншення пальця) на 1, 2, 4, 8 і 12 тижнів після операції; гістологічна оцінка на 12 тижнів після операції.

Продовження табл. 1.2

Автор дослідження	Чисельність вибірки та її характеристика	Характеристика дослідження	Методологія оцінки результатів
Suri et al., 2002	40 щурів лінії Wistar-Albino	Ушкодження сідничного нерва. Накладання 10/0 нейлонових швів з фібриновим клеєм «Veriplast P»	Гістологічний аналіз на 10, 20, 30, 60 та 90 день після операції
Temple et al., 2004	13 новозеландських білих кролів	Сідничий нерв. Дослідження <i>in vitro</i> : фібриновий клей, проста технологія шва, горизонтальний матрац, шов Ташими, шов Буннела	Біомеханічні навантаження
Martins et al., 2005	86 самців щурів лінії Wistar	Ушкодження сідничного нерва. Накладання 10/0 нейлонових швів, фібриновий клей та їх комбінація	Тест ходьби на доріжці перед операцією та через 12 тижнів після ушкодження, оцінка потенціалів нерва, гістоморфометрична оцінка через 24 тижні
Martins et al., 2005	30 самців щурів лінії Wistar	Ушкодження сідничного нерва. Накладання 10/0 нейлонових швів, фібриновий клей та їх комбінація	Аналіз затримка амплітуди та швидкості провідності перед операцією та через 24 тижня після неї

Продовження табл. 1.2

Автор дослідження	Чисельність вибірки та її характеристика	Характеристика дослідження	Методологія оцінки результатів
Ornelas et al., 2006a	30 самок щурів лінії Lewis	Ушкодження сідничного нерва. Нейлоновий мікрошов, людський фібриновий клей «Quixil»	Функціональна оцінка (тест ходьби на доріжці) після 2, 6 і 12 тижнів, електрофізіологічні дослідження нерва на 12 тиждень після операції.
Ornelas et al., 2006b	90 щурів лінії Wistar-Furth	Ушкодження серединного нерва. Людський фібриновий клей «Quixil», аутологічний трансплантат і людський фібриновий клей «Quixil», бичачий фібриновий клей («Tissucol», 10/0 нейлоновий шов «end to end»	Гістологічний аналіз через 9 місяців після операції
Nishimura et al., 2008	48 самців щурів лінії Wistar	Ушкодження сідничного нерва. Біологічний клей «Tissucol» та традиційна мікрохірургічна техніка	Механічна протидія на 7, 14 та 28 день після операції

Продовження табл. 1.2

Автор дослідження	Чисельність вибірки та її характеристика	Характеристика дослідження	Методологія оцінки результатів
Lin et al., 2010	90 щурів лінії Wistar	Ушкодження сідничного нерва. Нейрорафія епіневральним швом (4 шва, 10/0 нейлон), фібриновий клей («Aventis»), клей «DuraSeal»	Функціональна оцінка (SFI тест) 56 днів спостереження, електрофізіологічні та гістологічні дослідження
Isaacs et al., 2009	30 самок щурів лінії Sprague-Dawley	Перетин сідничного нерва, епіневральний шов (2 шва, 10/0 нейлон), фібриновий клей, PEG гідрогель	Гістологічне дослідження ділянки шва
Ghergherehchi et al. 2019	щури обох статей	Перетин сідничного нерва, внесення PEG гідрогель у місце травми	Функціональна оцінка (SFI тест), електрофізіологічні дослідження, імуногістохімічні та електронномікроскопічні дослідження

Таблиця 1.3

**Аналіз результатів досліджень використання фібринових клеїв при
відновленні ушкоджених периферичних нервів**

Автор дослідження	Мікроскопічні/ гістопатологічні дослідження	Електрофізіологічні дослідження	Біомеханічні дослідження
Cruz et al., 1985	Використання швів показало реакцію на чужорідне тіло; використання швів та фібрину викликало формування більшого рубця; тільки з фібриновим клеєм – у 8 з 10 випадків нерв був порушений	-	-
Boedts, 1987	У групі з фібриновим клеєм спостерігалось формування неврома в 3 з 10 випадків; група мікрохірургії показала мінімальну проліферацію тканин між кінцями нерва	-	-

Продовження табл. 1.3

Автор дослідження	Мікроскопічні/ гістопатологічні дослідження	Електрофізіологічні дослідження	Біомеханічні дослідження
Povlsen, 1994a	Не встановлено статистично достовірної різниці між результатами груп з хірургічною технікою та при використанні фібринового клею		
Povlsen, 1994b		Статистично достовірної різниці між результатами груп хірургічної методики та при використанні фібринового клею не встановлено	
Inalöz et al., 1997	Зменшення сполучної тканини в місцях анастомозу при застосуванні фібринового клею «Tisseel» в порівнянні з швом	Відновлення параметрів електроміографії після застосування клею «Tisseel» щодо епіневрального шва	-
Menovsky and Beek, 2001	Ступінь фіброзу у діляці шва більший після мікрохірургії, ніж застосування фібринового клею	Не встановлено достовірної різниці ефективності регенерації між усіма групами	Не встановлено достовірної різниці в відновлення моторної функції серед трьох груп відновлення

Продовження табл. 1.3

Автор дослідження	Мікроскопічні/ гістопатологічні дослідження	Електрофізіологічні дослідження	Біомеханічні дослідження
Tetik et al., 2002	Не встановлено достовірної різниці в відношенні діаметра аксонів до кількості волокон між групами із застосуванням шва і фібринового клею		Не встановлено достовірної різниці між показниками ефективності епіневрального шва та фібринового клею
Suri et al., 2002	Відсутня статистична різниця регенерації нерва після фібринового клею та мікрохірургії; у групі мікрохірургії спостерігалися запалення і гранульома шва	-	-
Temple et al., 2004	-	-	У групі мікрохірургії більш сильне з'єднання у порівнянні з групою фібринового клею
Martins et al., 2005	Не встановлено достовірної різниці між показниками різних методик відновлення	Швидкість провідності в групі фібринового клею більша ніж у групі мікрохірургії	Збільшення функціонального відновлення після фібринового клею

Продовження табл. 1.3

Автор дослідження	Мікроскопічні/ гістопатологічні дослідження	Електрофізіологічні дослідження	Біомеханічні дослідження
Martins et al., 2005	-	Швидкість проведення імпульсу і амплітуда у групі фібринового клею краща порівняно з групою мікрохірургії	-
Ornelas et al., 2006a	-	Достовірна різниця між показниками відновлення в групі фібринового клею для швидкості провідності і амплітуди хвилі	Достовірне відновлення моторної функції в групі фібринового клею на 6 та 12 тиждень (тест ходьби на доріжці)
Ornelas et al., 2006b	Встановлено менше запалення при використанні людського фібринового клею «Quixil», ніж бичачого фібринового клею «Tissucol» та шва	-	-
Nishimura et al., 2008			Міцність з'єднання нерва фібриновим клеєм менша, ніж мікрохірургії

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на 80 білих безпородних щурах-самцях (250 ± 25 г, 5-6 місяців). Лабораторні тварини утримувались у стандартних умовах віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Тварини мали вільний доступ до води та стандартного гранульованого корму. Для реалізації поставлених завдань тварини були розділені на дослідні групи:

1. Неоперовані, інтактні тварини (НО) – 5 тварин.
2. Псевдооперовані (ПО) – 15 тварин.
3. Повний перетин сідничного нерва без шва (ПП) – 15 тварин.
4. Перетин нерва з одномоментною нейрорафією (ЕШ) – 15 тварин.
5. Перетин нерва з одномоментним з'єднанням за допомогою поліетиленгліколю гідрогелю (ПЕГ) – 15 тварин.
6. Перетин нерва з одномоментним з'єднанням за допомогою фібринового клею (ФК) – 15 тварин.

Розподіл тварин у групах відповідно до термінів експерименту наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Розподіл лабораторних тварин у групах відповідно до терміну дослідження

№	Група	Термін спостереження		
		14 доба	30 доба	60 доба
1	НО	5		
2	ПО	5	5	5
3	ПП	5	5	5
4	ЕШ	5	5	5
5	ПЕГ	5	5	5
6	ФК	5	5	5

Модель операції. Хірургічне втручання виконувалося під загальним знеболенням, шляхом внутрішньоочеревинного введення суміші розчинів ксилазину гідрохлориду (15 мг/кг маси тіла) та кетаміну гідрохлориду (70 мг/кг маси тіла). Тварину фіксували на операційному столі черевом донизу. Дотримуючись правил асептики та антисептики, після обробки операційного поля виконувався лінійний розріз шкіри по латеральній поверхні лівого стегна у проекції сідничного нерва. За допомогою інструментів (затискач типа “москіт”, пінцет хірургічний) тупо-гостро виділявся та мобілізувався лівий сідничий нерв. Наступні маніпуляції і безпосередні результати мікрохірургічного з’єднання кінців сідничого нерва наведено на рис. 2.1.

У групі ПО виконувався лінійний розріз шкіри по латеральній поверхні стегна, виділявся та мобілізувався лівий сідничий нерв. Після цього проводилося пошарове відновлення цілісності м’яких тканин без маніпуляцій з нервом.

У групі ПП відтворювали дії, як у групі ПО з додатковим повним перетином сідничого нерва, кінці нерва не з’єднувалися, а вільно лишались в рані. Після цього проводилося пошарове відновлення цілісності м’яких тканин без маніпуляцій з нервом.

У групі ЕШ сідничий нерв на відстані $10 \pm 1,5$ мм від точки виходу його з порожнини малого таза за допомогою леза пересікався перпендикулярно з наступною його фіксацією кінець-в-кінець шляхом епіневральної нейрорафії атравматичною голкою з сертифікованою монофіламентною поліамідною ниткою № 10/0 з використанням операційного мікроскопа (збільшення $\times 12$), накладалося 4-6 епіневральних швів.

У групі ПЕГ сідничий нерв на відстані $10 \pm 1,5$ мм від точки виходу його з порожнини малого таза за допомогою леза пересікався перпендикулярно з наступною його фіксацією кінець-в-кінець за допомогою двох «фіксуючих» епіневральних швів на відстані 180° і потім наносили

поліетиленгліколь гідрогель, попередньо виготовлений за інструкцією виробника.

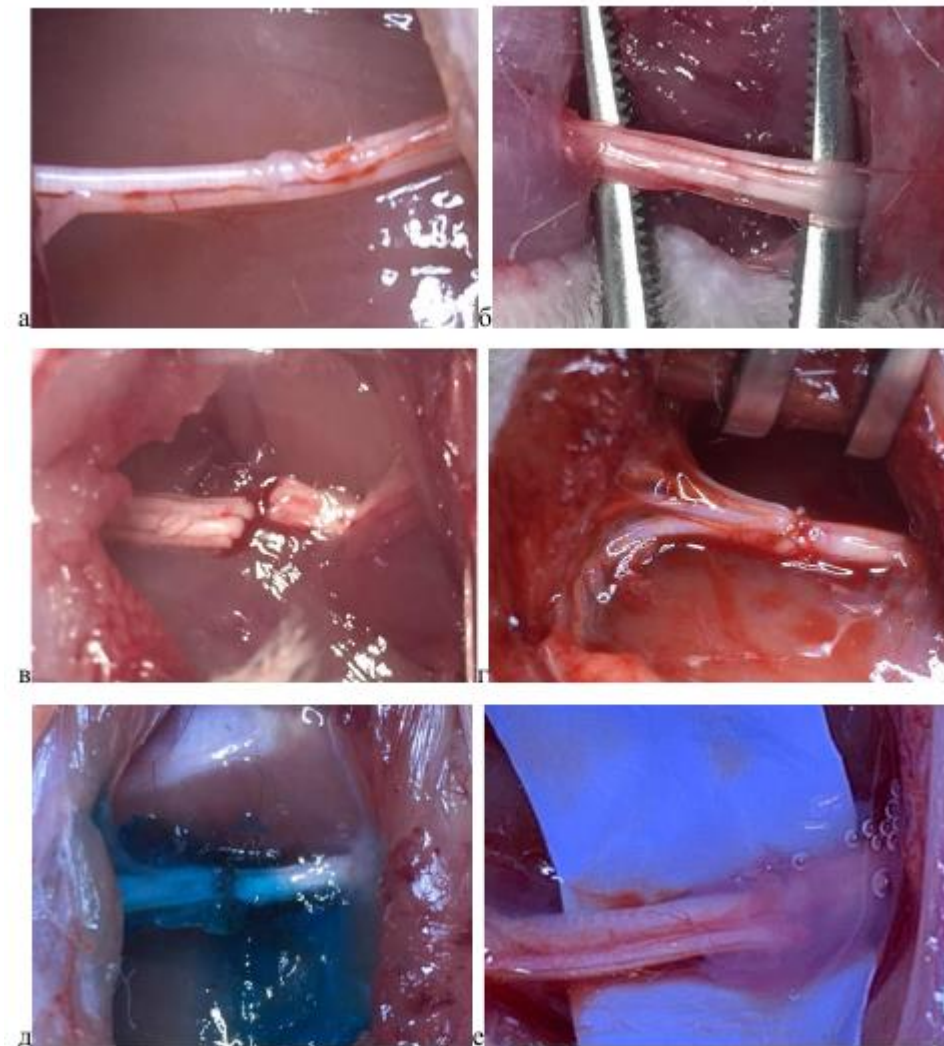


Рис. 2.1. Мікрохірургічні техніки з'єднання кінців сідничого нерва щурів: а) інтактний нерв; б) неушкоджений нерв у псевдооперованого щура; в) повний перетин нерва; г) повний перетин і епіневральні шви (4-6); д) шов (2) з поліетиленгліколем гідрогелем (гель блакитного кольору); е) шов (2) з фібриновим клеєм (гель білого кольору).

Використовували комерційний поліетиленгліколь гідрогель DuraSeal (Covidien, США), що містить порошок ефіру 0,5 г N-гідрокси сукциніміду (ПЕГ) (домішки: консервант ВНТ, синій барвник FD&C № 1), 2,5 мл фосфатного буферу, трилізину ацетат у 0,075 М декагідратному буфері борату натрію.

У групі ФК сідничий нерв на відстані $10 \pm 1,5$ мм від точки виходу його з порожнини малого таза за допомогою леза пересікався перпендикулярно з наступною його фіксацією кінець-в-кінець за допомогою двох «фіксуючих» епіневральних швів на відстані 180° і потім наносили виготовлений за інструкцією виробника розчин фібринового клею

Використовували комерційний фібриновий клей Tisseel (Baxter, США), що містить 67-106 мг/мл людського фібриногену, 400-625 од/мл тромбіну, 2250-3750 од/мл інгібітора фібринолізу апротонін, 36-44 мкмоль/мл хлориду кальцію.

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

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

Проведення функціонального тесту відновлення. Для контролю функціонального відновлення сідничого нерва використовували “тест ходи по біговій доріжці” (“Walking Track Analysis”) з визначенням функціонального індексу сідничого нерва (Sciatic Functional Index, SFI) за методикою T. S. Johnson та співавт. [109] у нашій модифікації [164]. Показник SFI направлений на кількісну оцінку наслідків ураження сідничого нерва у щурів. SFI кількісно визначає функціональний дефіцит у тварин, аналізуючи зміну сліду лап щурів після травми. Для цього кінцівку щурів маркували барвником (фукорцин) і щурів направляли по тестовій доріжці. Відбитки кінцівки щурів збирали, вимірювали довжину між

пальцями кінцівки і перетворювали у кількісні значення за формулою, описаною у методиці [165].

Для отримання відбитків підошовних поверхонь стоп щурів використовувалася спеціально розроблена конструкція (Патент України на корисну модель № 118157), яка складалася з дерев'яного піддона з бортиками, на який накладалася половина розрізаної вздовж осі пластикової труби. Визначали наступні показники: print length (PL) — відстань від п'яти до третього пальця, toe spread (TS) — відстань від 1 до 5 пальця, intermediate toe spread (ITS) — відстань від 2 до 4 пальця. Всі показники визначали у міліметрах для експериментальної (E) та інтактної (N) кінцівок. SFI визначали за допомогою формули Bain-Mackinnon-Hunter (Bain та співавт., 1989):

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

Електронейроміографія. Тварин наркотизували (внутрішньоочеревинне введення суміші ксилазину гідрохлориду 15 мг/кг та кетаміну гідрохлориду 70 мг/кг) і фіксували на операційному столі черевом донизу. Вздовж хвоста приєднували електрод заземлення (металізована стрічка, змочена 0,9 % розчином натрію хлориду, шириною 20 мм, довжиною 100 мм), виділяли сідничий нерв від місця виходу з малого таза до розподілу його на гілки, фізіологічним розчином очищуючи операційне поле. Нерв охоплювали платиновим гачкоподібним біполярним електродом (діаметр монополяру 0,22 мм, відстань між монополярями 5,5 мм). Стимулюючий струм генерували цифровим електронейроміографом «Нейро-МВП-Мікро» (ТОВ «НЕЙРОСОФТ», Росія), подавали в імпульсному режимі (тривалість імпульсу 5 мс) з частотою 0,2 Гц (1 імпульс на 5 с) та кроком збільшення сили струму у 1 мА (рис. 2.2). Реєстрацію збудження проводили вказаним електронейроміографом за допомогою концентричного голкового електроду (довжина 25 мм, діаметр 0,3 мм, площа відведення 0,015 мм²) у руховій

точці задньої групи м'язів гомілки. Відстань між стимулюючими та реєструючим електродами становила 25 мм. Аналіз функції нервово-м'язового відновлення оцінювали за показниками ЕНМГ: амплітуда М-відповіді (АмВ), латентний період М-відповіді (мс), швидкість проведення збудження (ШПЗ) (мм/мс). Для аналізу відбирали тільки показники амплітуди максимальної М-відповіді, отримані у більшості випадків при силі стимулюючого струму 3 мА.

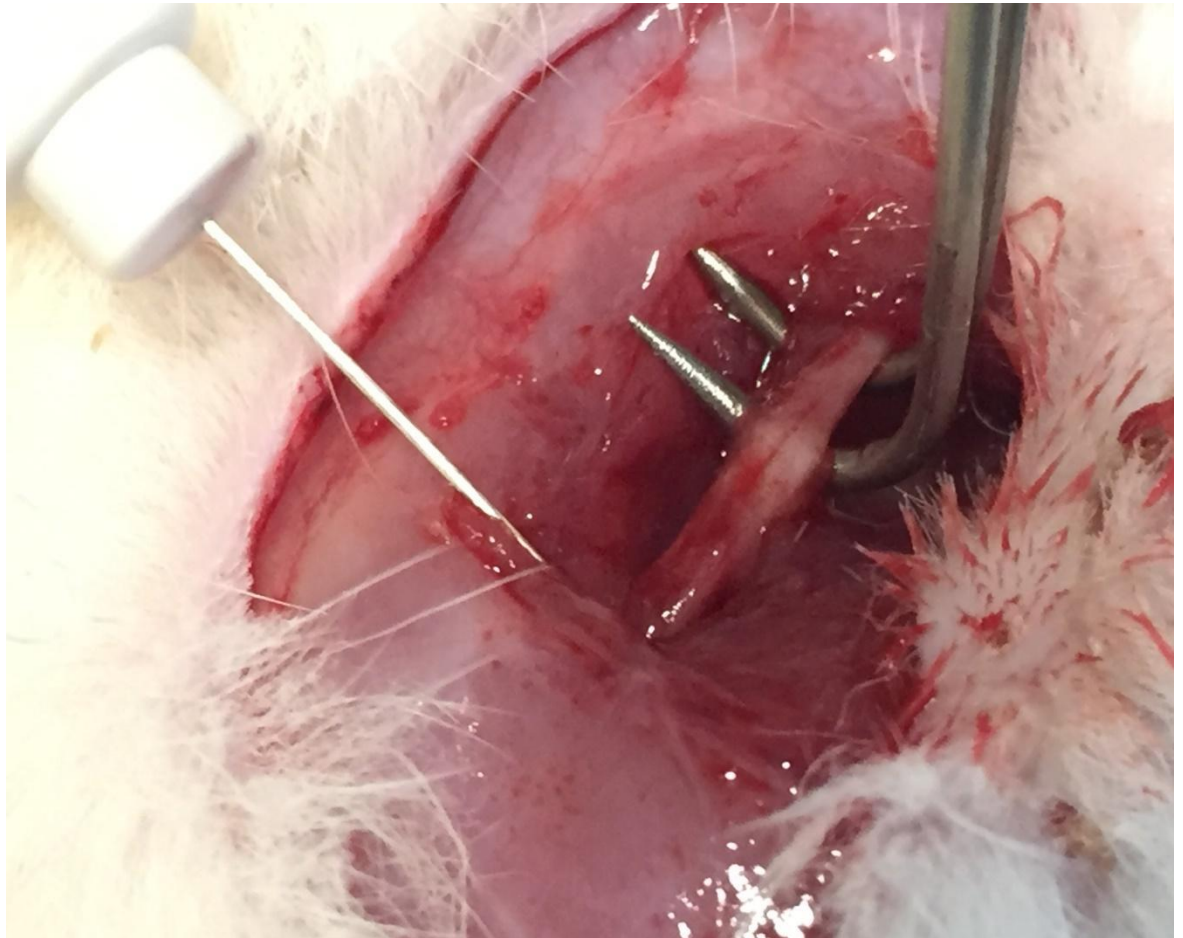


Рис. 2.2. Положення електродів у момент реєстрації М-відповіді.

Гістологічні методи дослідження регенерації нерва. Сідничий нерв фіксували у 10 % розчині формаліну (рН 7,4, на фосфатному буфері). З нервів у поздовжній проекції одержували заморожені зрізи товщиною 15 мкм на мікротомі-кріостаті МК-25. Мікрозрізи імпрегнували азотнокислим сріблом за методикою, описаною у роботі А. К. Коломійцева та Ю. Б. Чайковського [166]:

- 1) піридин – 24 год;
- 2) відмивання зрізів у проточній воді (3×10 хв) та дистильованій воді (3×5 хв);
- 3) 30 % розчин азотнокислого срібла – 24 год;
- 4) промивання у дистильованій воді (<1 хв);
- 5) 1 % розчин кислого формаліну (3×4 хв);
- 6) аміачне срібло (~2 хв): титрування 30 % розчину азотнокислого срібла 25 % розчином аміаку до повного розчинення осаду і фільтрування;
- 7) 1 % розчин кислого формаліну – до появи коричневого кольору зрізів;
- 8) 0,5 % розчин кислого формаліну з глюкозою (~1-2 %) – 15-20 с;
- 9) слабкий розчин аміаку – 30 с;
- 10) відмивання імпрегнованих зрізів у дистильованій воді;
- 11) заключення під покривне скельце, через ізопропаноз, канадський бальзам.

Для електронної мікроскопії виділяли дистальний сегмент нерва (розміром ≤ 2 мм) на відстані 10 мм від шва. Зразки фіксували у 2,5 % розчині глютарового альдегіду (на фосфатному буфері) з наступною дофіксацією в 1 % розчині чотирьохокису осмію (OsO_4). Фіксовані зразки ущільнювали у епоксидній смолі, яка містила суміш смол епон-аралдиту (Epon 812, Araldite 502) [167], через зневоднення в етанолі (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) та ацетоні. Для верифікації проєкції зрізів та морфометрії мієлінових нервових волокон з епоксидних капсул одержували напівтонкі зрізи на ультрамікротомі LKB-8800 (Швеція). Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім за методикою, описаною у роботі М. А. Nayat [168]. Ультратонкі зрізи контрастували 2 % розчином уранілацетату та цитратом свинцю. Дослідження ультратонких зрізів і одержання графічних зображень здійснено на електронну мікроскопі Tescan Mira 3 LMU (Чехія).

Морфометрична оцінка регенерації нерва. Вимірювання проводили за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1). З напівтонких зрізів, забарвлених толуїдиновим синім, одержували мікрофотографії при збільшенні $\times 1000$. Середню щільність мієлінованих нервових волокон оцінювали на мікрофотографії поперечного перерізу дистального кінця нерва (216×138 мкм, середня площа $0,03$ мм²), кількість фотографії на кожний зразок – 10-15 (2/3-3/4 поперечного перерізу нерва). Так одержували щільність мієлінованих нервових волокон на тест-зону (мікрофотографія), математично перетворювали у число волокон на одиницю площі нерва 1 мм². Середній діаметр (мкм) мієлінованих нервових волокон вимірювали як середнє значення великого та малого діаметрів на окреме волокно. Товщину мієлінової оболонки (мкм) вимірювали як відстань між внутрішнім і зовнішнім її контуром. Товщину дистального сегмента нерва (мкм) вимірювали на напівтонких зрізах, товщину нерва у ділянці шва (мкм) вимірювали на поздовжніх гістологічних зрізах, які були імпрегновані азотнокислим сріблом.

Дослідження активності матриксних металопротеїназ (ММП) у скелетних м'язах. Здійснювали забір скелетних м'язів оперованої кінцівки для визначення активності ММП і фіброзу у кінцевий термін експерименту. Рівень колагенолітичної активності ММП визначали методом ензим-форезу (желатинова зимографія) згідно методики [169]. Екстракцію протеїнів проводили шляхом гомогенізації тканини м'язів у 50 ммоль трис-буфері (рН $7,4$) з наступним руйнуванням клітин за допомогою ультразвукової дезінтеграції. Залишки тканинного матеріалу та клітинний дебрис відділяли від рідкої фази за допомогою центрифугування при $12\ 000$ хг протягом 45 хв за температури 4°C . Концентрацію білка в отриманих екстрактах визначали за методом Лоурі [170], використовуючи комерційний набір (24240, Thermo Scientific, США). Проби готували, змішували екстракти білків з буфером за Леммлі, який не містив відновлювальних агентів.

Проби для нанесення змішували з буфером Лемлі та наносили на трек у кількості 100 мкг/лунку. Електрофоретичне розділення білкових проб за невідновлюючих умов проводили за допомогою гелі-електрофорезу у сополімері ПААГ (8 %) та желатина (5 мг/мл) у трис-гліциновому буфері (рН 8,6), що містив 0,1 % додецилсульфату натрію (сила струму 100 мА, напруга 20-35 В). Після електрофорезу гелі виймали та двічі промивали в охолоджену 2,5 % розчині Triton X-100 протягом 30 хв для видалення додецилсульфату натрію та ренатурації протеїнів. Після цього гелі промивали у п'яти змінах холодної бідистильованої води. Колагенолітичну активність проявляли у буфері наступного складу: 50 mM tris-HCl (рН 7,4), 20 mM NaCl, 0.02 % Tween-80, 5 mM CaCl₂, 1 mM ZnCl₂. Інкубацію у буфері проводили протягом 18 год за температури 37°C, при цьому желатинази, які містяться у ньому, деградують субстрат (желатин). Після цього гелі забарвлювали у розчині Кумасі R-250 (24620, Thermo Scientific, США) згідно інструкції виробника. Присутність колагенолітичних ензимів визначали за наявністю світлих смуг на темнозбарвленому фоні. Площа таких ділянок вважалася пропорційною активності ензимів.

Денситометричний аналіз проведено за допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США), активність ензимів представлено в умовних одиницях (a.u.). Результати представлені у виді медіани та інтерквартильного інтервалу Me [LQ – UQ], де Me – медіана (50 % центиль), LQ – 25 % центиль, UQ – 75 % центиль.

Гістохімічне і денситометричне визначення відносного вмісту колагенових волокон у скелетних м'язах. Зразки м'язів фіксували у 10 % розчині формаліну (рН 7,4, на фосфатному буфері), через ізопропанол-парафіновий метод заливали у парафін (Leica Surgipath Paraplast Regular, Formula 'R', Німеччина) і виготовляли 8µm мікрорізи на мікротомі Thermo Microm HM 360 (Thermo Scientific, США). Депарафіновані зрізи витримували (інкубували) 30 хв при 25° у фарбувальному розчині PicroSirius Red (PSR) (0.5 g Direct Red 80 (Magnacol Ltd, Великобританія) в

500 мл насиченої пікринової кислоти) [171], зневоднювали, заключали у середовище (Merck, Німеччина). Стереометричний аналіз проведено за допомогою програмного забезпечення ImageJ (Wayne Rasband, США), щільність колагену представлено у відсотках (%) (алгоритм: перетворення RGB-зображення в 8-бітове, визначення порогу, корекція за максимальним сіріус-позитивним забарвленням, вимірювання). Щільність колагену виражається у відсотках (%) аналізованих площ. Аналізовані зони були представлені у виді мікрозображень (2270×1700 пікселів, 1120×840 мкм), 5 зображень на поперечний зріз м'яза (приблизно 2/3 перерізу м'яза).

Статистичні дослідження. Обробку даних проведено за допомогою комп'ютерної програми Origin v.9.0 та StatPlus (version 7.0; Microsoft). Нормальність розподілу даних у групах порівняння визначали за критерієм Колмогорова-Смирнова. Усі дані представлені як середнє значення \pm стандартна похибка середнього значення ($M \pm m$). Вірогідність розходжень між групами порівняння визначали методом однофакторного дисперсійного аналізу (one way ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test). Для визначення залежності між параметрами у групах використано коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r_s). Відмінності між групами вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

Біоетика. Усі експериментальні процедури проводились відповідно до діючих стандартів біоетики (Директива ЄС 2010/63/ЄС «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» (1986), Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та наукових цілях (Страсбург, 1986), Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження»). Протокол дослідження був затверджений біоетичною комісією Національного медичного університету імені Богомольця (протокол № 113 від 02.07.2018 р.).

РОЗДІЛ 3

ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ВІДНОВЛЕННЯ СІДНИЧОГО НЕРВА ЗА РІЗНИХ СПОСОБІВ ЙОГО З'ЄДНАННЯ

3.1. Результати оцінки функції кінцівки після ушкодження сідничого нерва

У контрольній групі щурів, тобто інтактних тварин (НО), значення показника SFI становили $2,93 \pm 0,15$ пункти (Min $-1,36$; Max $-5,32$) (рис. 3.1).

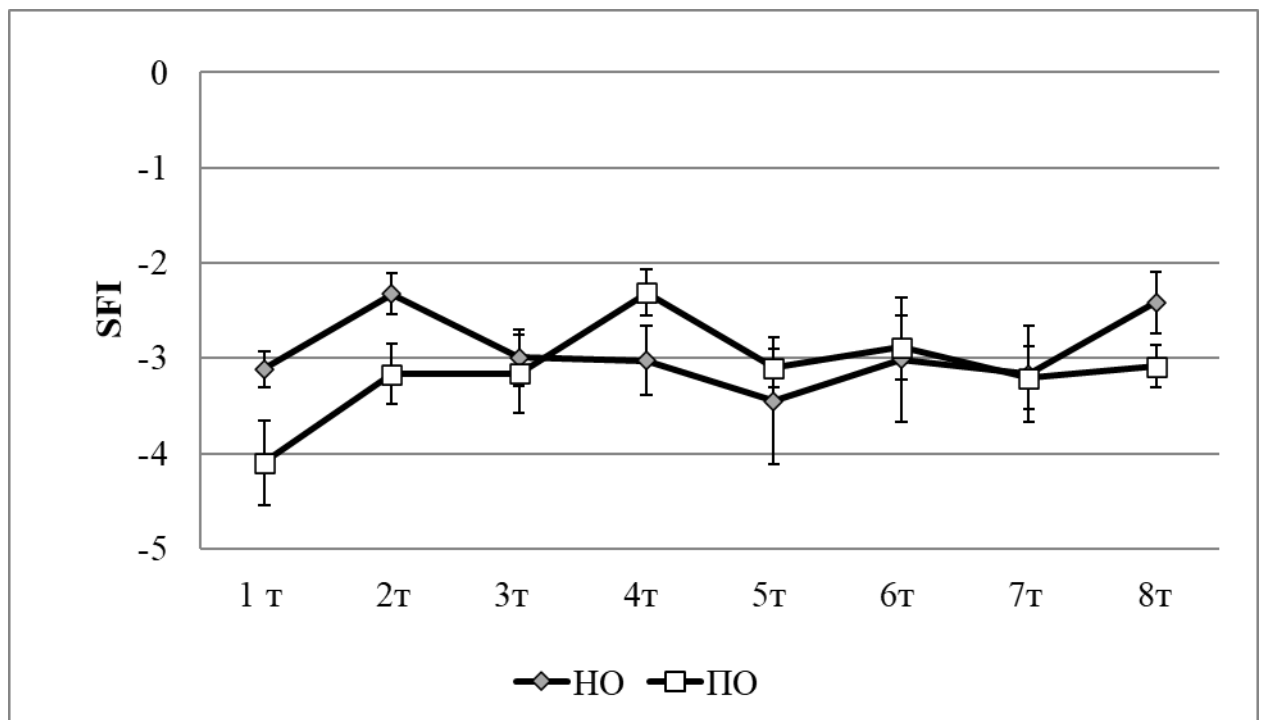


Рис. 3.1. Середні значення SFI-індексу у контрольній групі (НО) та групі псевдооперованих щурів (ПО) упродовж 8 тижнів спостереження після доступу до сідничого нерва.

Між термінами спостереження статистично значуща різниця була відсутньою. У групі ПО змін оцінюваних показників також не виявлено. Середній показник у групі дорівнював $3,25 \pm 1,21$ (Min $-1,23$; Max $-6,23$). Порівняльний аналіз показника щодо кожного терміну спостереження також не показав статистичної різниці між вибірками даних. Тобто,

відтворення хірургічного доступу до сідничого нерва, без його ушкодження, не позначилось на функціональних показниках кінцівки, локомоторній активності дослідних щурів.

На рис. 3.2 показано результати оцінки показника SFI у групі ПП та ЕШ. За відсутності мікрохірургічного відновлення сідничого нерва відмічали явні ознаки локомоторних порушень, парез кінцівки, атрофію м'язів; середні значення $SFI=71,5\pm 0,05$ (Min – 68,5; Max – 87,7).

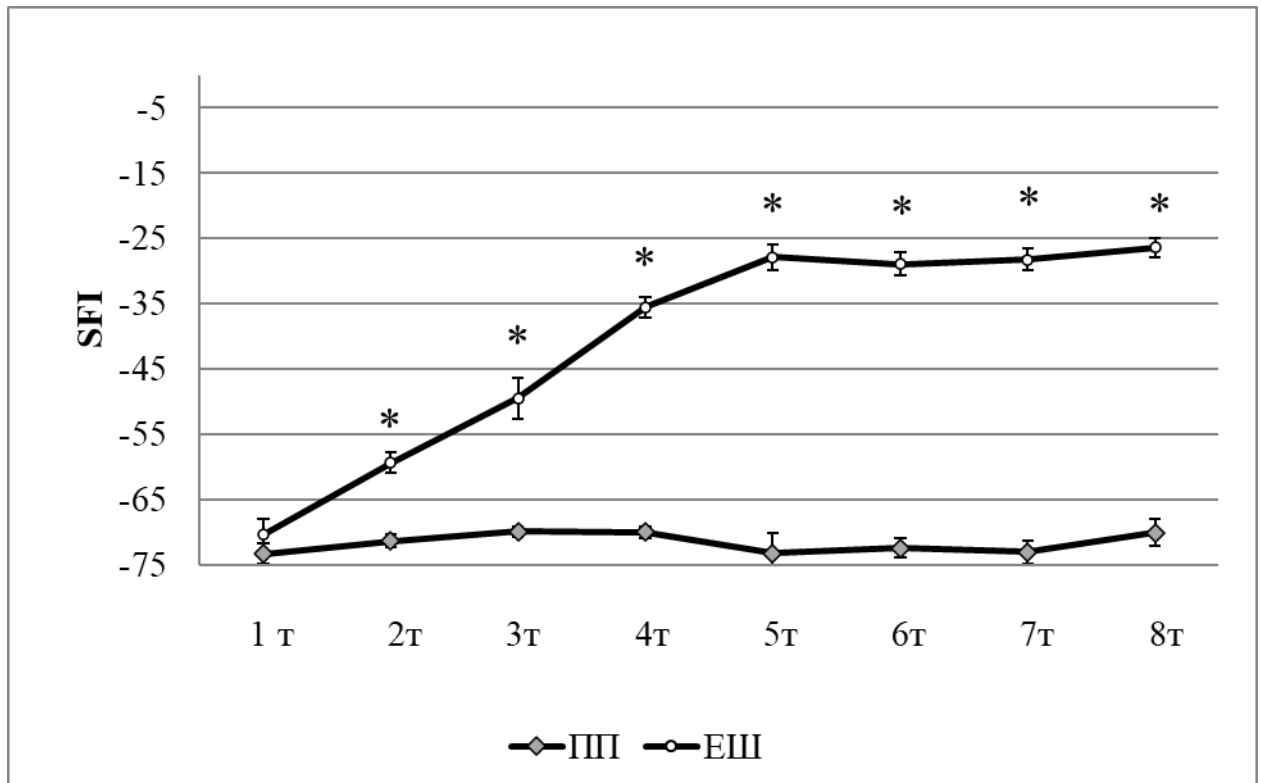


Рис. 3.2. Середні значення SFI-індексу у групі щурів з повною невротомією (ПП) та після відновлення сідничого нерва епіневральними швами (ЕШ) упродовж 8 тижнів спостереження. Примітка: * $P < 0,05$ порівняно до групи ПП.

Після з'єднання кінців сідничого нерва епіневральними швами встановлено ознаки функціонального відновлення: збільшення локомоторних рухів кінцівки, відновлення опорної функції кінцівки, згинання пальців кінцівки. За результатами оцінки показників SFI встановлено кількісне відновлення функціонального показника кінцівки.

Статистично значуще відновлення виявлено уже на 2 тижні спостереження (різниця показника $SFI=11,0\pm 2,58$, $P<0,05$) і динаміка була позитивною до 5 тижня експерименту (різниця з показником 1 тижня $SFI=42,5\pm 3,65$, $P<0,05$). Динаміку середніх значень SFI показано на рис. 3.3. У терміни між 5 і 8 тижнями спостереження статистично значимої різниці не встановлено. На 8 тижень середнє значення $SFI= -26,3\pm 1,45$ відносно показника 1 тижня $SFI=70,3\pm 2,04$, тобто відновлення збільшилось у 2,6 рази (різниця показника $SFI= -43,9\pm 3,65$, $P<0,05$).

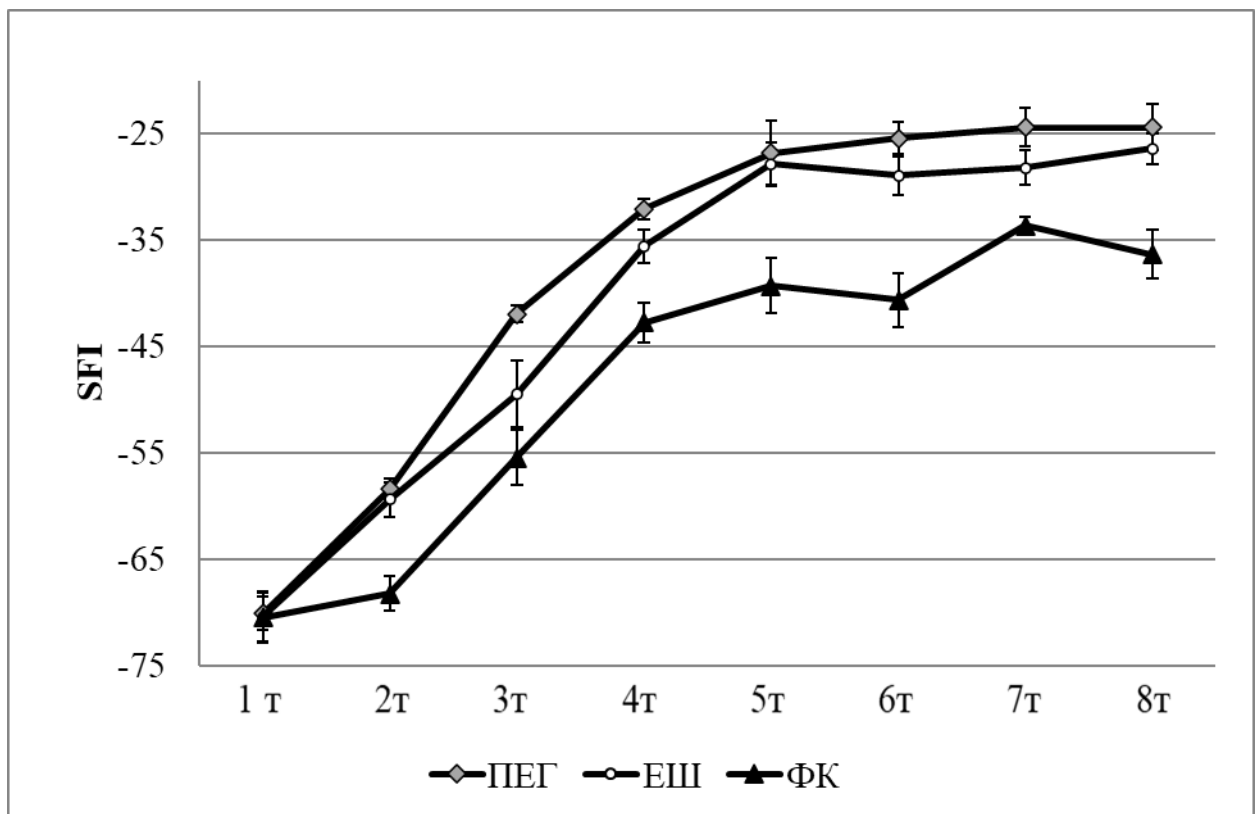


Рис. 3.3. Значення SFI упродовж 8 тижнів спостереження після нейрорафії сідничого нерва епіневральними швами (ЕШ) і додатковим застосуванням поліетиленгліколю гідрогелю (ПЕГ) або фібринового клею (ФК).

За умов локального застосування поліетиленгліколю гідрогелю встановлено позитивну динаміку функціонального відновлення ушкодженої кінцівки за весь термін експерименту. Статистично значуще збільшення показника SFI виявлено вже на 2 тижні спостереження (різниця показника

SFI=11,6±1,38, P<0,05) (рис. 3.3). Більш значущий рівень відновлення відмічено у термін 2-3 тижнів (різниця показника SFI=16,4±1,54, P<0,05), а з 4 тижня достовірної різниці середніх значень показника SFI не реєстрували. На 8 тиждень значення SFI= -24,3±1,41 відносно показника 1 тижня SFI=70,0±0,89, тобто відновлення збільшилось у 2,8 рази (різниця показника SFI= -45,6±1,96, P<0,05).

За період 1-8 тижнів встановлено достовірне відновлення локомоторної функції ушкодженої кінцівки при застосуванні фібринового клею. Статистично значущу різницю за показником SFI встановлено, починаючи з 3 тижня після операції (між 1 і 2 тижнем різниці не виявлено; різниця показника SFI=15,0±2,81, P<0,05). Динаміку середніх значень SFI показано на рис. 3.3. На 3-4 тиждень також виявлено достовірне відновлення (різниця показника SFI=12,6±3,08, P<0,05), а у наступні тижні статистично значущої різниці не було. На 8 тиждень значення SFI= -36,3±2,33 щодо 1 тижня SFI= -0,4±2,28, тобто відновлення збільшилось у 1,9 рази (різниця показника SFI=34,1±3,56, P<0,05)

За результатами статистичного аналізу (за критерієм Крускала-Уоліса та однофакторного дисперсійного аналізу) у групі ЕШ статистично значуще зростання даних SFI встановлено на 2 і 4 тижнях і далі функціональний стан кінцівки, її моторна функція не покращувались. Результати статистичних вимірювань у групах з мікрохірургічним відновленням сідничого нерва наведено у табл. А.1, А.2 і А.3 дод. А.

У групі ПЕГ статистично значущу різницю реєстрували до 4 тижня і далі різницю виявлено між даними на 4 тиждень і на 7-8 тижні. Тобто, можна стверджувати про зростання функціонального відновлення до 4 тижня включно. У групі ФК динаміка відновлювання була аналогічною до групи ЕШ.

Аналіз щотижневої міжгрупової різниці показав наступні результати. На 2 тижні спостереження статистично значущу різницю встановлено між показниками групи ФК та груп ЕШ і ПЕГ відповідно (P<0,05). У наступні

терміни реєстрували такі дані: достовірна різниця між групами ФК і ПЕГ у термін 3-8 тижнів, ФК і ЕШ у термін 4-8 тижнів. Графіки статистичного аналізу наведено на рис. А.1 дод. А.

При проведенні кореляційного аналізу зв'язку рівня відновлення функції кінцівки з результатами регенерації сідничого нерва було встановлено сильну позитивну кореляцію на 14 і 30 добу після з'єднання кінців нерва епіневральними швами, на 14 і 60 добу – у групі ПЕГ, на 30 добу – у групі ФК ($r_s=0,90$; $p=0,04$) (табл. 3.1). В інші терміни спостереження значення критерію кореляції Спірмена було більше 0,5, хоча не досягало статистично значущого рівня. Тому результати у ці терміни оцінено як тенденцію до відновлення і її зв'язку з рівнем регенерації нервових волокон у дистальному відрізку сідничого нерва.

Таблиця 3.1

Результати оцінки SFI тесту і кореляційного аналізу з рівнем регенерації сідничого нерва (за кількістю мієлінових нервових волокон)

Група	Термін	SFI	Критерій кореляції Спірмена
НО	14 доба	-2,3±0,2	
	30 доба	-3,0±0,3	
	60 доба	-2,4±0,3	
ПО	14 доба	-3,1±0,3	
	30 доба	-2,3±0,2	
	60 доба	-3,0±0,2	
ЕШ	14 доба	-70,3±2,4*	rs=0,90; p=0,04
	30 доба	-35,5±1,5*,**	rs=0,90; p=0,04
	60 доба	-26,3±1,4*,**!	rs=0,70; p=0,19
ПЕГ	14 доба	-70,0±0,8*	rs=0,90; p=0,04
	30 доба	-32,0±1,34*,**	rs=0,70; p=0,19
	60 доба	-24,3±1,4*,**!	rs=0,90; p=0,04
ФК	14 доба	-70,4±2,2*	rs=-0,60; p=0,28
	30 доба	-42,7±1,8*,**	rs=0,90; p=0,04
	60 доба	-36,3±2,3*,**	rs=0,60; p=0,28

Примітка. * $p < 0,05$ достовірно до НО і ПО; ** $p < 0,05$ до терміну 14 діб; ! $p < 0,05$ до терміну 30 діб.

Таким чином, на підставі проведених експериментів і статистичної оцінки одержаних даних SFI зроблено кілька висновків. По-перше, ознаки функціонального відновлення кінцівки після з'єднання сідничого нерва починаються з 2 тижня. По-друге, динаміка відновлення функції кінцівки достовірно зростає до 4 тижня включно і далі не прогресує. По-третє, застосування поліетиленгліколю гідрогелю разом з епіневральними швами сприяло пришвидшенню функціонального відновлення (позитивна динаміка до 5 тижня і у термін 6-8 тижнів не змінюється). По-четверте, застосування фібринового клею не сприяло пришвидшенню функціонального відновлення кінцівки порівняно з поліетиленгліколем гідрогелем.

3.2. Результати електронейроміографії скелетних м'язів кінцівки після ушкодження та з'єднання сідничого нерва

Проведено електрофізіологічне дослідження сідничого нерва контрольної і дослідних груп. Оцінено показники ЕНМГ лівого сідничого нерва після з'єднання за допомогою епіневральних швів і застосування клейового з'єднання поліетиленгліколем гідрогелем та фібриновим клеєм. Результати ЕНМГ наведено на рис. 3.4 і в табл. 3.2-3.4.

У групі ПО не виявлено статистично значущої різниці між показниками в різні терміни експерименту. Ці дані вказують на відсутність впливу хірургічного доступу до сідничого нерва на М-відповідь скелетних м'язів гомілки. Разом з тим, встановлено достовірно меншу амплітуру М-відповіді скелетних м'язів гомілки у всіх трьох експериментальних групах. На 2 тижні експерименту рівень М-відповіді був достовірно меншим від показника НО і ПО груп в середньому у 5,5 рази ($P < 0,01$). Не виявлено різниці між групами порівняння з мікрохірургічним відновленням на 2 тижні після ушкодження нерва (табл. 3.2).

Через 1 місяць після нейрорафії відмічено тенденцію збільшення амплітури М-відповіді, хоча показник не досягав значень норми у жодній з

дослідних груп. Між групами ПЕГ і ФК встановлено різницю М-відповіді на рівні 42,7 % ($7,28 \pm 0,75$ проти $5,1 \pm 0,29$, $P < 0,05$). Значення у групі ЕШ і групами порівняння були у межах статистичної похибки.

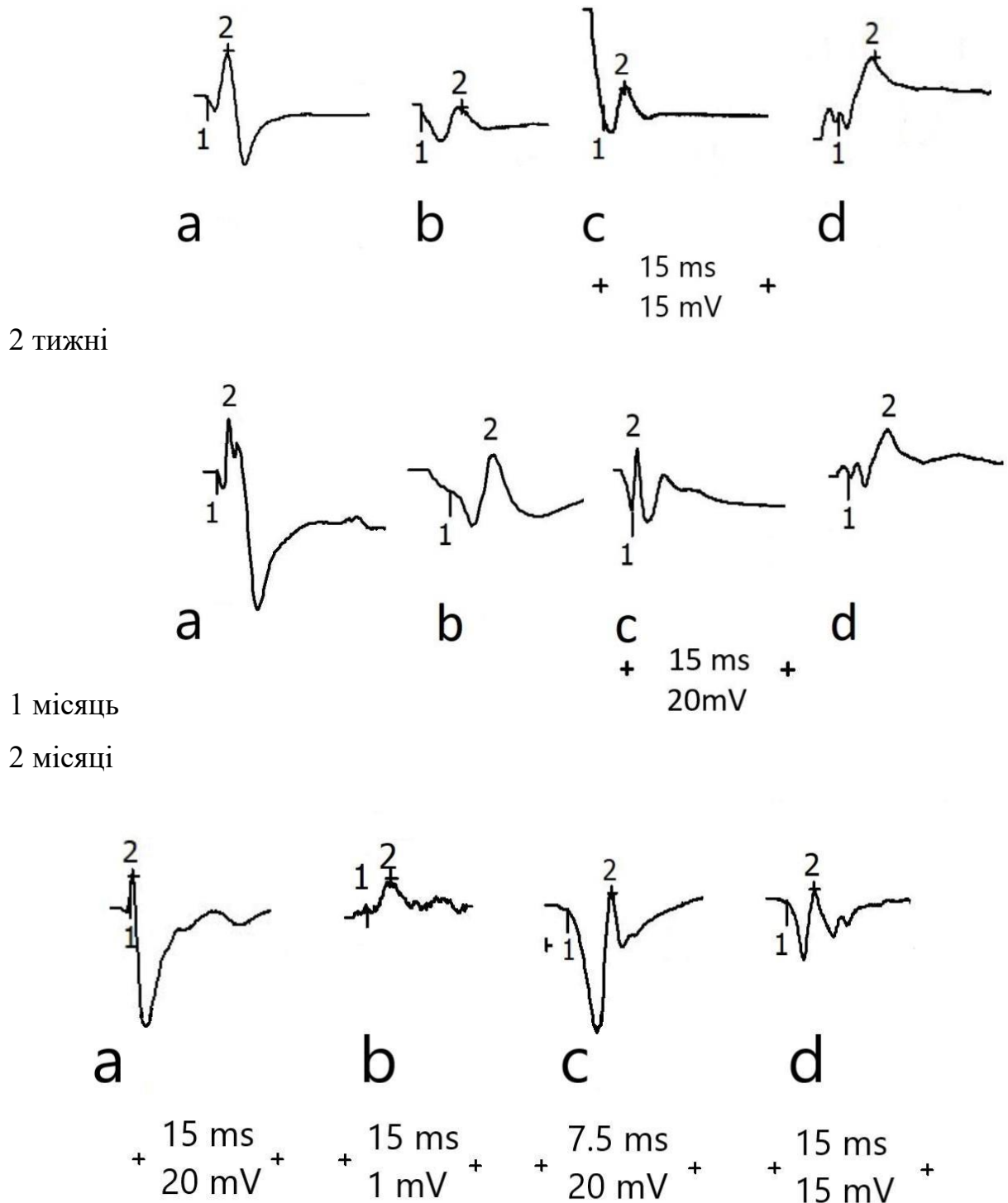


Рис. 3.4. Міограми, зареєстровані у щурів на 14, 30 і 60 добу після операції: а – група ПО; б – група ЕШ; с – група ПЕГ; д – група ФК; 1 – первинно-позитивний пік; 2 – позитивний пік.

Через 2 місяці після операції встановлено достовірне збільшення амплітуди М-відповіді в експериментальних групах щодо терміну 2 тижнів і 1 місяць ($P < 0,05$). У групі ЕШ і ПЕГ амплітуда М-відповіді майже досягла контрольних значень (значення у межах статистичної похибки щодо групи НО і групи ПО). У групі ФК амплітуда М-відповіді була достовірно меншою від значень у псевдооперованих тварин в середньому на 66,9 % ($P < 0,05$) (табл. 3.2). На основі отриманих результатів зроблено висновок, що динаміка відновлення М-відповіді у терміни до 2 місяців після відновлення епіневральними швами і поліетиленгліколем гідрогелем є співрозмірною, тоді як після відновлення фібриновим клеєм характеризується незначною затримкою.

Таблиця 3.2

Амплітуда негативно-позитивного піка М-відповіді у щурів після оперативного втручання на сідничому нерві (мВ)

Група	2 тижні	1 місяць	2 місяці
НО	19,3±0,95		
ПО	20,7±1,39	19,1±1,78	18,7±1,07
ЕШ	3,93±0,84* [@]	6,67±1,19* [@]	13,3±1,27** [!]
ПЕГ	3,86±0,31* [@]	7,28±0,75* [@]	15,0±3,05** [!]
ФК	3,02±0,29* [@]	5,10±0,29* [#] [@]	11,2±2,29* [@] ** [!]

Примітка. * $P < 0,05$ достовірно до показника групи НО; @ $P < 0,05$ достовірно відносно показника групи ПО; ^ $P < 0,05$ достовірно до показника групи ЕШ; # $P < 0,05$ достовірно відносно показника групи ПЕГ, ** $P < 0,05$ до показника у термін 2 тижні; ! $P < 0,05$ до показника у термін 1 місяць

Аналіз латентного періоду М-відповіді показав різницю між показником у інтактних тварин і після хірургічного відновлення сідничого нерва (табл. 3.3). На 2 тижні експерименту в усіх дослідних групах відмічено більший латентний період, в тому числі статистично значущу

різницю зареєстровано після застосування поліетиленгліколю гідрогелю і фібринового клею в середньому на 33,8 % ($P < 0,05$).

Таблиця 3.3

Зміни латентного періоду М-відповіді у щурів після хірургічного відновлення сідничого нерва (мс)

Група	2 тижні	1 місяць	2 місяці
НО	0,68±0,02		
ПО	0,78±0,02	0,62±0,04**	0,65±0,02
ЕШ	0,84±0,03	0,85±0,05@	1,12±0,08*@**!
ПЕГ	0,91±0,04*	0,76±0,06	0,83±0,03
ФК	0,91±0,08*	0,76±0,02	1,28±0,18*@!***#

Примітка. * $P < 0,05$ достовірно до показника НО; @ $P < 0,05$ достовірно відносно показника групи ПО; ^ $P < 0,05$ достовірно до показника групи ЕШ; # $P < 0,05$ достовірно відносно показника групи ПЕГ, ** $P < 0,05$ до показника у термін 2 тижні; *** $P = 0,05$ до показника у термін 2 тижні; ! $P < 0,05$ до показника у термін 1 місяць.

Через 1 місяць після операції відмічено тенденцію до зменшення латентного періоду М-відповіді, за винятком групи ЕШ. Між дослідними групами порівняння різниця була відсутньою (у межах статистичної похибки щодо НО і групи ЕШ).

Через 2 місяці після операції у групі ЕШ і ФК реєстрували достовірне збільшення латентного періоду М-відповіді щодо попередніх термінів експерименту. Одночасно з цим не виявлено різниці між показниками в оцінювані терміни після застосування поліетиленгліколю гідрогелю. Таку різницю між групами порівняння можна пояснити збільшенням кількості “тонких” слабо мієлінізованих нервових волокон на 2 місяці відновлення після застосування епіневрального шва і фібринового клею.

Аналіз ШПЗ у сідничому нерві псевдооперованих щурів не показав різниці у різні терміни експерименту, що вказує на відсутність впливу

хірургічного доступу до сідничого нерва на електрофізіологічні показники (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Швидкість проведення збудження у сідничому нерві щурів після хірургічного відновлення (мм/мс)

Група	2 тижні	1 місяць	2 місяці
НО	40,9±1,61		
ПО	37,6±3,11	44,4±3,42	41,1±2,54
ЕШ	31,6±1,98*	30,6±1,40*	25,4±1,79*@!
ПЕГ	30,4±3,02	37,9±2,94	30,0±0,98*@
ФК	36,8±2,97	33,9±1,09	31,1±3,22*@

Примітка. * $P < 0,05$ достовірно до показника групи НО; @ $P < 0,05$ достовірно відносно показника групи ПО; ^ $P < 0,05$ достовірно до показника групи ЕШ; # $P < 0,05$ достовірно відносно показника групи ПЕГ; ! $P = 0,05$ до показника у термін 1 місяць.

У групі ЕШ в різні терміни спостереження встановлено достовірно меншу ШПЗ щодо групи НО в середньому на 22,7 % ($P < 0,05$), 25,1 % ($P < 0,05$) і 37,9 % ($P < 0,05$), відповідно. Тобто, реєстрували низхідну динаміку показника, яка досягла статистично значущої різниці на 2 місяці експерименту (різниці щодо попереднього терміну 16,9 %, $P = 0,05$). Подібні результати виявлено у групах ПЕГ та ФК, але різниці щодо групи ЕШ не встановлено. Рівні показника ШПЗ у дослідних групах порівняння не досягли контрольних значень.

Висновки до розділу 3

Функціональні показники денервованої кінцівки відновлюються після мікрохірургічного з'єднання кінців травмованого сідничого нерва. Результати функціонального тесту кінцівки і ЕНМГ показали ранні ознаки відновлення при визначенні показника SFI. Так, з 2 тижня реєстрували

позитивну динаміку збільшення локомоторної функції кінцівки, яка не змінювалась після 4 тижня. Одночасно з цим, за результатами електрофізіологічних досліджень, збільшення М-відповіді є статистично значущим тільки на 60 добу після мікрохірургічного відновлення сідничого нерва, що є ознакою нервово-м'язового відновлення. Дані SFI і параметри М-відповіді задньої групи м'язів литки не відрізняються після застосування епіневральних швів та поліетиленгліколю гідрогелю. Відновлення у групі ПЕГ характеризувалось кращою динамікою, оскільки внутрішньогрупова різниця була статистично значущою між термінами 4 і 7-8 тижнів, тоді як після застосування тільки епіневрального шва або з фібриновим клеєм достовірного збільшення показника SFI не встановлено. Також підтверджено достовірно більшу амплітуду М-відповіді у групі ПЕГ порівняно до групи ФК. ШПЗ на 14 і 30 добу статистично значимо не відрізняється між групами порівняння з травмованим нервом, а на 60 добу достовірно зменшується відносно попередніх термінів спостереження, що може бути пов'язано з інтенсифікацією регенерації слабкомієлінізованих нервових волокон. Одержані результати вказують на потенційно краще нервово-м'язове відновлення при з'єднанні кінців травмованого нерва з використанням поліетиленгліколю гідрогелю порівняно з іншими дослідженими техніками.

Матеріали розділу висвітлені в наступних публікаціях:

1. Goncharuk O, Savosko S, Petriv T, Tatarchuk M, Medvediev V, Tsymbaliuk V. Epineurial sutures, polyethylene glycol hydrogel and fibrin glue in the sciatic nerve repair in rats: functional and morphological assessments in experiment. *Georgian Med News*. 2020 Dec;(309):124-131.

2. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Кореляційний аналіз параметрів електронейроміографії, функціонального тесту з рівнем регенерації травмованого сідничого нерва. *Укр. нейрохірург. журн.* 2021;27(2):34-40. doi: 10.25305/unj.227615.

3. Цимбалюк ВІ, Гончарук ОО, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Лузан БМ. Оцінка функціонального відновлення нервово-м'язового апарату у ранні терміни за умов різних видів з'єднань сідничного нерва при його травматичному ушкодженні в експерименті. В: Зб. наук. праць XVIII з'їзду ортопедів-травматологів України; 2019 Жовт 9-11; Івано-Франківськ. Івано-Франківськ; 2019. с. 197

4. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Цимбалюк ВІ. Порівняльний аналіз ефективності мікрохірургічного відновлення сідничного нерва за використання трьох технік: епіневрального шва, гідрогелю поліетиленгліколю та фібринового клею. In: Abstracts VI Ukrainian Winter Neurosurgical Ski Meeting; 2021 Берез 1-3; Bukovel, Ukraine; 2021. с, 54.

5. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Показники електронейроміографії литкового м'язу корелюють з рівнем регенерації сідничного нерва за різних способів мікрохірургічного відновлення. Укр. наук.-мед. молодіж. журн. 2021;(Спецвип 1, XIII Міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених Спеціальні питання та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору; 2021 Берез 18-19; Київ):30.

6. Goncharuk OO, Savosko SI, Petriv TI, Medvediev VV, Tsymbaliuk VI. Comparative analysis of the use of epineural suture, hydrogel DuraSeal and fibrin sealant Tisseel in the restoration of damaged sciatic nerve. Wiad Lek. 2021;74(3 cz 2, International scientific and practical conference, dedicated to the World health day, 2021 April 02; Kyiv):795. doi: 10.36740/WLek202103242.

7. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук М.М., Цимбалюк ВІ. Аналіз ефективності мікрохірургічного з'єднання кінців нерва епіневральним швом, DuraSeal та Tisseel. В: Тези доп. VII з'їзду нейрохірургів України з міжнар. участю; 2021 Трав 11-18; Сиде, Туреччина. с. 34-5.

РОЗДІЛ 4

МОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТРАВМОВАНОГО СІДНИЧОГО НЕРВА ПІСЛЯ МІКРОХІРУРГІЧНОГО ВІДНОВЛЕННЯ

4.1. Результати мікроскопічних та ультраструктурних досліджень сідничого нерва після різних технік мікрохірургічного відновлення

При гістологічному дослідженні сідничого нерва контрольної та дослідних груп щурів дослідницька увага була зосереджена на аналізі загальноморфологічних змін периферичного нерва та його структурних ознак і параметрів регенерації. Неушкоджений сідничий нерв контрольної групи щурів досліджувався з метою встановлення загальноморфологічних особливостей організації сідничого нерва у щура, з якими порівнювали стан дистального сегмента ушкодженого нерва після мікрохірургічного відновлення. Як показано на рис. 4.1, інтактний сідничий нерв щура на макроскопічному рівні має кілька фасцикулів і вздовж нерва реєструються кровоносні судини (на мікроскопічному рівні у структурі епіневрію).



Рис. 4.1. Сідничий нерв контрольної групи щурів. Інтактний нерв, на макроскопічному рівні реєструються кілька фасцикулів, невральні кровоносні судини епіневрію.

При мікроскопічному дослідженні поздовжніх гістологічних зрізів інтактного сідничого нерва реєстрували щільно орієнтовані нервові волокна (рис. 4.2). У мікропрепаратах, які були імпрегновані азотнокислим сріблом, чітко прослідковуються осьові циліндри і контур мієлінової оболонки. У фасцикулах нерва (2.8 ± 0.3 фасцикули у нерві) нервові волокна мають щільну, поздовжню орієнтацію. Ознак структурних порушень у досліджених зразках контрольної групи щурів не виявлено.

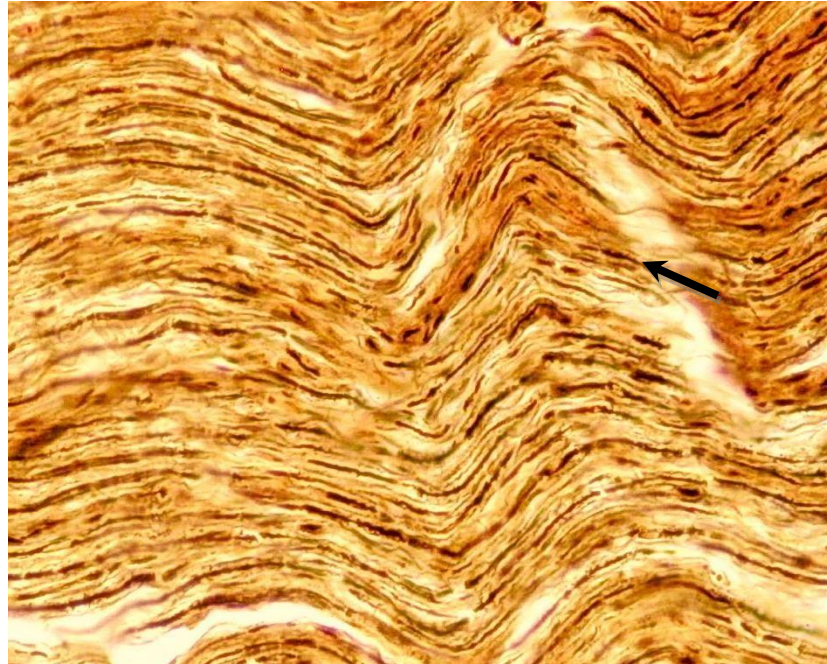


Рис. 4.2. Сідничий нерв контрольної групи щурів. Інтактні нервові волокна, щільна орієнтація нервових волокон, без ознак структурних порушень фасцикула нерва. Примітка: ← нервове волокно. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

Для встановлення впливу хірургічного доступу до периферичного нерва у дослідження було включено групу псевдооперованих щурів, яким моделювали доступ до сідничого нерва без його ушкодження. На макроскопічному рівні не виявлено будь-яких анатомічних відхилень сідничого нерва у порівнянні з контрольною групою щурів. На гістологічному рівні у фасцикулах нерва (14 доба 2.6 ± 0.2 , 30 доба 3.0 ± 0.3 і 60 доба 2.8 ± 0.2 фасцикули у нерві) реєстрували нервові волокна (рис. 4.3).

Їх щільність, особливості поздовжньої орієнтації візуально не відрізнялись від інтактного нерва у контрольній групі. У сідничому нерві щурів НО та ПО груп відмічено структурно неушкоджений пери- та епіневрій, в їх сполучній тканині встановлено наявність кровоносних судин.

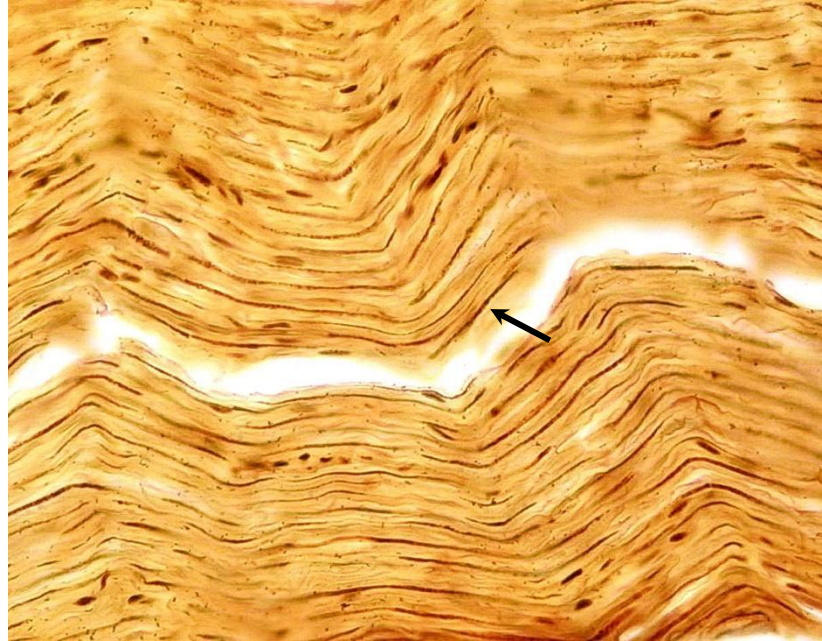


Рис. 4.3. Сідничий нерв щурів ПО групи. Реєструються окремі нервові волокна, загальноморфологічна організація фасцикула нерва не порушена. Примітка: ← нервові волокна. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

Для проведення морфометрії мієлінових нервових волокон було досліджено напівтонкі зрізи нерва у поперечній проекції (зabarвлення толуїдиновим синім за Nayat) (рис. 4.4). Як видно з мікрофотографій, більшість мієлінових нервових волокон має округлий або овальний контур, щільно орієнтовані у фасцикулі. Мієлінова оболонка та осьовий циліндр чітко реєструються. Між нервовими волокнами наявні тонкі стромальні елементи нерва, які на структурному рівні побудовані з пучків колагену і поодиноких фібробластів (елементи ендоневрію).

За результатами морфометричного аналізу мієлінових нервових волокон не виявлено достовірної різниці у групах порівняння за наступними показниками: щільність мієлінових нервових волокон, їх діаметр, середня

товщина мієлінової оболонки. Результати гістологічних та морфометричних досліджень показали інтактну будову сідничого нерва псевдооперованих щурів на третьому терміні експерименту. Тобто, моделювання хірургічного доступу до нерва не вплинуло на морфологію нерва і тому структурні зміни у дослідних групах є безпосереднім наслідком травматичного ушкодження і розвитку наступних процесів регенерації.

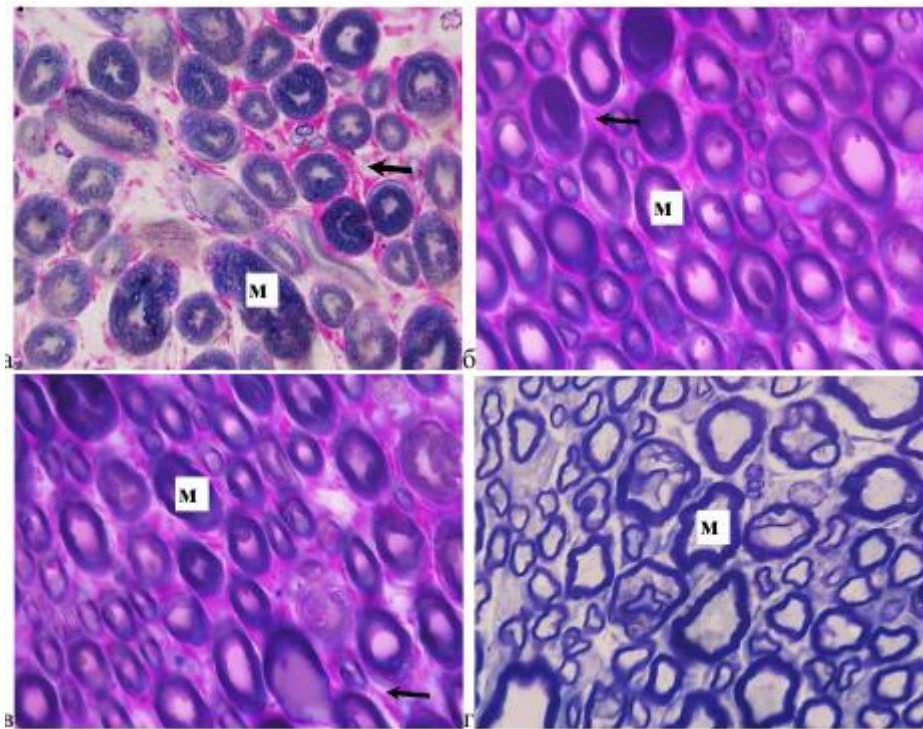


Рис. 4.4. Напівтонкі зрізи сідничого нерва у поперечній проекції контрольної та псевдооперованої груп щурів. Реєструються окремі мієлінові нервові волокна, осьові циліндри нервових волокон. Примітка: м – мієлінове нервове волокно; ← стромальні елементи у фасцикулі нерва (пучки колагенових волокон); а – контрольна група; б – псевдооперована група, 14 доба спостереження; в – псевдооперована група, 30 доба спостереження; г – псевдооперована група, 60 доба спостереження. Напівтонкий зріз. Забарвлення толуїдиновим синім за М. А. Науат. Об. 100, ок. 10.

При макроскопічному аналізі змін сідничого нерва у дослідній групі щурів, яким моделювали повний перетин нерва, ознак спонтанної

регенерації не виявлено. Окремо реєстрували проксимальний сегмент перетнутого нерва і різко змінений дистальний сегмент. Проростання новоутворених фасцикулів нерва у напрямку дистального сегмента не виявлено. Для порівняння було досліджено дистальний фрагмент нерва після перетину в поперечній проекції (рис. 4.5). За результатами гістологічних досліджень реєстрували тільки овоїди дегенерації (ламелярні утворення з продуктів деструкції мієлінових нервових волокон), стромальні елементи (пучки колагену) і поодинокі макрофаги з ліпідними включеннями у цитоплазмі. Поява останніх пов'язана з фагоцитозом та елімінацією клітинного детриту і овоїдів дегенерації нервових волокон. Дослідження дистального сегмента нерва після повного перетину і без застосування мікрохірургічних технік вказують на відсутність спонтанної регенерації периферичного нерва і розвиток тотальних дегенеративних процесів з його наступною атрофією.

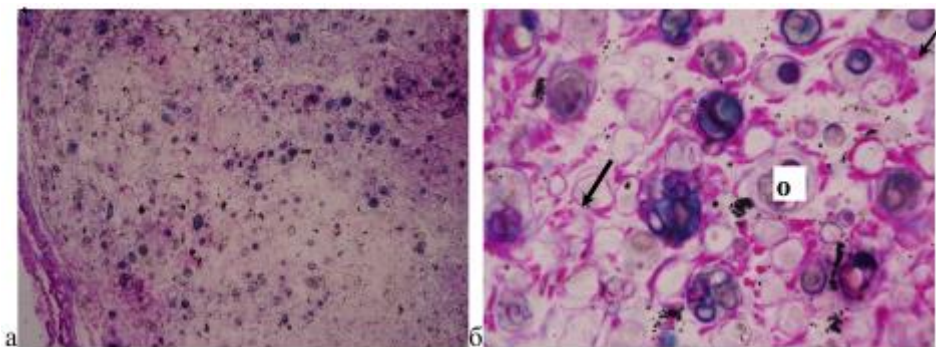


Рис. 4.5. Напівтонкі зрізи дистального сегмента сідничого нерва після повного перетину. Відсутні нервові волокна, реєструються овоїди дегенерації (ламелярні утворення), стромальні елементи нерва (структурно змінений ендоневрій). Примітка: о – овоїди дегенерації; ← стромальні елементи у фасцикулі нерва (пучки колагенових волокон). Термін спостереження 30 діб. Напівтонкий зріз. Забарвлення толуїдиновим синім за М. А. Науат. а: Об. 20, ок. 10; б: Об. 100, ок. 10.

Дослідження сідничого нерва після мікрохірургічного відновлення показало принципову іншу картину. По-перше, в усіх випадках встановлено

відновлення анатомічної будови (цілісності) сідничого нерва. Розриву шва не виявлено. По-друге, у ділянці шва була сформована слабо виражена регенераційна неврома. По-третє, атрофічних змін дистального сегмента нерва не реєстрували. Ці зміни доказово продемонстровані на рис. 4.6.

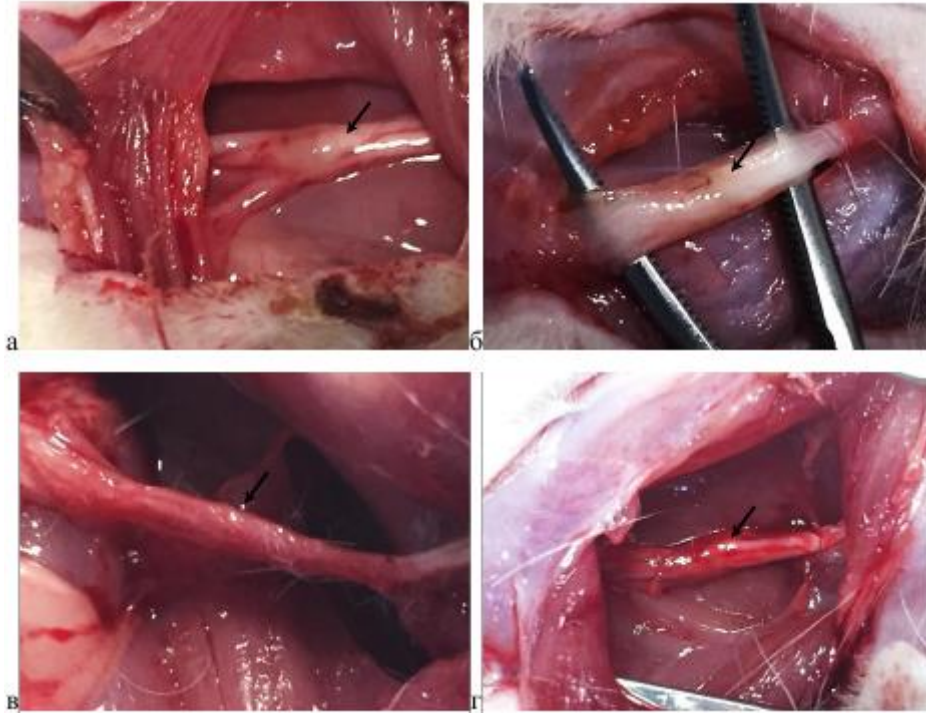


Рис. 4.6. Сідничий нерв після мікрохірургічного відновлення. Примітка: а – ПЕГ 2 тижнів; б – ПЕГ 8 тижнів; в – ФК 2 тижнів; г – ФК 8 тижнів; ← ділянка шва.

При дослідженні поздовжніх гістологічних зрізів сідничого нерва щурів після повного перетину з мікрохірургічним з'єднанням кінців нерва епіневральними швами та комбінованим способом, який полягає у кількох фіксуючих швах і застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю або фібринового клею, встановлено неспецифічні зміни та процеси, які можна оцінити як специфічні явища для груп комбінованої мікрохірургічної техніки. По-перше, у ділянці шва виявлено регенераційну неврому, яка на структурному рівні полягає у суттєвому збільшенні щільності вільних (дедиференційованих) нейролемоцитів, появи фіброblastів, колагенових волокон, регенерації кровоносних судин і появи регенеруючих нервових

волокон. Навколо шва встановлено розвиток сполучної тканини, яка оточує шовний матеріал, відділяє його від регенеруючої невроми. Шов оточений волокнистою сполучною тканиною і це вплинуло на локальне збільшення товщини епіневрію. Між 14 і 60 добою товщина нерва, яку вираховували на поздовжніх гістологічних зрізах, статистично достовірно збільшилась (формування невроми і збільшення сполучної тканини епіневрію). У групі ПЕГ у сполучній тканині епіневрію виявлено інкапсуляцію осередків поліетиленгліколю (фокальні скупчення діаметром від 90 до 1600 мкм) (рис. 4.7). Ці утворення локалізовані ексцентрично щодо умовної вісі регенеруючого нерва і реєструвались до 60 доби включно.

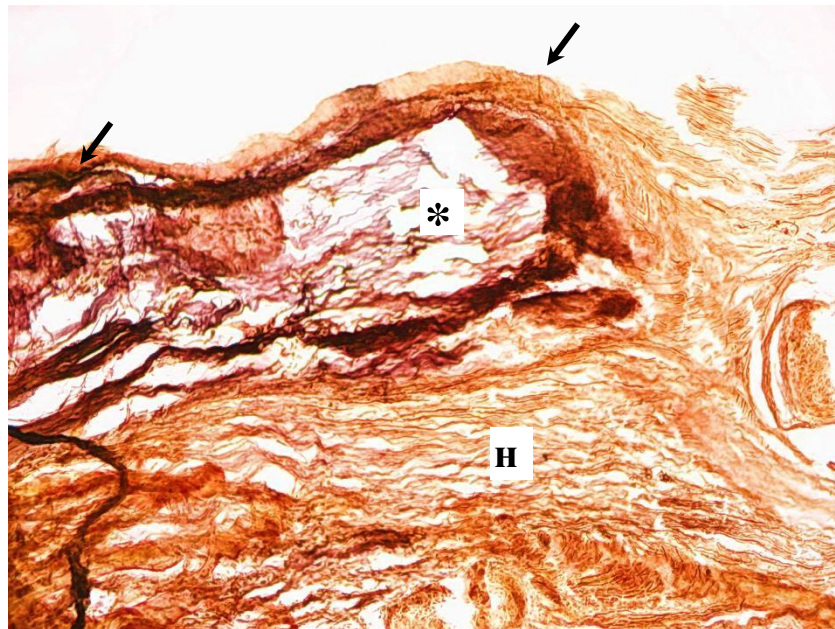


Рис. 4.7. Регенераційна неврома сідничого нерва щурів групи ПЕГ. Інкапсуляція гідрогелю (пластинчасті структури), ексцентрично від невроми, під епіневрієм. Примітка: н – неврома; * – гідрогель; ← епіневрій. Термін спостереження 60 діб. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 10, ок. 10.

У групі ФК також реєстрували скупчення фібрину, як гомогенні дрібні осередки, оточені тонким шаром сполучної тканини. Тобто, також відбувалась інкапсуляція фібринового клею, але на відміну від поліетиленгліколю гідрогелю ці скупчення були більш фокальними,

дрібнішими (діаметр від 100 до 200 мкм), хоча інколи вони були мультифокальними і на 60 добу вже не реєструвались (рис. 4.8).

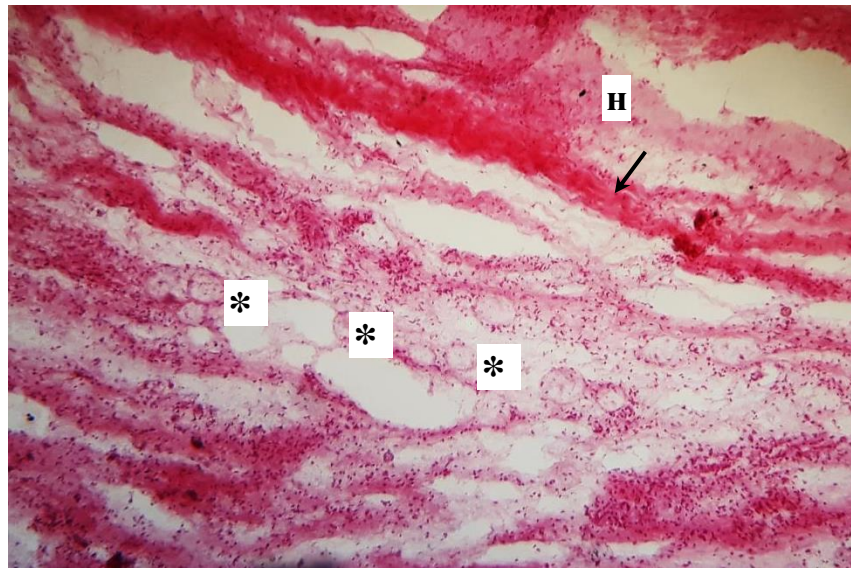


Рис. 4.8. Регенераційна неврома сідничого нерва групи ФК. Дрібні скупчення фібрину (гомогенні депозити) на рівні відновлення епіневрію. Примітка: н – неврома; * – фібриновий клей; ← епіневрій. Термін спостереження 30 діб. Забарвлення сіріусом червоним з пікриновою кислотою. Об. 10, ок. 10.

Скупчення фібрину були меншого діаметра і мали меншу щільність, що вказує на швидшу елімінацію і біодеградацію порівняно з поліетиленгліколем гідрогелем. При цьому елімінація досліджуваних засобів була послідовною, без появи запального інфільтрату. У групах з комбінованою технікою з'єднання кінців нерва товщина невроми (у центральній її ділянці) на 60 добу також збільшилась, як і у групі ЕШ, і залишалась у межах статистичної похибки щодо групи ЕШ (рис. 4.9). Тобто, суттєвих відмінностей у формуванні регенераційної невроми між різними способами мікрочірургічного відновлення периферичного нерва не встановлено. Тільки наявність скупчень інкапсульованих поліетиленгліколю гідрогелю і фібринового клею можна оцінювали як специфічний прояв їх застосування і впливу на розвиток невроми, формування сполучної тканини епіневрію.

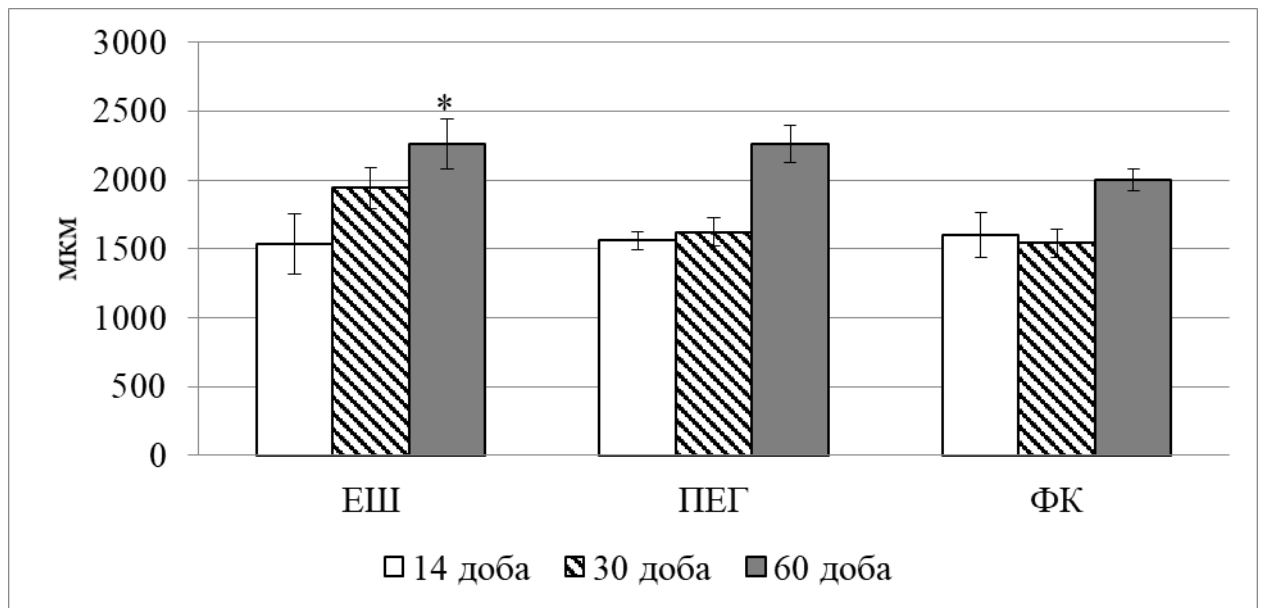


Рис. 4.9. Зміни товщини регенераційної невромі в ушкодженому сідничому нерві після мікрохірургічного відновлення (на основі морфометрії гістологічних мікропрепаратів). Примітка: * - $P < 0,05$ щодо показника на 14 добу спостереження.

У регенераційній невромі після трьох мікрохірургічних технік з'єднання кінців сідничого нерва встановлено регенерацію нервових волокон з проксимального сегмента нерва у напрямку дистального. Перетин периферичного нерва є механічною травмою і це позначилось на гістологічній будові проксимального кінця нерва. Так, реєстрували появу вільних нейролемоцитів і зменшення щільності нервових волокон та появу тонких регенеруючих волокон у невромі. Це є наслідком ушкодження та активації відновних процесів. У невромі щільність нервових волокон неоднорідна і залежала від відстані до ділянок шовного з'єднання кінців нерва (рис. 4.10, 4.11).

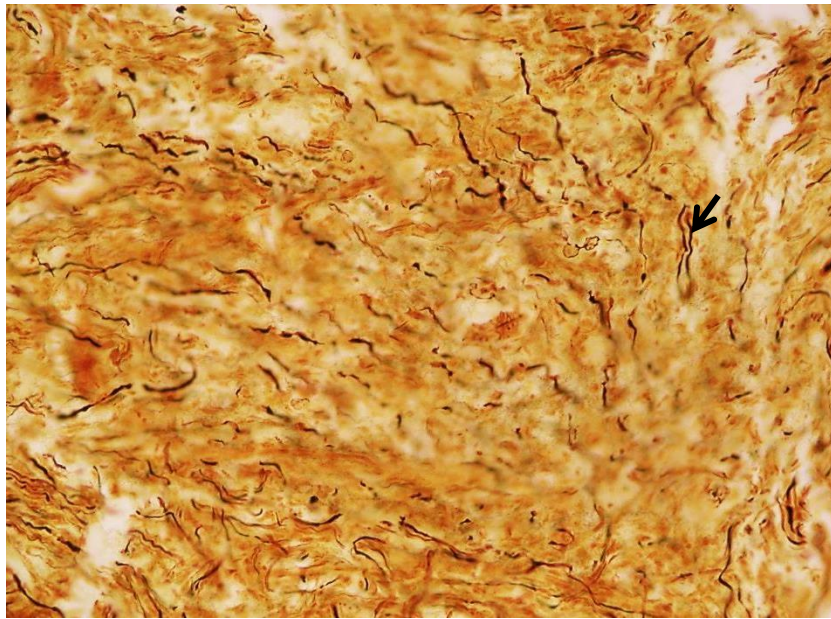


Рис. 4.10. Проксимальна частина регенераційної невромі сідничого нерва після мікрохірургічного відновлення нерва епіневральними швами. Примітка: ← нервові волокна. Термін спостереження 30 днів. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10.

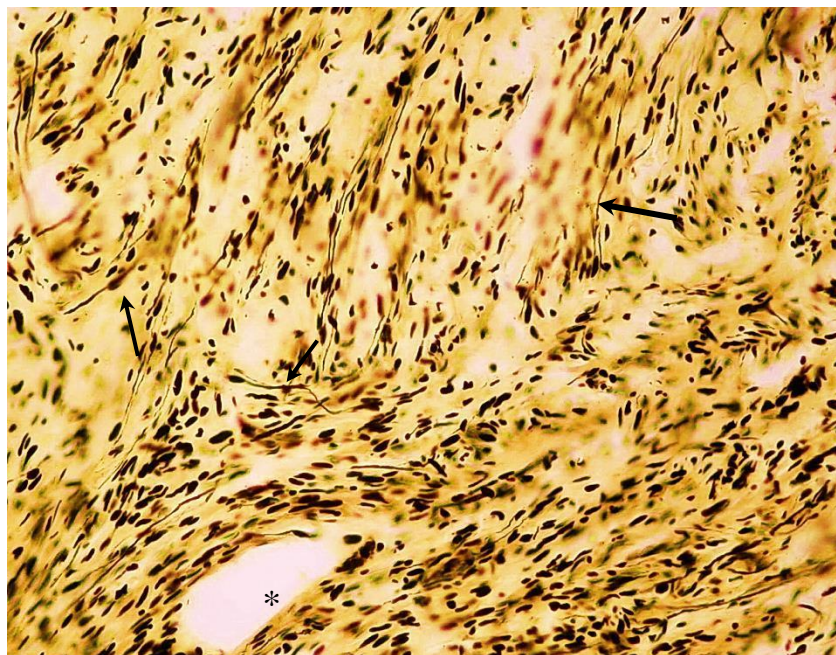


Рис. 4.11. Регенераційна неврома сідничого нерва щурів групи ПЕГ. Ділянка поблизу шва. Поодинокі нервові волокна регенерують у невромі. Примітка: * – місце шовного матеріалу; ← нервові волокна. Термін спостереження 30 днів. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10.

Шовний матеріал оточений осередками сполучної тканини, тому регенерація навколо них була меншою, ніж у центральній частині невромі. Нервові волокна на ранніх етапах регенерували поодинокі, а на 30 і 60 добу регенерація характеризується проростанням кластерів (груп волокон) нервових волокон.

Із збільшенням терміну спостереження реєстрували більшу щільність нервових волокон у невромі (рис. 4.12-4.15). Нервові волокна проростали через центральну частину невромі і рідше по її периферії. За результатами гістологічних досліджень, суттєвої різниці в особливостях формування регенераційної невромі і проростання нервових волокон у невромі між групами ЕШ, ПЕГ та ФК не виявлено.

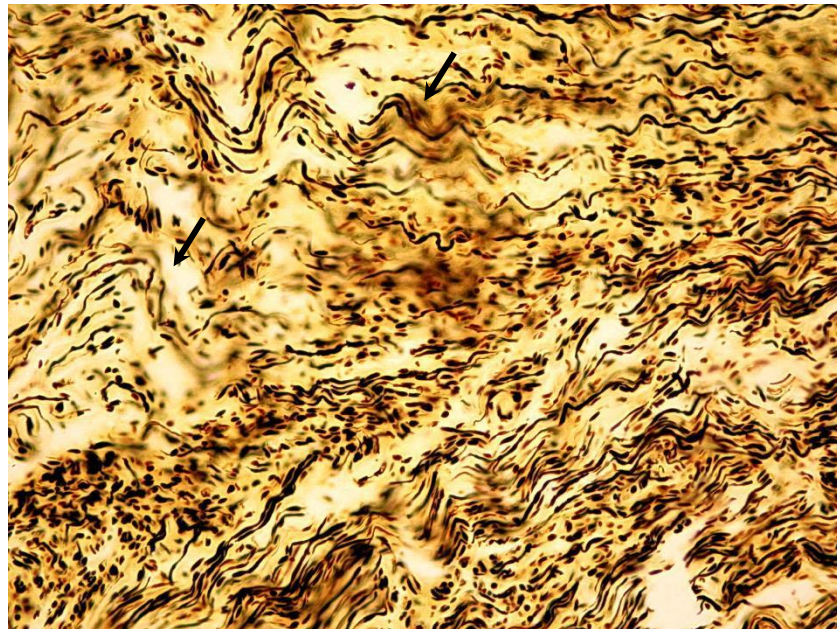


Рис. 4.12. Регенераційна неврома сідничого нерва групи ПЕГ. Щільно орієнтовані групи нервових волокон, активна регенерація. Примітка: ← нервові волокна. Термін спостереження 60 діб. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10.

Відмічено тільки незначне збільшення щільності нервових волокон у групах клейового з'єднання кінців нерва, що у більшій мірі реєстрували на 60 добу спостереження. Наявність поліетиленглікю гідрогелю і поступова елімінація фібринового клею у невромі є самостійними морфологічними

особливостями застосування цих досліджуваних засобів, але вони не погіршували відновні процеси і не викликали запальної реакції у невромі. Це, в свою чергу, вказує на їх біологічну безпеку та біодеградацію. Останнє явище у більшій мірі характерно для фібринового клею і, очевидно, реалізується швидше.

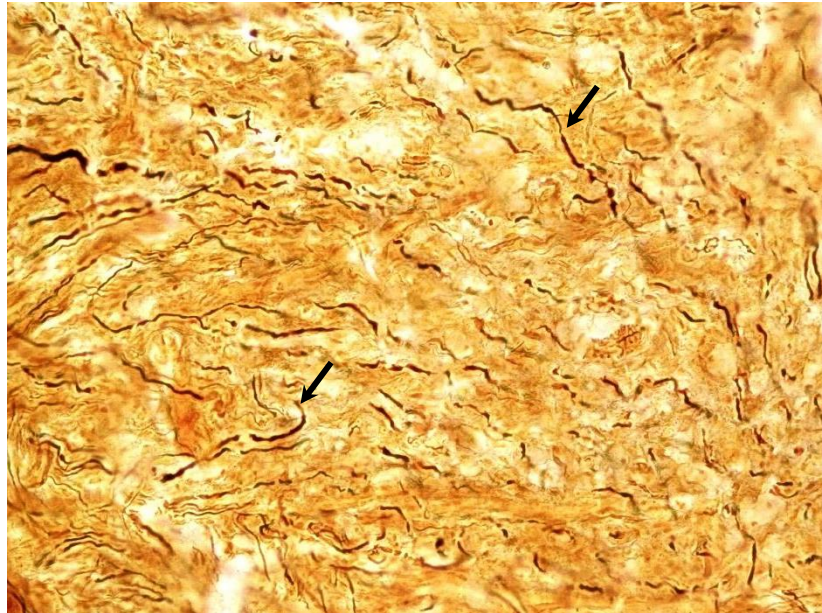


Рис. 4.13. Регенераційна неврома сідничого нерва групи ФК. Реєструються нервові волокна, щільна сітка колагену у невромі. Примітка: ← нервове волокно. Термін спостереження 30 доба. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10.

Слід відмітити, що регенерація нервових волокон супроводжувалась одночасною їх ремієлінізацією. На це вказує те, що в кластерах нервових волокон реєстрували муфти мієліну і перехвати Ранв'є. Направлений ріст нервових волокон у напрямку дистального сегмента нерва супроводжувався також морфологічними ознаками неуспішної регенерації. Так, в невромі виявлено поодинокі «спіралі Перрончіто», що являють собою нервові волокна з затриманою, порушеною регенерацією (рис. 4.16). Такі одиниці виявлено на 60 добу у групі ФК і поодинокі – у групі ПЕГ.

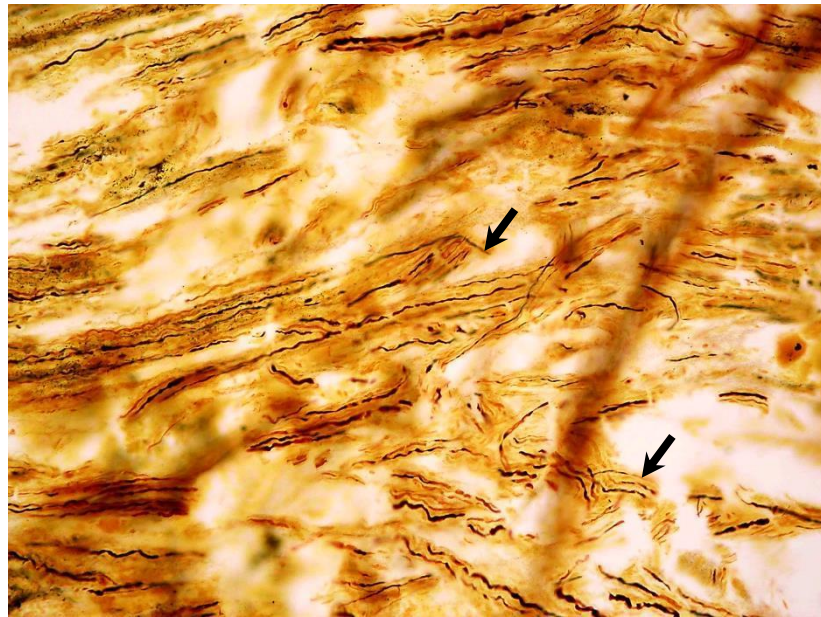


Рис. 4.14. Ділянка переходу регенераційної невроми у дистальний сегмент сідничого нерва у групі ФК. Нервові волокна реєструють кластерами. Примітка: ← нервове волокно. Термін спостереження 30 доба. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10.

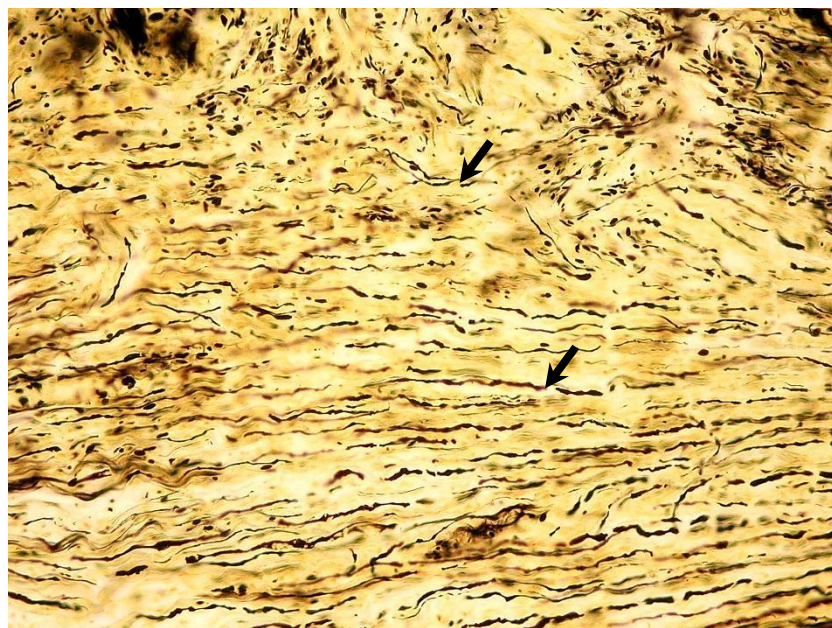


Рис. 4.15. Регенераційна неврома сідничого нерва групи ФК. Збільшення щільності регенеруючих нервових волокон, реєструються рекурентні волокна. Примітка: ← нервове волокно. Термін спостереження 60 доба. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 20, ок. 10.

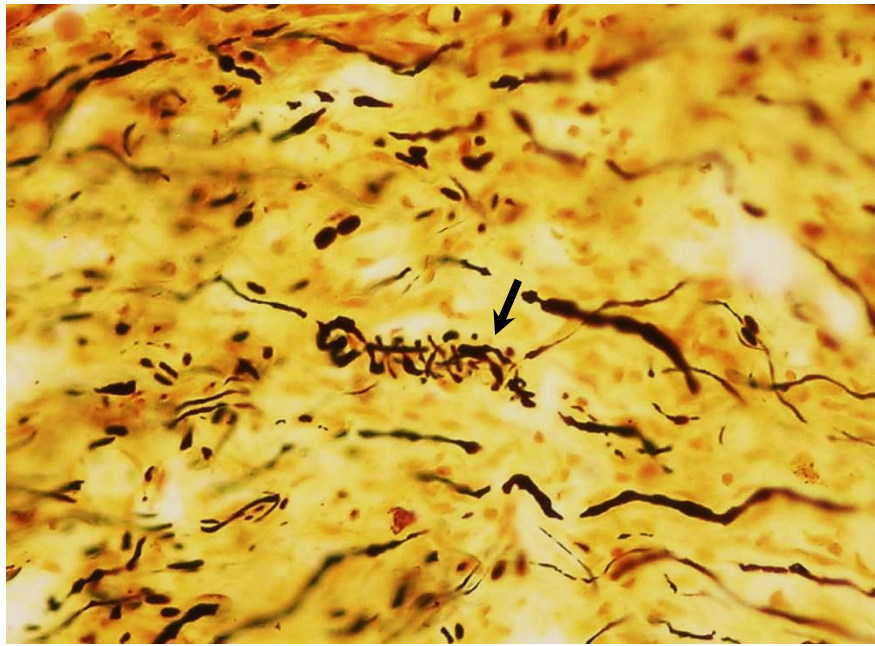


Рис. 4.16. Регенераційна неврома сідничого нерва групи ФК. Утворення «спіралей Перрончіто» як морфологічний прояв затриманої регенерації. Примітка: ← спіраль Перрончіто. Термін спостереження 60 доба. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

Також виявляли рекурентні волокна, тобто нервові волокна з оберненим напрямом росту. Такі явища пов'язані з наявністю у невромі інших, вторинних факторів, які впливають на проростання нервових волокон (колб росту). Передбачається, що такими фізичними бар'єрами на шляху регенеруючих нервових волокон є новоутворений колаген, який синтезують фібробласти у ділянці травматичного ушкодження нерва, а саме сполучної тканини фасцикулів. Крім того, відбувається регенерація ушкоджених кровоносних судин травмованого нерва і це також характеризується утворенням колагенових волокон вздовж судин та у складі їх сполучнотканинної оболонки. У власних дослідженнях по регенерації сідничого нерва на рівні шва нерва, зокрема у мікропрепаратах, які забарвлювали сіріусом червоним (має специфічну тропність до колагену), встановлено щільну сітку колагенових волокон у невромі (рис. 4.17). Зроблено висновок, що колагеногенез у ділянці шва периферичного нерва є фактором затримки регенерації.

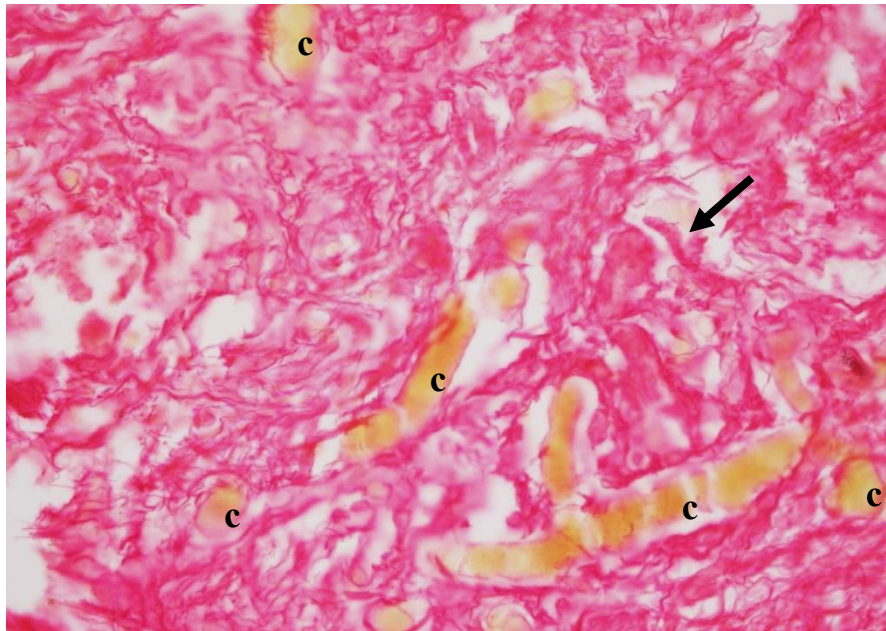


Рис. 4.17. Ділянка регенераційної невроми. Щільна сітка колагенових волокон і регеновані кровоносні судини на 60 добу після мікрохірургічного відновлення сідничого нерва із застосуванням фібринового клею. Примітка: с – судини, ← колаген. Забарвлення сіріусом червоним з пікриновою кислотою. Об. 20, ок. 10.

При дослідженні дистального сегмента сідничого нерва виявлено окремі фасцикули, регеновані кровоносні судини і нервові волокна. Кількість фасцикулів у групах порівняння була у межах 2-3 і не відрізнялась від інтактного нерва. Появи новоутворених фасцикулів не виявлено, нервові волокна регенерували у наявні фасцикули збереженого дистального сегмента. Тобто, у всіх досліджених зразках дистальний сегмент нерва після мікрохірургічного відновлення зберігав фасцикулярну будову. Поліетиленгліколь гідрогель і фібриновий клей не вплинули на зміну фасцикулів нерва. Товщина дистального сегмента нерва також не зазнала суттєвих змін.

За результатами гістологічних досліджень виявлено регеновані нервові волокна у дистальному сегменті нерва (рис. 4.18-4.20). На 14 добу зареєстровані поодинокі волокна близько до невроми, а на 30 і 60 добу

суттєво збільшилась їх щільність і відстань проростання у дистальний сегмент.

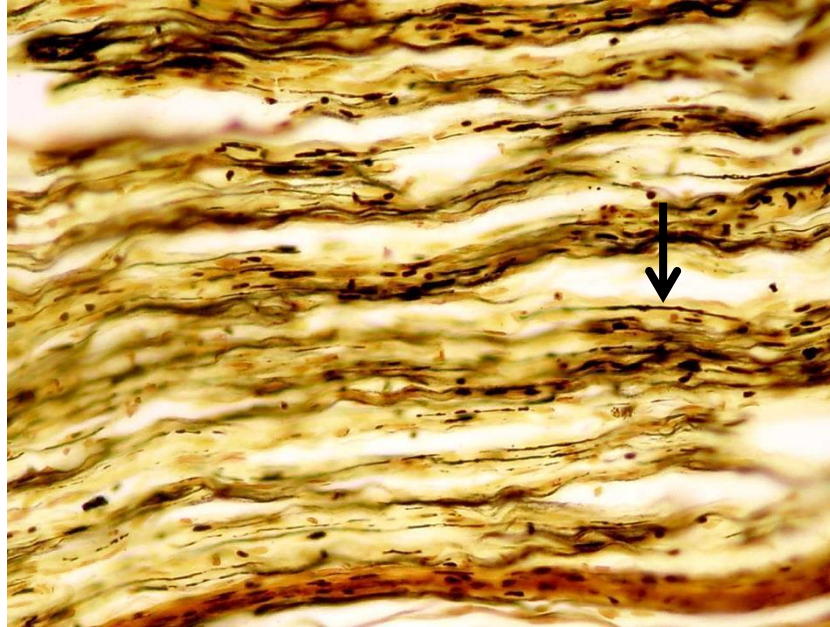


Рис. 4.18. Дистальний сегмент сідничого нерва після мікрохірургічного відновлення нерва епіневральними швами. Примітка: ← нервові волокна. Термін спостереження 60 доба. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

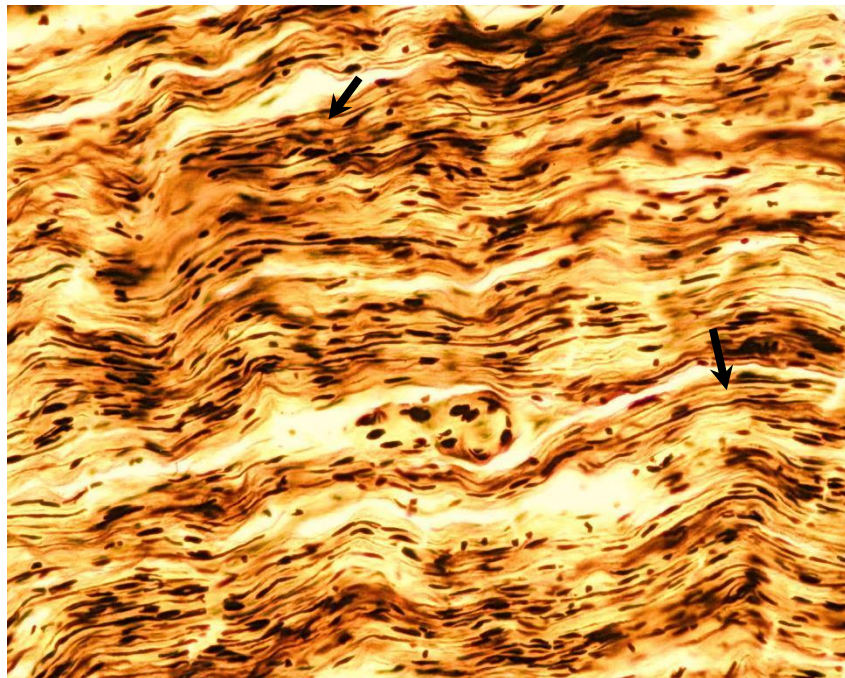


Рис. 4.19. Дистальний сегмент сідничого нерва ПЕГ. Тонкі нервові волокна щільно регенерують у дистальному сегменті нерва. Реєструються поодинокі вільні нейролемоцити. Примітка: ← нервові волокна. Термін спостереження 60 доба. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

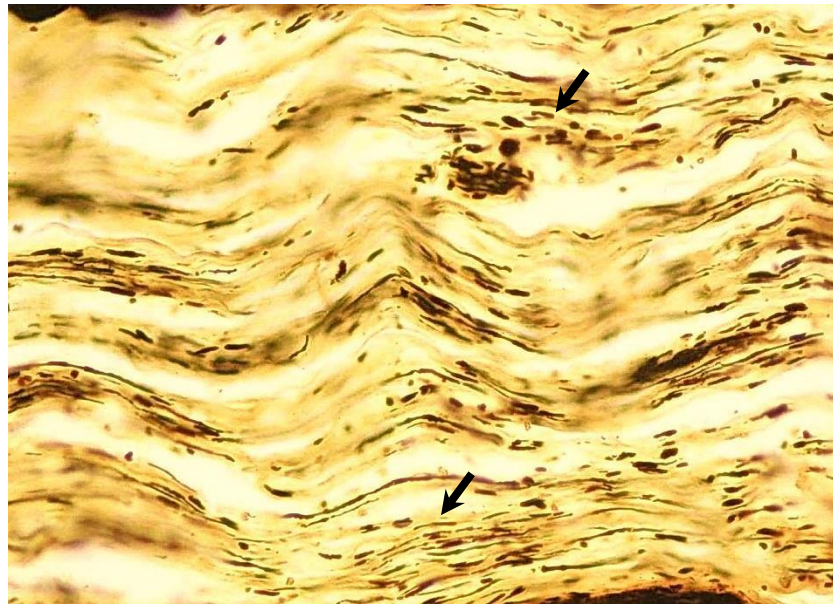


Рис. 4.20. Дистальний сегмент сідничого нерва групи ФК. Наявні регенеровані нервові волокна, поодинокі вільні нейролемоцити. Примітка: ← нервові волокна. Термін спостереження 60 доба. Імпрегнація азотнокислим сріблом. Об. 40, ок. 10.

Морфометричну оцінку регенерації мієлінових нервових волокон проведено на поперечних зрізах дистального сегмента нерва (напівтонкі зрізи забарвлені толуїдиновим синім). Це дозволило виявити мієлінові нервові волокна, кількісно оцінити їх щільність, динаміку їх регенерації і ступінь ремієлінізації осьових циліндрів. У табл. А.4 дод. А наведено результати морфометрії та статистичного аналізу. Встановлено, що регенерація мієлінових нервових волокон у групах порівняння відбувалась з різною динамікою. На 14, 30 і 60 добу спостереження у всіх трьох дослідних групах виявлено тонкі регенеруючі мієлінові нервові волокна у дистальному сегменті сідничого нерва. На 14 добу нервові волокна малого діаметра (в середньому 4-6 мкм), з тонкою мієліновою оболонкою.

У групі ЕШ число нервових волокон достовірно зростало між 14 і 60 добою (значення щодо 30 доби були у межах статистичної похибки). За результатами морфометрії, регенерація мієлінових нервових волокон у групі у три терміни спостереження в середньому була на рівні 12,6, 18,7 і 22,5 %,

відповідно, що статистично менше від значень у групі ПО і НО ($P < 0,05$) (рис. 4.21).

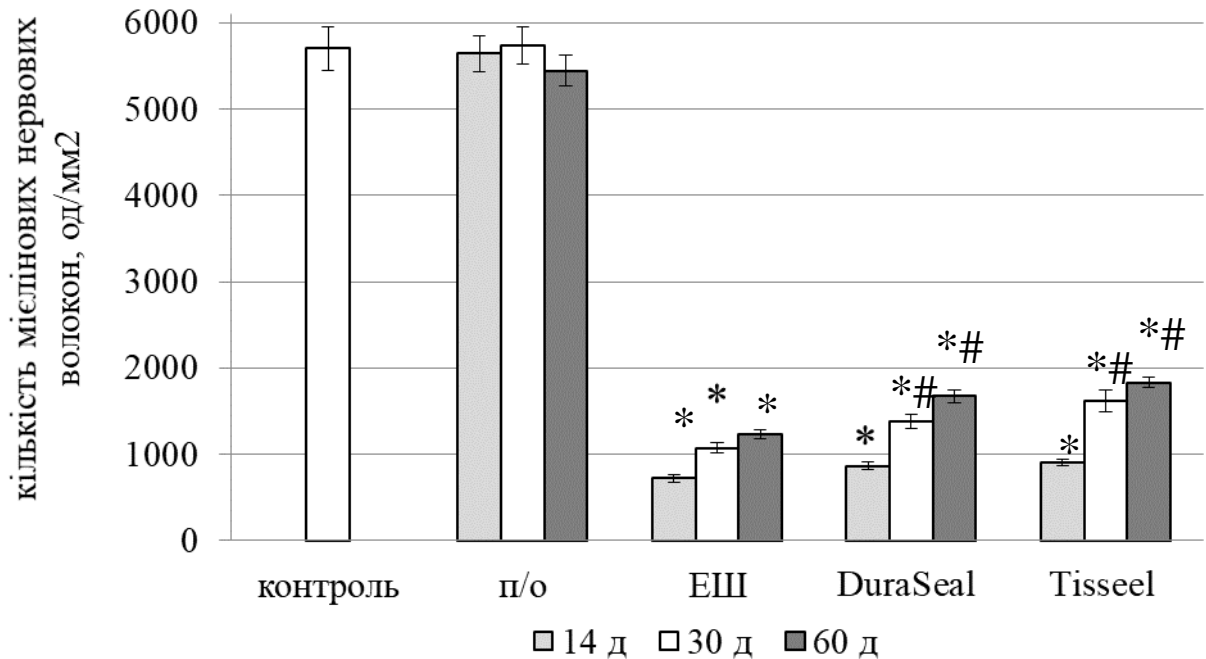


Рис. 4.21. Середня щільність регенованих мієлінових нервових волокон у дистальному кінці нерва після мікροхірургічного відновлення (од/мм²). Примітка: * $P < 0,05$ достовірно до значень контролю і ПО групи; # $P < 0,05$ достовірно до показника групи ЕШ.

Діаметр мієлінових нервових волокон не відрізнявся між термінами спостереження. На 60 добу виявлено тенденцію до збільшення кількості нервових волокон більшого діаметра (в середньому 6-8 мкм), але це не вплинуло на загальну оцінку (середній діаметр більшості волокон 4-6 мкм, тоді як у контролі 14-18 мкм). Тобто, на 60 добу регеновані мієлінові нервові волокна у дистальному сегменті нерва не досягали морфологічних показників інтактного нерва. Діаграми розподілу мієлінових нервових волокон за діаметром наведено на рис. А.1 дод. А, а мікрофотографії напівтонких зрізів на рис. 4.22.

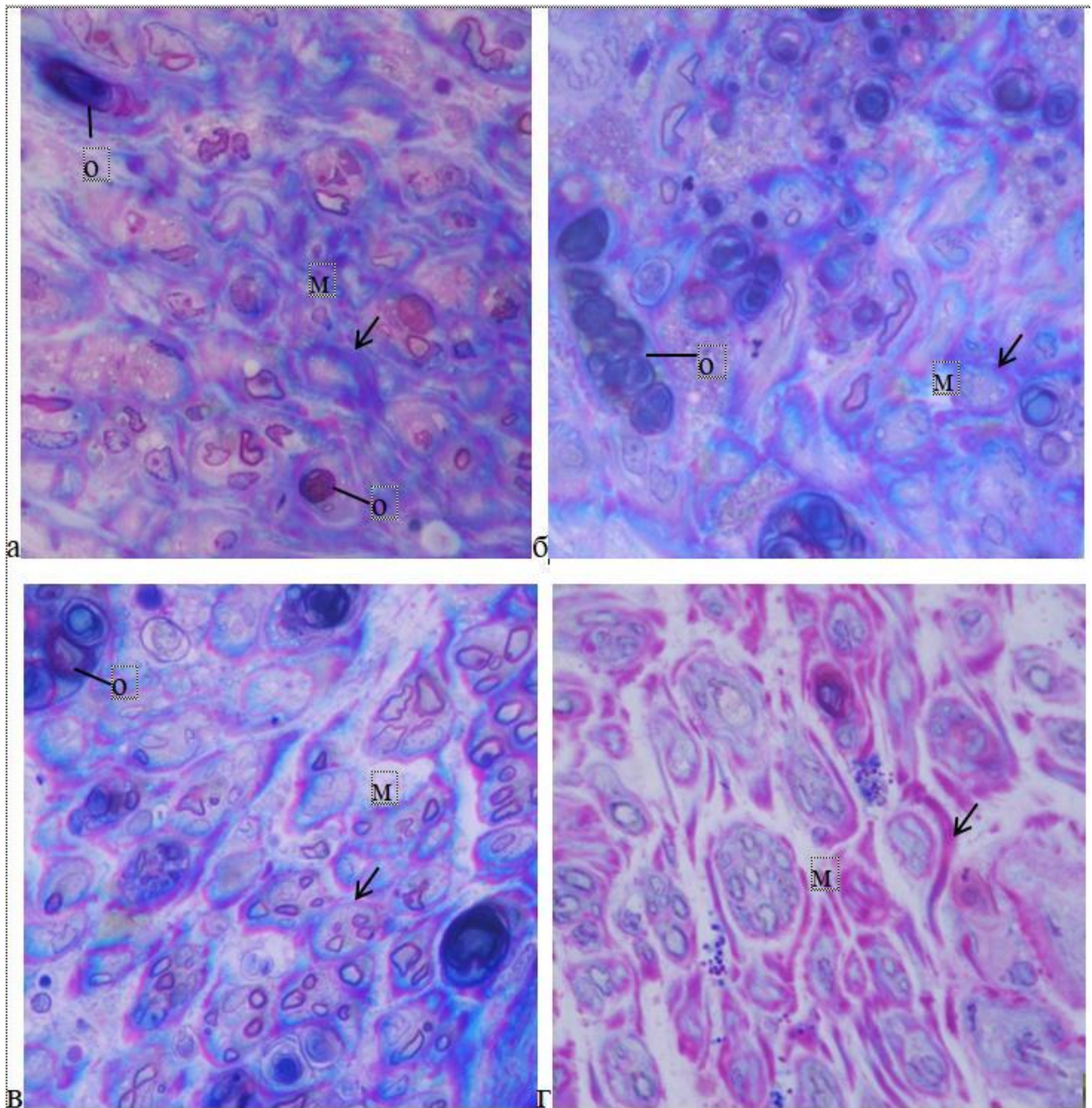


Рис. 4.22. Дистальний сегмент сідничого нерва групи ЕШ. Збільшення щільності регенованих мієлінових нервових волокон, елімінація овоїд дегенерації, збереження та відновлення ендоневральних каналів. Примітка: о – овоїди дегенерації; м – мієлінове нервове волокно; ← стромальні елементи у фасцикулі нерва (пучки колагенових волокон); а – 14 доба; б, в – 30 доба; г – 60 доба; Напівтонкий зріз. Забарвлення толуїдиновим синім за М. А. Науат. Об. 100, ок. 10.

За результатами морфометрії та статистичного аналізу зроблено заключення, що найбільш істотні зміни в динаміці регенерації та мієлінізації

нервових волокон у дистальному сегменті нерва відбуваються у термін між 30 і 60 добою.

Після мікрохірургічного відновлення сідничого нерва шляхом виконання двох «фіксуючих» швів і застосування поліетиленгліколю гідрогелю щільність нервових волокон у дистальному сегменті нерва зростала істотніше, порівняно до групи ЕШ (табл. А.1 дод. А). Щільність нервових волокон достовірно не збільшилась порівняно зі значеннями на 14 добу, а статистично значиму різницю встановлено на 30 і 60 добу (на 28,5 і 36,2 %, відповідно, щодо середніх значень у групі ЕШ, $P < 0,05$). Рівень регенерації мієлінових нервових волокон на трьох термінах дослідів становив 15,3, 24,1 і 30,7 %, відповідно. Встановлено швидшу й активнішу ремієлінізацію проростаючих осьових циліндрів у дистальній сегмент нерва (рис. 4.23).

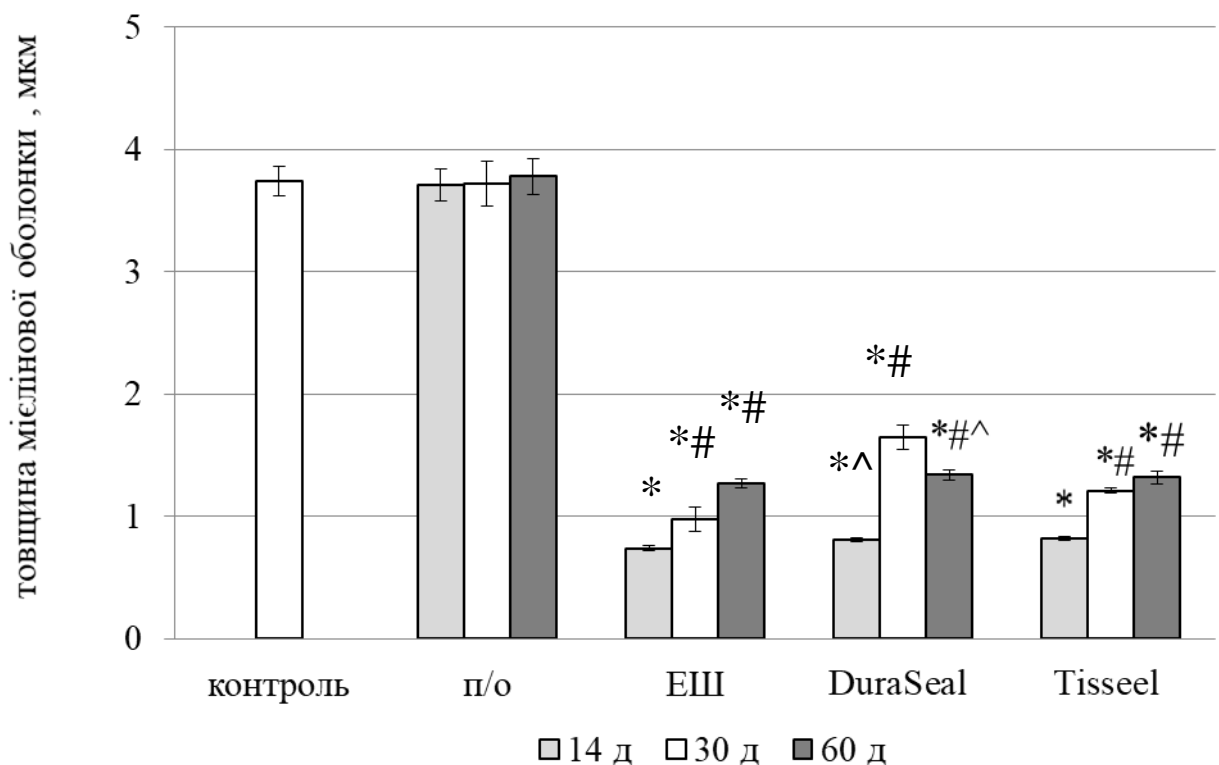


Рис. 4.23. Середня товщина мієлінової оболонки нервових волокон у дистальному кінці нерва після мікрохірургічного відновлення (мкм). Примітка: * $P < 0,05$ достовірно до значень контролю і ПО групи; # $P < 0,05$ достовірно до показника групи ЕШ; ^ $P < 0,05$ достовірно відносно групи ПЕГ.

Діаметр мієлінових нервових волокон і товщина мієлінової оболонки достовірно збільшилися на 30 добу (поява волокон більшого діаметра, від 8 до 16 мкм, хоча домінували волокна з середнім діаметром 4-6 мкм), а на 60 добу реєстровано приріст тонких волокон, що позначилось на перерозподілі середнього діаметрау мієлінових нервових волокон (діаграми на рис. А.1 дод. А). При порівнянні з групою ЕШ встановлено статистично значущу різницю на 14 і 30 добу спостереження. Тобто, на кінцевий термін спостереження темпи проростання нервових волокон після стандартного епіневрального шва наближалися до відповідного показника у групі ПЕГ. Це вказує на те, що застосування поліетиленгліколю гідрогелю позитивно позначилось на темпах регенерації і відновлення мієлінової оболонки, тобто взаємодії нейрон-нейролемоцит. Мікрофотографії напівтонких зрізів дистального сегмента сідничого нерва групи ПЕГ наведено на рис. 4.24.

У групі ФК також виявлено позитивну динаміку відновного процесу. Про це свідчать як результати морфометричного аналізу мієлінових нервових волокон, так і щільність їх розподілу у нерві. Діаграми розподілу регенерованих нервових волокон наведено на рис. А.1 дод. А, а мікрофотографії напівтонких зрізів нерва наведено на рис. 4.25.

Рівень регенерації мієлінових нервових волокон у три терміни спостереження в середньому становив 16,0, 28,2 і 33,6 %, відповідно ($P < 0,05$).

Порівнюючи результати досліджень з групою ЕШ виявлено, що щільність мієлінових нервових волокон достовірно збільшилась на 30 і 60 добу (на 50,3 і 48,7 %, відповідно, щодо середніх значень у групі ЕШ, $P < 0,05$), а діаметр волокон і товщина мієлінової оболонки – тільки на 14 добу.

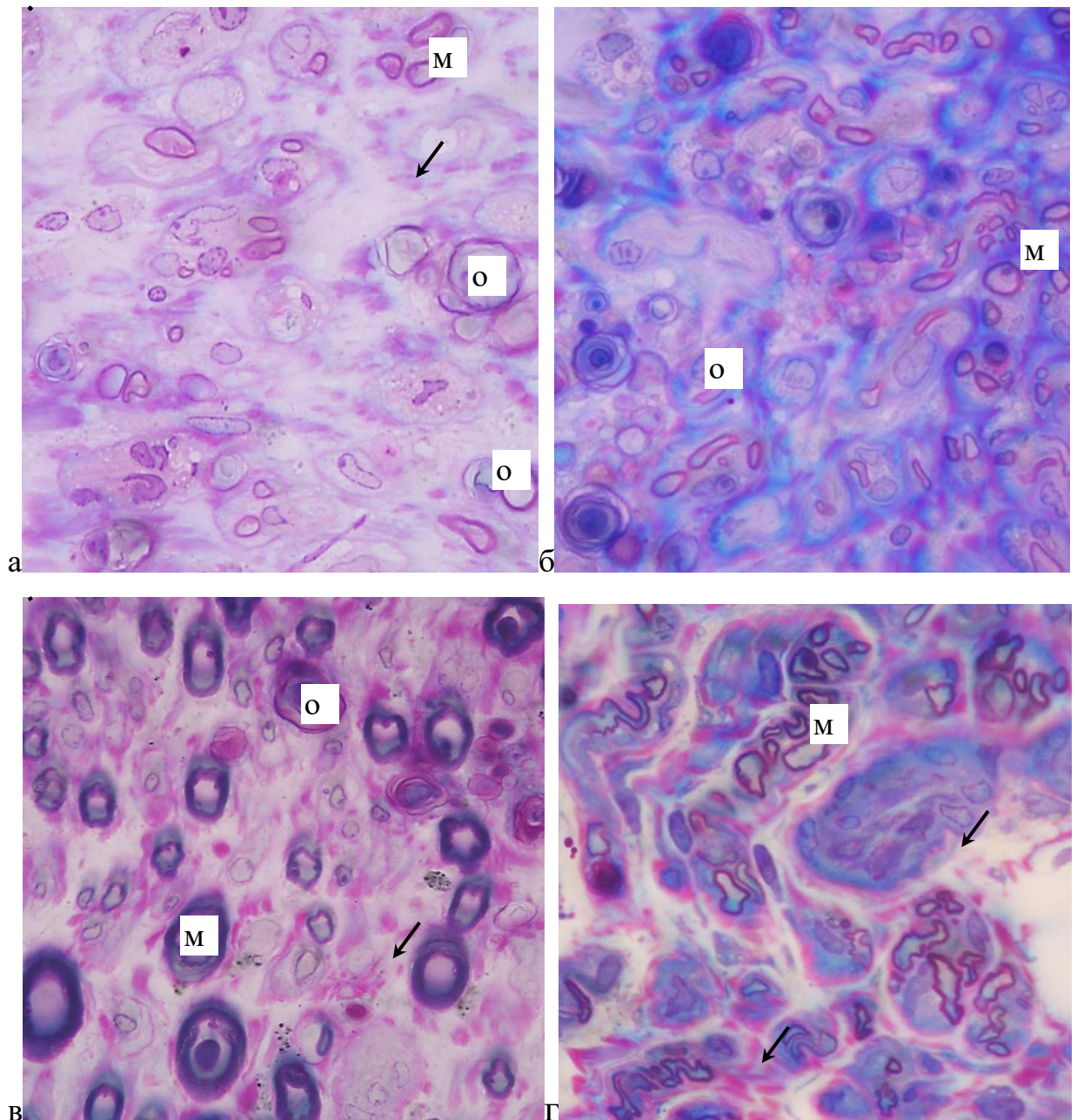


Рис. 4.24. Дистальний сегмент сідничого нерва після повного перетину та мікрохірургічного відновлення із застосуванням поліетиленгліколю гідрогелю. Істотне збільшення щільності і ремієлізації нервових волокон, елімінація овоїдів дегенерації. Примітка: о – овоїди дегенерації; м – мієлінове нервеве волокно; ← стромальні елементи у фасцикулі нерва (пучки колагенових волокон); а – 14 доба; б, в – 30 доба; г – 60 доба; Напівтонкий зріз. Забарвлення толуїдиновим синім за М. А. Науат. Об. 100, ок. 10.

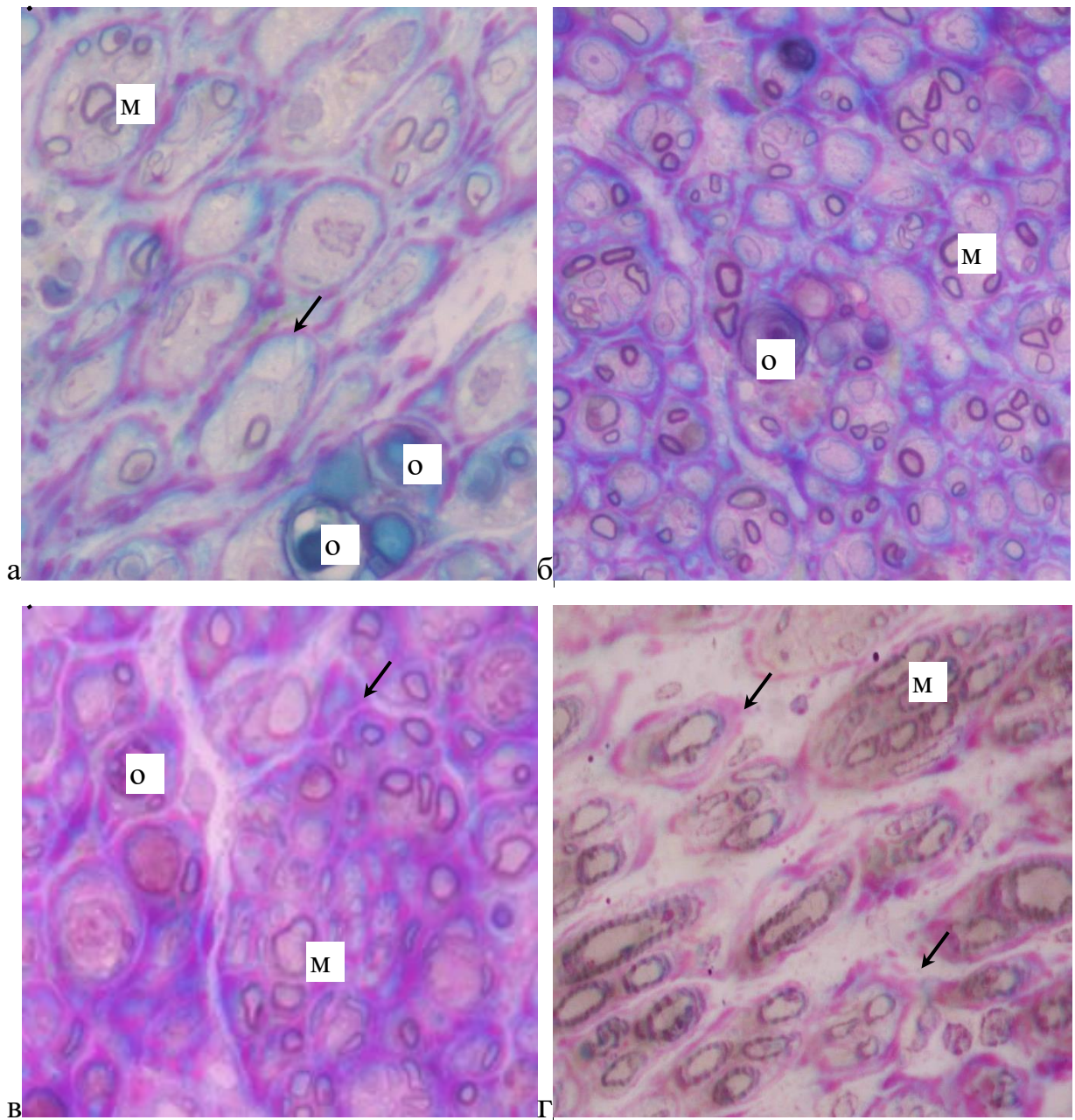


Рис. 4.25. Дистальний сегмент сідничого нерва після повного перетину та мікрохірургічного відновлення із застосуванням фібринового клею. Нервові волокна регенерують кластерами, збереження ендоневральних каналів, активна ремієлінізація. Примітка: о – овоїди дегенерації; м – мієлінове нервово волокно; ← стромальні елементи у фасцикулі нерва (пучки колагенових волокон); а – 14 доба; б, в – 30 доба; г – 60 доба; Напівтонкий зріз. Забарвлення толуїдиновим синім за М. А. Науат. Об. 100, ок. 10.

При цьому це збільшення динаміки регенерації у порівнянні з групою ПЕГ не встановлено, а морфометричні показники мієлінових нервових волокон були дещо меншими від значень у цій групі на 30 і 60 добу. За результатами аналізу діаграм розподілу мієлінових нервових волокон за діаметром на кожен термін спостереження (рис. А.2 дод. А), встановлено збільшення відносної кількості волокон більшого калібру порівняно з групою ЕШ. Для порівняння, на 14 і 30 добу майже вдвічі збільшилась кількість волокон з діаметром 6-8 мкм, хоча домінували волокна меншого калібру, як у групі ЕШ, а на 60 добу між групами порівняння суттєвої різниці вже не виявлено. Одержані результати вказують на те, що за умов застосування фібринового клею вдається пришвидшити темпи регенерації мієлінових нервових волокон у ранньому відновлювальному періоді. Тобто, збільшується щільність регенеруючих нервових волокон, а їх ремієлінізація має подібну динаміку і особливості, як у групі ЕШ.

На жаль, методи світлової мікроскопії мають певні обмеження у дослідженні структурних основ регенерації периферичного нерва, що пов'язано з обмеженою роздільною здатністю світлового мікроскопа. Методи електронної мікроскопії дозволяють дослідити структури за межами роздільної здатності, а саме ультраструктуру нервових волокон. Рис. 4.26 ілюструє мієлінові та безмієлінові нервові волокна у інтактному нерві щурів групи НО. Мієлінова оболонка на ультраструктурному рівні представлена щільно структурованими ламелями (осміофільні), щільно контактують з мембраною осевого циліндра (з аксолемою). Між мієліновими волокнами у інтактному нерві реєструються тонкі кластери безмієлінових волокон (від 4 до 12 волокон). У міжклітинному просторі наявна помірна щільність колагенових волокон.

У травматично ушкодженому нерві ультраструктура нерва суттєво відрізняється від інтактного. На рис. 4.27 показано регенерацію нервових волокон у три терміни спостереження. Так, на 14 добу реєстрували чисельні

овоїди дегенерації (ламелярні структури, які є продуктами дегенерації мієліну), щільність яких на 30 добу різко зменшилась, а на 60 добу зустрічали тільки поодинокі овоїди (або вони взагалі були відсутні у досліджуваному зразку). На 14 добу виявлено тонкі безмієлінові волокна. У наступні терміни експерименту діаметр і кількість осьових циліндрів у безмієлінових волокнах істотно зростали. Збільшувалась щільність нервових волокон, їх діаметр і товщина мієлінової оболонки. Встановлено прогресуюче збільшення регенерації безмієлінових нервових волокон одночасно з мієліновими.

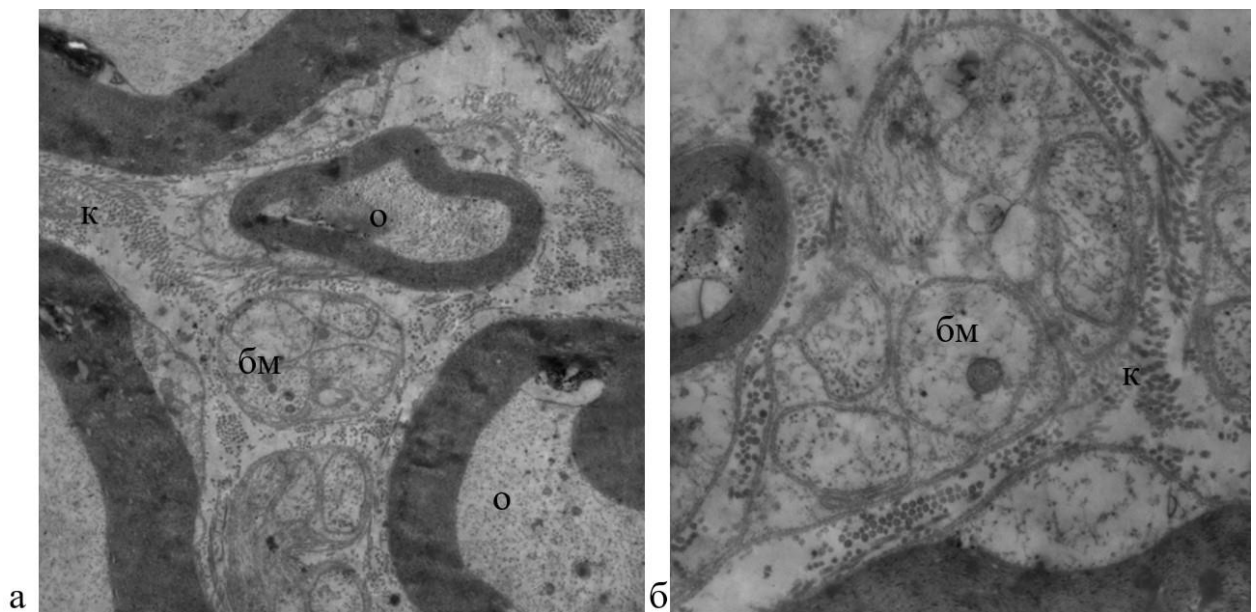


Рис. 4.26. Електронограма інтактних мієлінових та безмієлінових нервових волокон сідничого нерва контрольної групи щурів. Примітка: м – мієлінова оболонка; о – осьовий циліндр; бм – безмієлінові нервові волокна; к – колагенові волокна. Електронограма: а – зб. 7800; б – зб. 14000.

У міжклітинному просторі виявлено збільшення щільності пучків колагенових волокон, на ранніх термінах відновлення колаген складає істотну частину у загальній структурі дистального сегмента нерва. В подальшому регенеруючі волокна проростають між колагеновими волокнами.

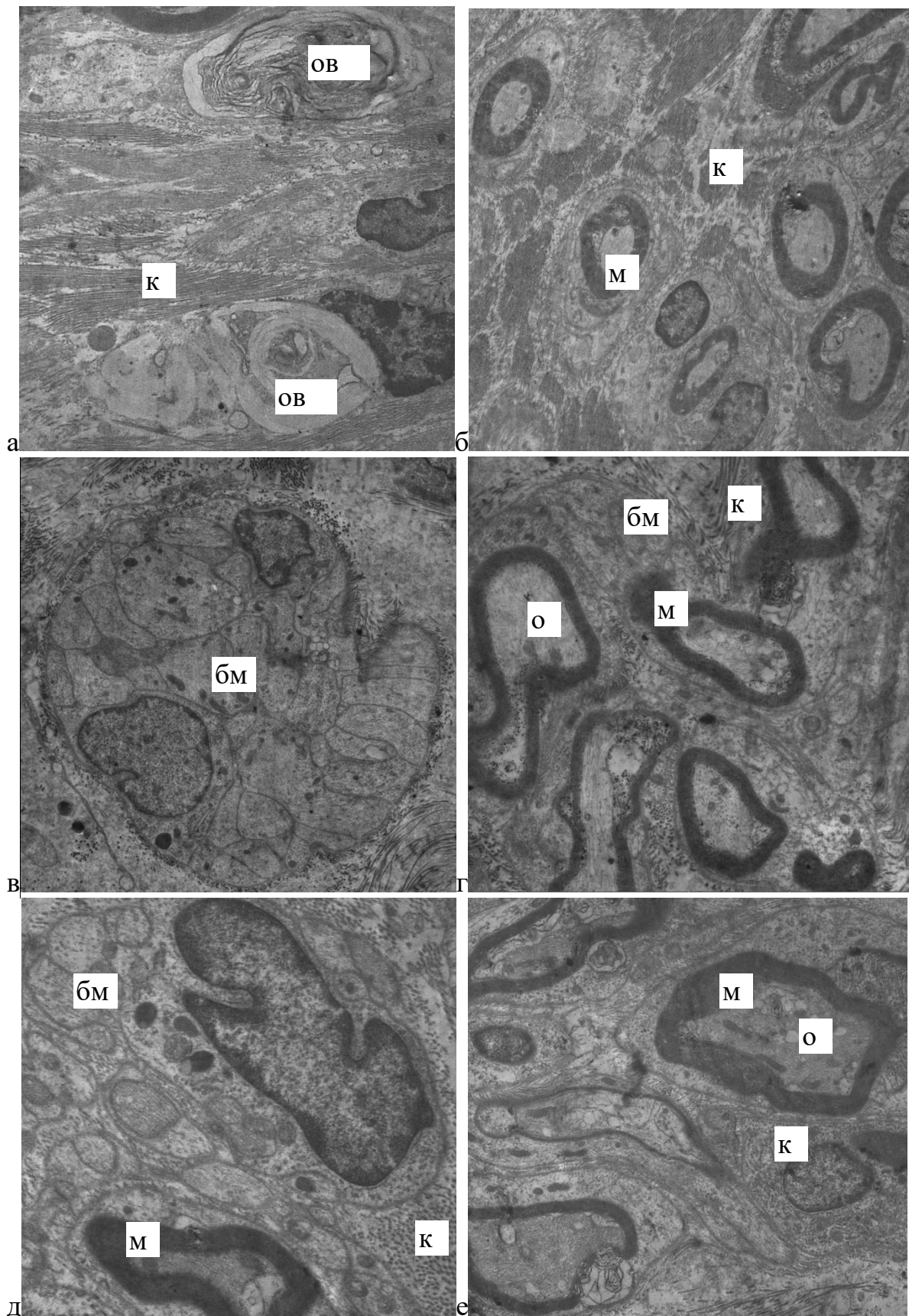


Рис. 4.27. Дистальний сегмент сідничого нерва після повного перетину та мікрохірургічного відновлення епіневральним швом. Примітка: ов – овоїди; м – мієлінова оболонка; бм – безмієлінові волокна; о – осьовий циліндр; к – колагенові волокна. Термін спостереження 14 доба (а, б), 30 доба (в, г), 60 доба (д, е). Електронорама: а – зб. 4600; б – зб. 2800; в – зб. 7500; г – зб. 7200; д – зб. 8300; е – зб. 4400.

У дистальному сегменті нерва відмічено часткове збереження тонких стромальних елементів нерва, так званого ендоневрію (ендоневральних трубок). Збереження цих структур підвищує ймовірність успішної направленої регенерації нервових волокон у дистальному сегменті.

У групі ПЕГ виявлено елімінацію овоїдів дегенерації, прогресуюче збільшення щільності нервових волокон, як мієлінових, так і безмієлінових (рис. 4.28). Поодинокі продукти дегенерації (детрит, овоїди) відмічали і у кінцевий термін спостереження, але їх кількість була значно меншою, ніж на 14 і 30 добу. На 30 і 60 добу спостерігали значно більшу щільність безмієлінових волокон щодо 14 доби (від 8 до 12 осьових циліндрів у волокні). У порівнянні з групою ЕШ не відмічено значної різниці особливостей регенерації і ультраструктури даного типу волокон. Одночасно з цим відносна щільність мієлінових нервових волокон і товщина мієлінової оболонки достовірно була більшою (див. результати морфометрії, табл. А.4 дод А). Ламелі мієліну щільно структуровані і контактують з аксолемою осьових циліндрів. Ознак ультраструктурних порушень мієліну в регенерованих волокнах не виявлено. Одержані результати електронної мікроскопії засвідчили активну регенерацію безмієлінових та ремієлінізацію поодиноких мієлінових нервових волокон.

У групі ФК в якості альтернативи епіневральним швам встановлено активну регенерацію нервових волокон зі збереженням ендоневральних структур у фасцикулах дистального сегмента нерва. Це особливо чітко відмічено на 60 добу спостереження (рис. 4.29). В ендоневральних “трубках” виявлено регенеровані групи мієлінових та безмієлінових нервових волокон.

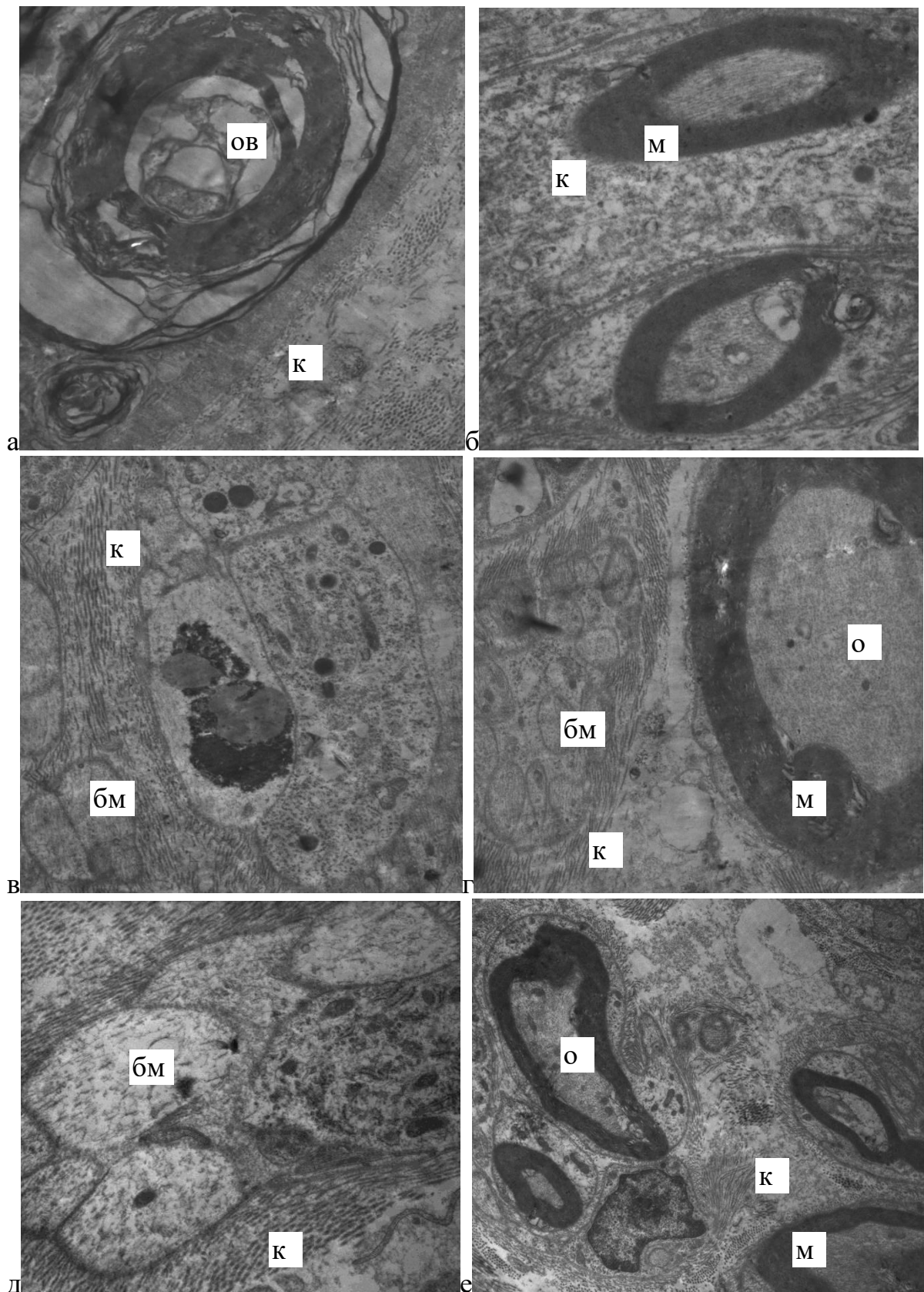


Рис. 4.28. Дистальний сегмент сідничого нерва після повного перетину та мікрохірургічного відновлення із застосуванням поліетиленгліколю гідрогелю. Примітка: ов – овоїди; м – мієлінова оболонка; бм – безмієлінові волокна; о – осьовий циліндр; к – колагенові волокна. Термін спостереження 14 доба (а, б), 30 доба (в, г), 60 доба (д,е). Електронोगрама: а – зб. 7400; б – зб. 8100; в – зб. 5400; г – зб. 5600; д – зб. 7800; е – зб. 4000.

На 14 добу виявлено значну кількість овоїдів дегенерації і поодинокі регенеруючі осьові циліндри. На 30 добу вже реєстрували групи мієлінових та безмієлінових волокон, активну ремієлінізацію, значну щільність вільних нейролемоцитів, регенеровані мікросудини (гемокапіляри, венули). На 60 добу щільність нервових волокон суттєво збільшилась, вони локалізовані у межах тонких прошарків сполучної тканини, яка формує ендоневрій.

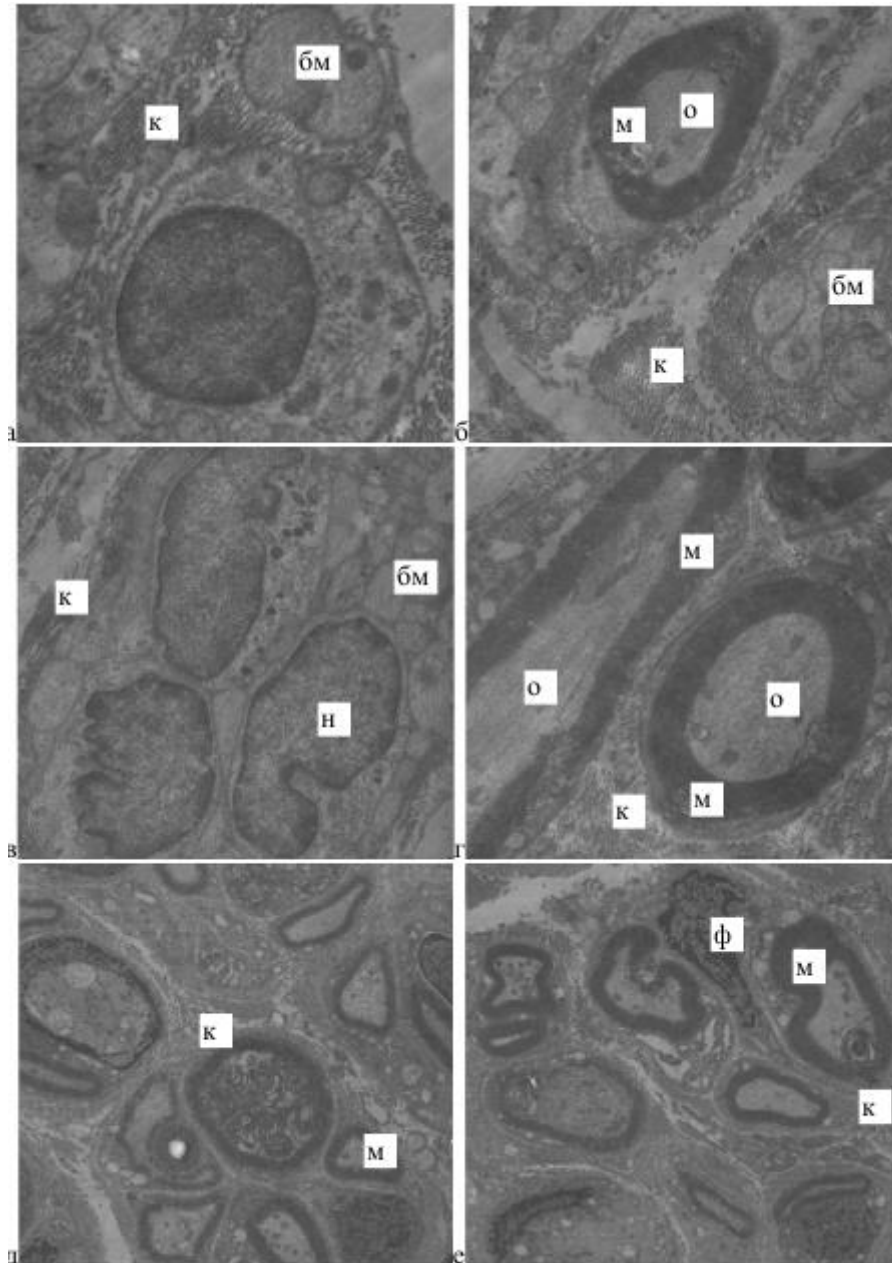


Рис. 4.29. Дистальний сегмент сідничого нерва після повного перетину та мікрохірургічного відновлення із застосуванням фібринового клею. Примітка: ов – овоїди; м – мієлінова оболонка; бм – безмієлінові волокна; о – осьовий циліндр; к – колагенові волокна; н – нейролемоцит; ф – фібробласт. Термін спостереження 14 доба (а, б), 30 доба (в, г), 60 доба (д, е). Електронограма: а – зб. 11200; б – зб. 7900; в – зб. 5500; г – зб. 9100; д – зб. 5600; е – зб. 4100.

У цілому, в дистальному сегменті сідничого нерва відмічено часткове збереження зазначених структурних утворень (ендонеуральних “трубок”) за трьох способів мікрохірургічного відновлення нерва. За результатами електронної мікроскопії не виявлено значної різниці у регенерації нервових волокон в цих групах порівняння, хоча після застосування поліетиленгліколю гідрогелю збільшувалась регенерація мієлінових волокон більшого діаметра, а після застосування фібринового клею краще зберігались та/або відновлювались елементи ендонеурію у фасцикулах дистального нерва. Отримані дані вказують на пришвидшення регенерації при застосованих комбінованих техніках мікрохірургічного відновлення травмованого периферичного нерва.

4.2. Результати кореляційного аналізу залежності параметрів електронейроміографії та ефективності регенерації у дистальному сегменті сідничого нерва

З метою встановлення залежності між регенерацією нервових волокон у травмованому сідничому нерві та електрофізіологічними показниками було проведено кореляційний аналіз за критерієм Спірмана. У групі ЕШ достовірне збільшення амплітуди М-відповіді литкового м'яза реєстрували на 60 добу відносно 14 і 30 доби. ШПЗ в усі терміни дослідження були меншими від контрольних і був довший латентний період М-відповіді. ШПЗ характеризувалась високим кореляційним зв'язком з регенерацією мієлінових нервових волокон ($r_s=0,90$; $p=0,04$ і $r_s=-1,00$; $p<0,01$) (табл. 4.1). На 60 добу встановлено сильну негативну кореляцію між регенерацією нерва і показником латентного періоду М-відповіді, тобто з позитивною динамікою регенерації зменшувався час від стимуляції до реалізації М-відповіді.

У групі ПЕГ амплітуда М-відповіді достовірно збільшилась на 60 добу. ШПЗ у термін 14-30 доби досягала контрольних значень, а на 60 добу зменшилась. При аналізі кореляції середніх значень кількості мієлінових нервових волокон з параметрами ЕНМГ встановлено сильну кореляцію на 30 добу вілсно амплітуди М-відповіді ($r_s=0,90$; $p=0,04$) і ШПЗ на 14 добу ($r_s=0,90$; $p=0,04$). В інші терміни критерій Спірмена був меншим достовірних значень.

У групі ФК реєстрували достовірне збільшення амплітуди М-відповіді щодо 14 доби, ШПЗ у термін 14-30 доби відновилаь до вихідних значень, а на 60 добу зменшувалась на тлі збільшення латентного періоду проведення збудження. Згідно з результатами кореляційного аналізу встановлено істотну кореляцію між рівнем регенерації нерва і амплітудою М-відповіді ($r_s=0,90$; $p=0,04$), ШПЗ ($r_s=0,90$; $p=0,04$) на 30 добу; на інших термінах r_s критерій Спірмена був меншим достовірних значень.

Динаміка відновлення характеризувалась покращенням локомоторної функції кінцівки щурів, що зареєстровано завдяки показникам SFI (див. розділ 3). У дослідженні не виявлено статистично значущої різниці між трьома групами порівняння у динаміці функціонального відновлення (змін показника SFI), хоча виявлено незначну затримку на тлі застосування фібринового клею. Аналіз кореляції за критерієм Спірмена між середніми значеннями кількості мієлінових нервових волокон у дистальному сегменті нерва і SFI виявив сильний зв'язок у групі ЕШ на 14-30 добу, у групі ПЕГ – на 14 і 60 добу, у групі ФК – на 30 добу. На інших термінах результати кореляційного аналізу були меншими достовірних значень.

Таблиця 4.1

Результати кореляційного аналізу між кількістю мієлінових нервових волокон у дистальному сегменті нерва і параметрами ЕНМГ та функціональним індексом сідничого нерва щурів при з'єднанні кукс нерва різними способами

Показник	Група	Термін	Амплітуда М-відповіді	Швидкість проведення збудження	Латентний період	SFI
Кількість мієлінових нервових волокон у дистальній частині нерва	ЕШ	14 доба	rs=0,50; p=0,39	rs=0,90; p=0,04	rs=-0,20; p=0,75	rs=0,90; p=0,04
		30 доба	rs=0,30; p=0,62	rs=0,90; p=0,04	rs=-0,50; p=0,39	rs=0,90; p=0,04
		60 доба	rs=-0,70; p=0,19	rs=0,90; p=0,04	rs=-1,00; p<0,01	rs=0,70; p=0,19
	ПЕГ	14 доба	rs=0,50; p=0,39	rs=0,90; p=0,04	rs=-0,40; p=0,50	rs=0,90; p=0,04
		30 доба	rs=0,90; p=0,04	rs=0,70; p=0,19	rs=-0,80; p=0,10	rs=0,70; p=0,19
		60 доба	rs=0,30; p=0,62	rs=0,70; p=0,19	rs=-0,30; p=0,62	rs=0,90; p=0,04
	ФК	14 доба	rs=-0,60; p=0,28	rs=0,10; p=0,87	rs=0,82; p=0,09	rs=-0,60; p=0,28
		30 доба	rs=0,90; p=0,04	rs=0,90; p=0,04	rs=-0,70; p=0,19	rs=0,90; p=0,04
		60 доба	rs=0,60; p=0,28	rs=0,60; p=0,28	rs=-0,60; p=0,28	rs=0,60; p=0,28

Висновки до розділу 4

Динаміка регенерації у сідничому нерві після повного перетину характеризувалась збільшенням щільності нервових волокон у ділянці шва нерва і наступним їх проростанням у дистальний сегмент нерва. Встановлено, що найбільш вагомий приріст регенерованих нервових волокон у дистальному кінці нерва відбувається між термінами 30 і 60 доби, що пояснюється майже повною елімінацією овоїдів дегенерації та активним проростанням нервових волокон у частково збереженні ендоневральні “трубки” дистального сегмента сідничого нерва. Морфологічні закономірності відновних процесів у невромі та дистальному сегменті нерва у трьох групах порівняння були подібними. Інкапсуляція поліетиленгліколю гідрогелю і фібрину, їх біодеградація і елімінація не мали негативного впливу на динаміку відновного процесу. Використані мікрохірургічні техніки у рівній мірі дозволяють з’єднати кінці перетнутого периферичного нерва і досягти регенерації нервових волокон у дистальний сегмент нерва, а серед трьох способів застосування поліетиленгліколю гідрогелю сприяло швидшому структурному та функціональному відновленню. За результатами електронної мікроскопії у досліджуваних дистальних сегментах нервів тварин трьох груп порівняння збільшувалась відносна кількість мієлінових нервових волокон з кожним терміном спостереження і щільність регенерації мієлінових волокон домінувала над безмієліновими. За результатами морфометрії та статистичного аналізу, застосування поліетиленгліколю гідрогелю і фібринового клею у поєднанні з епіневральними швами сприяє процесам регенерації в ушкодженому нерві порівняно з стандартним епіневральним швом, і скорочує терміни нервово-м’язового відновлення у групі ПЕГ.

Матеріали розділу висвітлені в наступних публікаціях:

1. Goncharuk O, Savosko S, Petriv T, Tatarchuk M, Medvediev V, Tsymbaliuk V. Epineurial sutures, polyethylene glycol hydrogel and fibrin glue in

the sciatic nerve repair in rats: functional and morphological assessments in experiment. *Georgian Med News*. 2020 Dec;(309):124-31.

2. Goncharuk OO, Savosko SI, Petriv TI, Medvediev VV, Tsymbaliuk VI. Morphometric study of rat sciatic nerve recovery after three nerve repair techniques: epineural suture, polyethylene glycol hydrogel and fibrin sealant. *Int J Morphol*. 2021;39(3):677-82.

3. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Кореляційний аналіз параметрів електронейроміографії, функціонального тесту з рівнем регенерації травмованого сідничого нерва. *Укр. нейрохірург. журн*. 2021;27(2):34-40. doi: 10.25305/unj.227615.

4. Цимбалюк ВІ, Гончарук ОО, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Лузан БМ. Оцінка функціонального відновлення нервово-м'язового апарату у ранні терміни за умов різних видів з'єднань сідничого нерва при його травматичному ушкодженні в експерименті. В: Зб. наук. праць XVIII з'їзду ортопедів-травматологів України; 2019 Жовт 9-11; Івано-Франківськ. Івано-Франківськ; 2019. с. 197

5. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Цимбалюк ВІ. Порівняльний аналіз ефективності мікрохірургічного відновлення сідничого нерва за використання трьох технік: епіневрального шва, гідрогелю поліетиленгліколю та фібринового клею. In: *Abstracts VI Ukrainian Winter Neurosurgical Ski Meeting*; 2021 Берез 1-3; Bukovel, Ukraine; 2021. с. 54.

6. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Показники електронейроміографії литкового м'язу корелюють з рівнем регенерації сідничого нерва за різних способів мікрохірургічного відновлення. *Укр. наук.-мед. молодіж. журн*. 2021;(Спецвип 1, XIII Міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених Спеціальні питання та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору; 2021 Берез 18-19; Київ):30.

7. Goncharuk OO, Savosko SI, Petriv TI, Medvediev VV, Tsymbaliuk VI. Comparative analysis of the use of epineural suture, hydrogel DuraSeal and fibrin

sealant Tisseel in the restoration of damaged sciatic nerve. *Wiad Lek.* 2021;74(3 cz 2, International scientific and practical conference, dedicated to the World health day, 2021 April 02; Kyiv):795. doi: 10.36740/WLek202103242.

8. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук М.М., Цимбалюк ВІ. Аналіз ефективності мікрохірургічного з'єднання кінців нерва епіневральним швом, DuraSeal та Tisseel. В: Тези доп. VII з'їзду нейрохірургів України з міжнар. участю; 2021 Трав 11-18; Сиде, Туреччина. с. 34-5.

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРНИХ ЗМІН У ДЕНЕРВОВАНИХ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗАХ ПІСЛЯ МІКРОХІРУРГІЧНОГО ВІДНОВЛЕННЯ СІДНИЧОГО НЕРВА

5.1. Результати гістологічних та морфометричних досліджень денервованих скелетних м'язів після невротомії сідничого нерва та відновлення

Травма периферичного нерва призводить до втрати іннервації, метаболічних порушень та подальшої гіпотрофії та атрофії м'язових волокон і може мати руйнівні наслідки. Процеси атрофії у тривало денервованих м'язах є поширеною проблемою після ушкодження периферичних нервів кінцівки [28, 30]. На гістологічному рівні спочатку ці зміни полягають у гіпотрофії м'язових волокон і далі вони прогресують до атрофії, а такі ділянки заміщуються сполучною тканиною, тобто на тлі денервації виникають фіброзні процеси у м'язах [172]. Це призводить до того, що відновлення тривало денервованого м'яза стає ускладненим, тривалим і потенційно слабким [173]. Вважається, що своєчасна реіннервація скелетних м'язів дозволяє відновити моторну функцію кінцівки і запобігти можливій значній атрофії м'язів кінцівки. У власних експериментальних дослідженнях було вивчено зміни гістологічної будови скелетних м'язів після ушкодження сідничого нерва і морфометрично оцінено динаміку змін м'язових волокон і щільності колагенових волокон у задній групі м'язів литки щурів. Також було порівняно ці зміни при мікрохірургічному відновленні сідничого нерва епіневральними швами і додатковим застосуванням адгезивних клеїв на основі поліетиленгліколю гідрогелю та фібрину.

Гістологічні дослідження м'язових волокон та ділянок фіброзу в задній групі м'язів литки було досліджено у всі терміни експерименту, як і регенерацію сідничого нерва. Встановлено структурні та морфометричні

зміни м'язових волокон на тлі денервації. В якості контролю для цих досліджень було обрано групу НО (контрольна група) і групу ПО, яким здійснювали доступ до сідничого нерва без перетину. На рис. 5.1 показано інтактні м'язові волокна у м'язах контрольної групи. Головними гістологічними показниками інтактного стану м'язових волокон були їх щільна організація у досліджуваних зразках, наявність поодиноких міоядер в м'язовому волокні, чітко визначена поперечна посмугованість, що вказує на непорушені актин-міозинові комплекси у скоротливих міофібрилах. Між м'язовими волокнами реєстрували тонкі прошарки сполучної тканини (поодинокі фібробласти і пучки колагенових волокон), які формують ендомізій. Реєстрували поодинокі мікросудини, головним чином гемокапіляри, які формують у м'язах мікроциркуляторне русло.

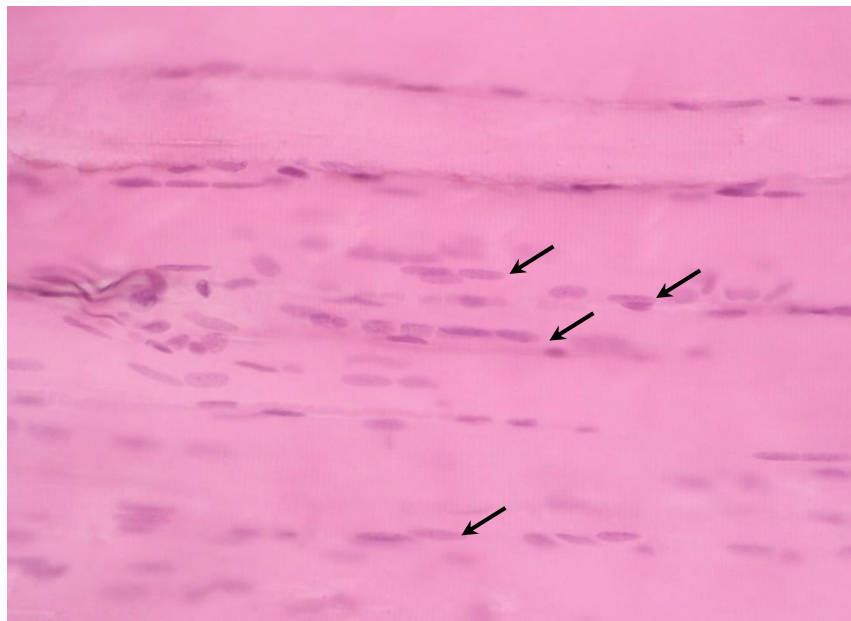


Рис. 5.1. Інтактні м'язові волокна у м'язах литки щурів групи НО. У м'язових волокнах наявні поодинокі міоядра (поздовжна проекція гістологічного зрізу), реєструється поперечна посмугованість. Примітка: ← міоядра. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

У групі ПО встановлено деякі відмінності гістологічної організації м'язів литки від інтактної. По-перше, на 14, 30 і 60 добу у всіх досліджених зразках виявлено м'язові волокна. Їх щільність при мікроскопічному

дослідженні не мала суттєвої різниці від НО групи (рис. 5.2). По-друге, між м'язовими волокнами наявні тонкі прошарки сполучної тканини ендомізії, гемокапіляри, що також вказує на непорушену структуру. По-третє, на 60 добу в задній групі м'язів литки встановлено поодинокі м'язові волокна з деформованим контуром, зменшеною поперечною посмугованістю і меншим діаметром. Ці зміни оцінено як наслідок втручання після моделювання доступу до сідничого нерва і виконання швів на фасції м'язів. Як показано на рис. 5.3, у таких ділянках збільшилась щільність сполучної тканини, активувався колагеногенез з подальшим формуванням рубців, особливо навколо шовного матеріалу. У ділянках шва (зразки м'язів нижньої третини стегна) виявлено тонкі м'язові волокна, оточені різко збільшеною кількістю колагенових волокон і ці зміни оцінено як гіпотрофію. Тому наступні морфометричні вимірювання включали статистичне дослідження міжгрупової різниці з урахуванням групи ПО.

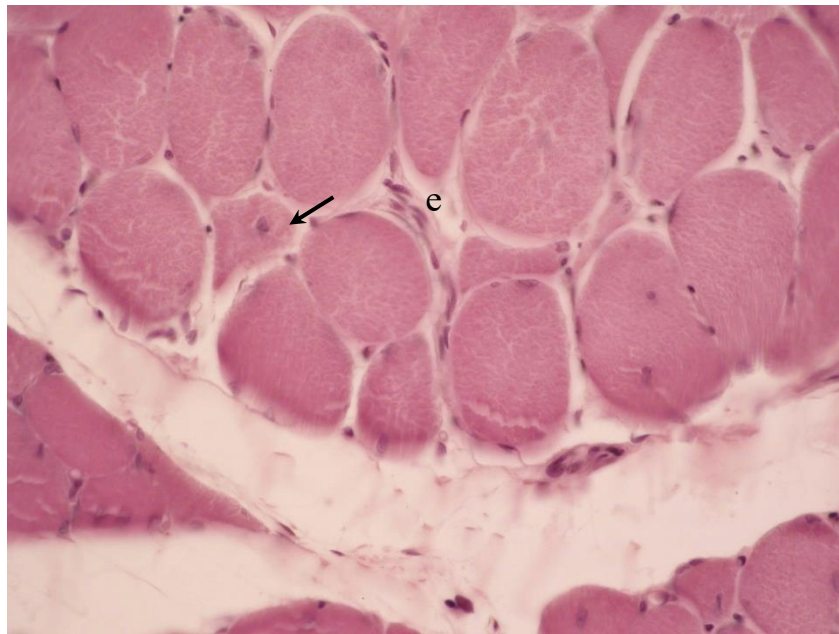


Рис. 5.2. Структурно непорушені м'язові волокна у м'язах литки щурів групи ПО. Тонкі прошарки сполучної тканини (ендомізій) між м'язовими волокнами (поперечна проекція гістологічного зрізу), реєструються поодинокі міоядра. Термін спостереження 60 доба. Примітка: ← міоядра; e – ендомізій. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

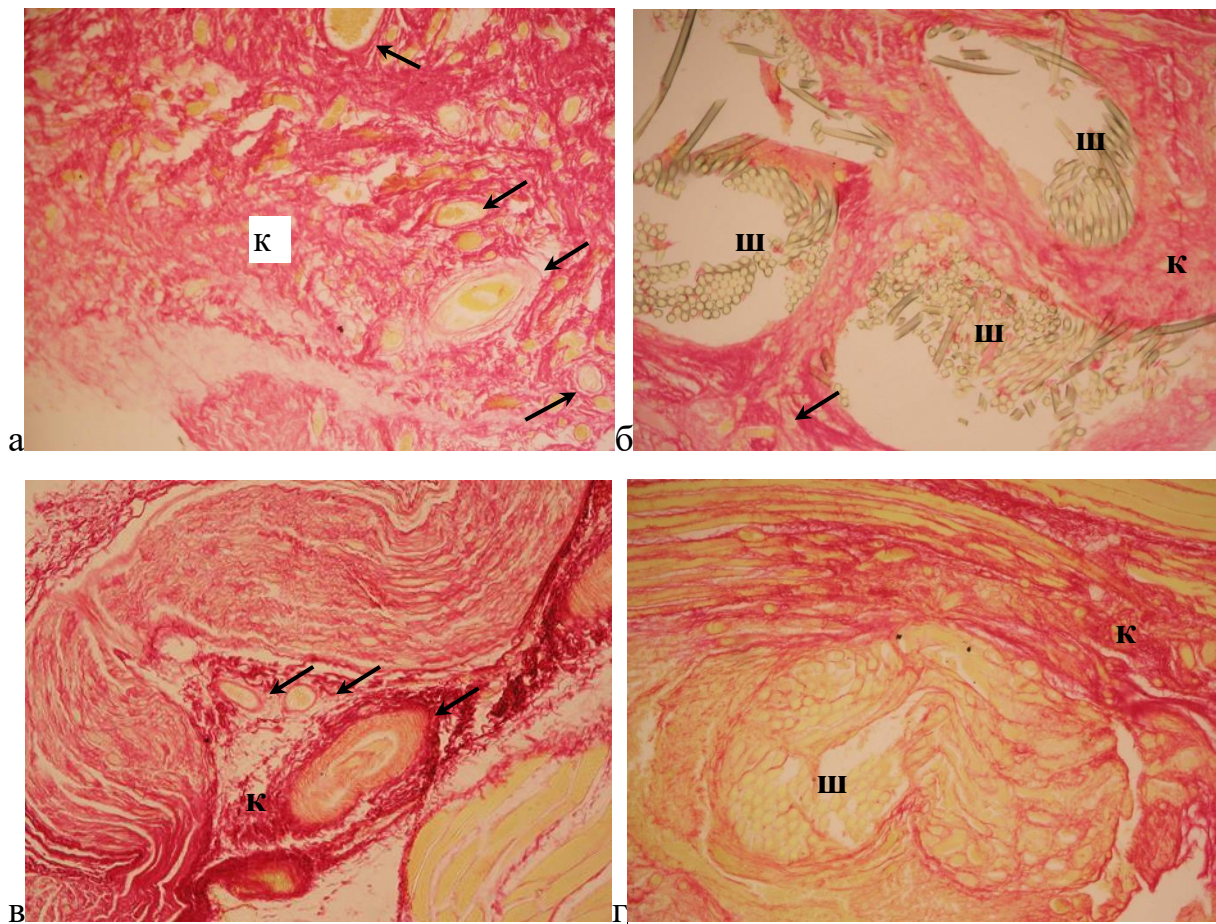


Рис. 5.3. Фіброз у ділянці шва м'язів стегна після моделювання ушкодження сідничого нерва. Примітка: а – група ПО, 30 доба; б – група ПО, 60 доба; в – група ПП, 30 доба; г – група ФК, 30 доба; ← судини; ш – шовний матеріал; к – колаген. Пікросіріус червоний. Об. 10, ок. 10.

За результатами морфометричного вимірювання діаметра м'язових волокон не виявлено статистично значущої різниці між показниками груп НО та ПО, хоча реєстрували незначне зменшення середнього показника (табл. 5.1).

У дослідній групі ПП реєстрували групи м'язових волокон з неправильним контуром, вони характеризувались появою звивистості (при дослідженні у поздовжній проекції гістологічного зрізу), тоді як інтактні м'язові волокна мають майже однаковий діаметр по своїй довжині (рис. 5.4, 5.5).

Діаметр м'язових волокон у м'язах литки щурів після відновлення нерва
(мкм)

Група	Термін спостереження		
	14 доба	30 доба	60 доба
НО	91,2±1,84		
ПО	83,7±2,14	86,3±1,37	88,2±1,61
ПП	72,3±1,54*!	59,44±3,42*!	60,3±1,98*!
ЕШ	63,9±1,43*!	62,6±1,47*!	69,4±5,05*!#
ПЕГ	62,8±2,20*!	60,6±1,93*!	100,4±2,49^***!@
ФК	94,7±3,80!#	72,5±1,92*!***@	75,5±4,37*@***

Примітка. * P<0.05 достовірно до показника групи НО; ! P<0.05 достовірно до значень ПО групи; # P<0.05 достовірно відносно показника групи ПП; ^ P<0.05 достовірно до значень групи ЕШ; @ P<0.05 достовірно відносно показника у термін спостереження 14 днів (у межах кожної групи); ** P<0.05 достовірно до показника у термін спостереження 30 днів (у межах кожної групи); *** P<0.05 достовірно відносно значень групи ПЕГ.

За результатами морфометричного аналізу встановлено достовірне зменшення середнього діаметра м'язових волокон щодо показників у НО та ПО групах. Ці результати вказують на розвиток гіпотрофії у задній групі м'язів литки на тлі денервації. При цьому спостерігалась тенденція до зменшення діаметра м'язових волокон на 30 і 60 добу відносно 14 доби, хоча різниця не досягала статистично значущої різниці.

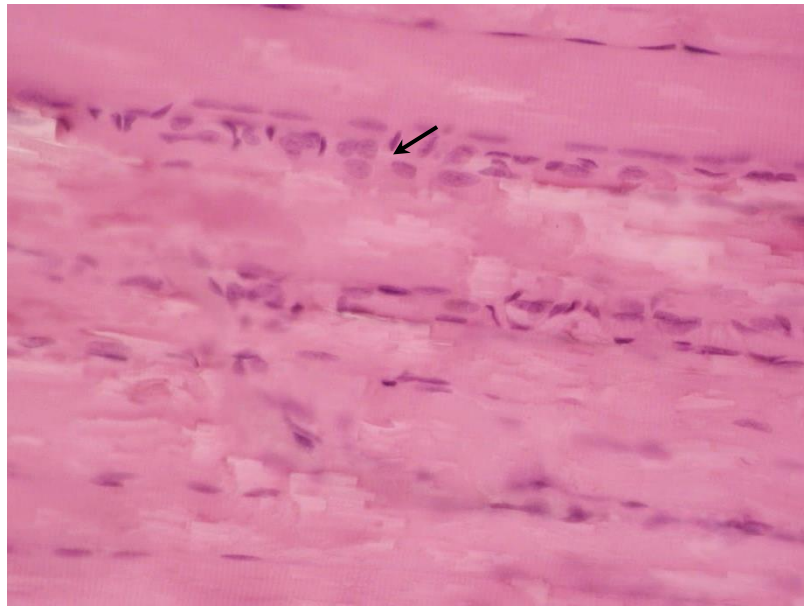


Рис. 5.4. М'язові волокна у м'язах литки щурів з повним перетином сідничого нерва. Збільшення розмірів міоядер. Термін спостереження 30 доба. Примітка: ← міоядра. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

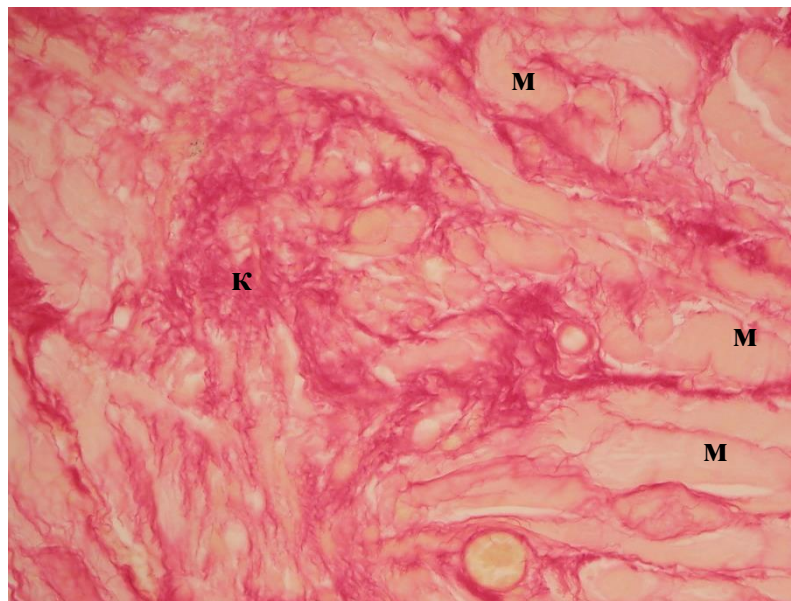


Рис. 5.5. Структурні зміни м'язів литки щурів у групі ІІІ. Атрофія, деформація м'язових волокон, ділянки колагену. Термін спостереження 60 доба. Примітка: м – м'язове волокно; к – колаген. Пікросіріус червоний. Об. 20, ок. 10.

Цікаво відмітити, що навіть через 30 діб після повного перетину сідничого нерва у задній групі м'язів литки реєстрували дистальні нервові

стовбури із збереженою організацією сполучнотканинних елементів нерва. Так, на мікропрепаратах, забарвлених сіріусом червоним, чітко реєстрували колагенові волокна ендоневрію, який формував циліндричні канали (так звані “ендоневральні трубки”) (рис. 5.6). Ці спостереження вказують, що через 30 діб після ушкодження нерва у дистальному сегменті зберігаються колагенові канали, в яких потенційно можливе проростання колб росту до м’язів-мішеней.

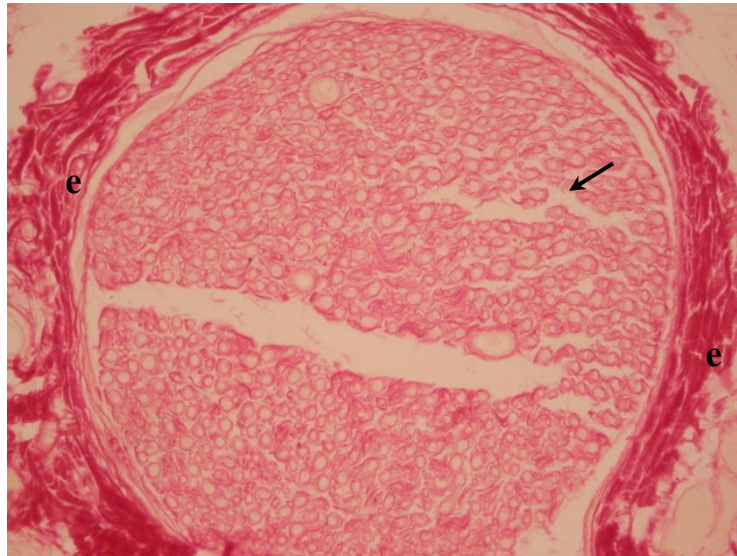


Рис. 5.6. Дистальний нервовий стовбур у денервованому м’язі литки щурів у групі ПП. Загальноморфологічна організація сполучнотканинних елементів збережена, реєструється ендоневрій. Термін спостереження 30 доба. Примітка: ← ендоневрій; е – епіневрій. Пікросіріус червоний. Об. 10, ок. 10.

У групі ЕШ також реєстрували зменшення товщини м’язових волокон. Але, одночасно з цим виявлено волокна зі збільшеною кількістю міоядер у цитоплазмі (рис. 5.7). Такі волокна мали більший діаметр, що вважається проявом активації регенеративних або компенсаторних реакцій. За результатами морфометрії не виявлено різниці діаметра м’язових волокон між термінами експерименту, статистично значуща різниця щодо НО та ПО груп вказує на відносно швидкий розвиток гіпотрофії навіть за умов мікрохірургічного відновлення ушкодженого нерва (табл. 5.1).

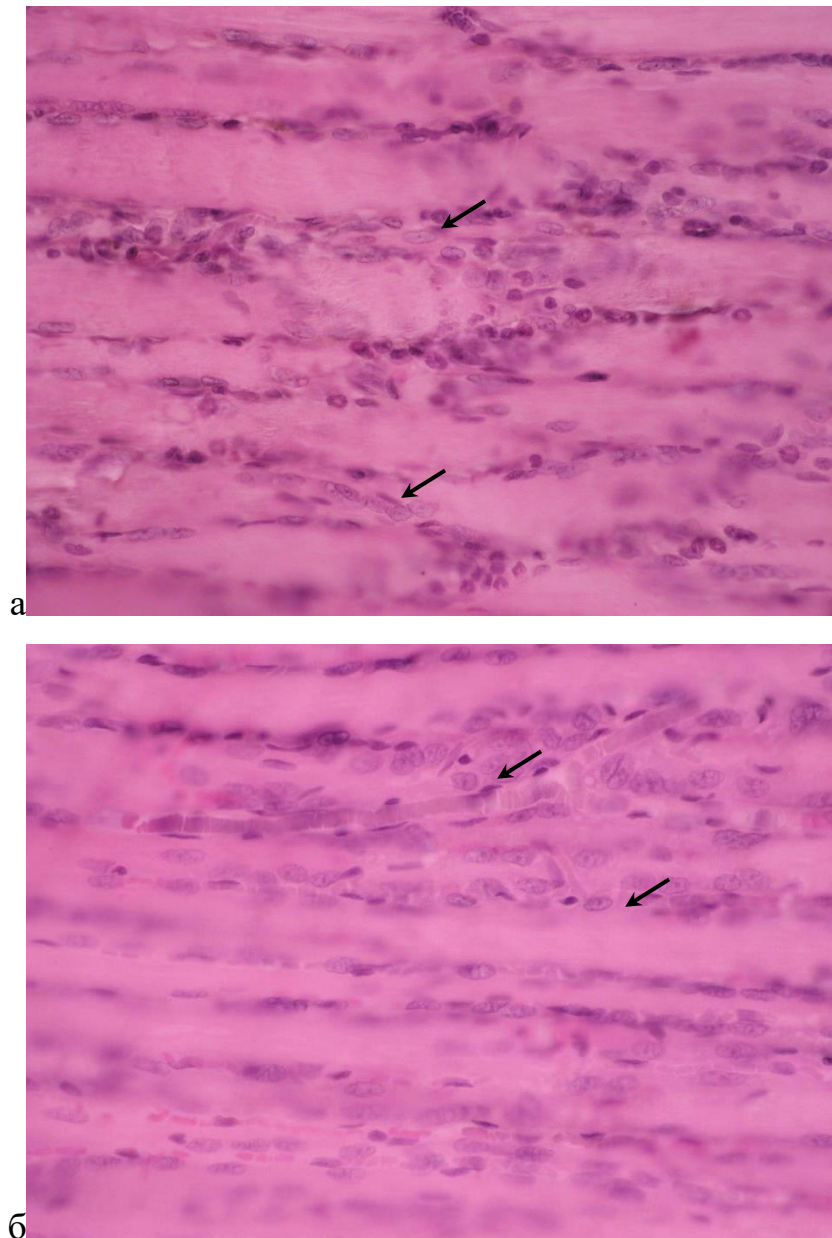


Рис. 5.7. Скелетні м'язи литки щурів після мікрохірургічного відновлення нерва епіневральними швами. Збільшення кількості міомер у м'язових волокнах. Реєструються нейтрофіли на 14 добу після ушкодження. Термін спостереження 14 (а) і 30 (б) добу. Примітка: ← міомер. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

У групі ПЕГ гістологічні зміни у задній групі м'язів литки були подібними до групи ЕШ. Також виявлено м'язові волокна з додатковими міомерами у цитоплазмі на 30 добу, а на 60 добу виявлено волокна більшого діаметра (рис. 5.8). Такі волокна характеризувались середнім діаметром

понад 100 мкм (від 100 до 160 мкм), їх цитоплазма була рівномірно оксифільна. Поява м'язових волокон більшого діаметра (порівняно з терміном 14 і 30 доби) оцінено як ранній прояв гіпертрофії у скелетних м'язах після мікрохірургічного відновлення нерва з використанням поліетиленгліколю гідрогелю.



Рис. 5.8. Структурні зміни м'язів литки щурів після повного перетину сідничого нерва та мікрохірургічного відновлення із застосуванням поліетиленгліколю гідрогелю. Гіпертрофія окремих м'язових волокон. Термін спостереження 60 доба. Примітка: м – м'язове волокно з ознаками гіпертрофії. Гематоксилін-еозин. Об. 20, ок. 10.

У групі ФК гіпотрофію м'язових волокон виявлено головним чином у терміни з 30 до 60 доби (на 60 добу достовірну різницю встановлено тільки щодо групи ПЕГ). У всі терміни спостереження реєстрували одночасно два морфологічних прояви змін у м'язах. Першим проявом була гіпотрофія м'язових волокон, яка полягала у зменшенні діаметра волокон, деформації їх контуру, а другим – поява додаткових міоядер у цитоплазмі, збільшення щільності міоядер у м'язових волокнах, що поєднувалось із збільшенням їх діаметра (рис. 5.9). Тобто, у денервованих м'язах після мікрохірургічного відновлення сідничого нерва фібриновим клеєм одночасно розвивались

процеси гіпотрофії і ранні ознаки компенсаторної регенерації або гіпертрофії.

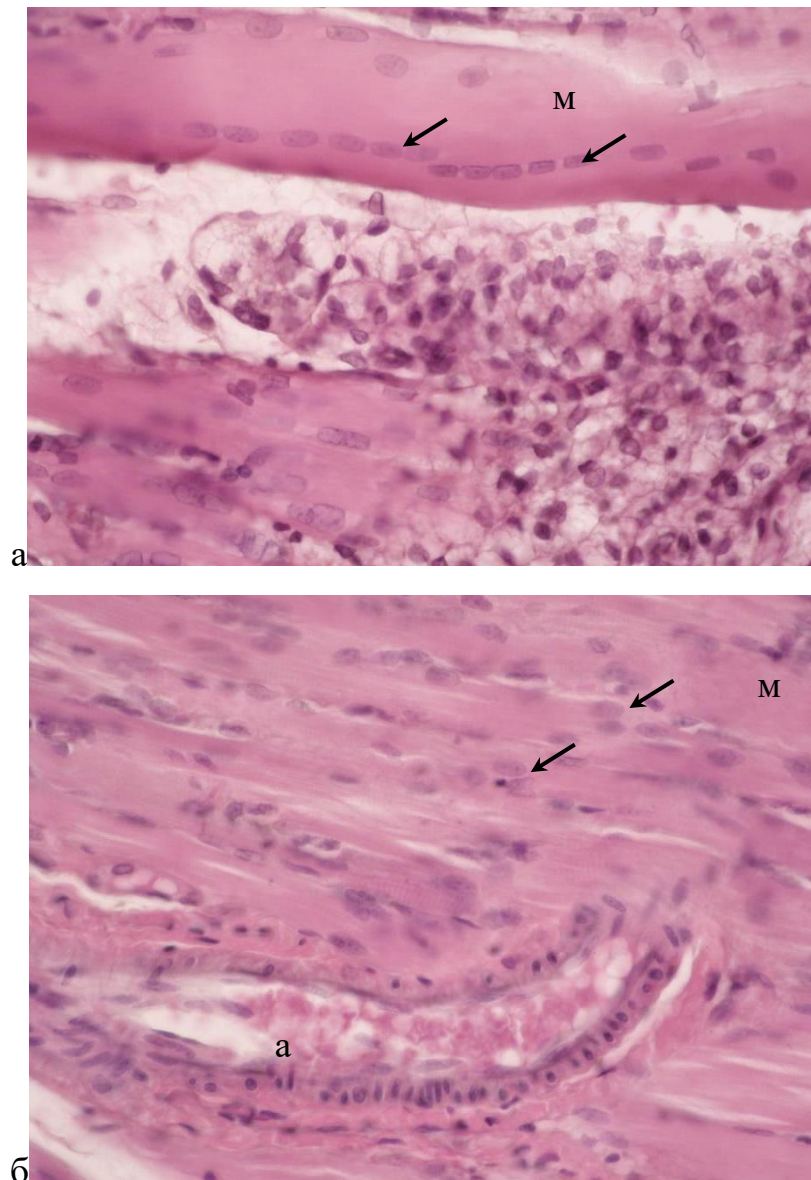


Рис. 5.9. Зміни м'язових волокон у м'язах литки щурів після повного перетину сідничого нерва та мікрохірургічного відновлення із застосуванням фібринового клею. Збільшення кількості міоядер у м'язовому волокні. Термін спостереження 14 (а) і 60 (б) доби. Примітка: а – артеріола; м – м'язове волокно; ← міоядра. Гематоксилін-еозин. Об. 40, ок. 10.

Отже, у всіх трьох групах з мікрохірургічно відновленим сідничим нервом у м'язових волокнах реєстрували збільшення розмірів і щільності міоядер у термін 14-30 доби, на 60 добу такі зміни мали тенденцію до

зростання, особливо у тих одиницях, де гістологічно виявлено найбільш виражені структурні зміни, зокрема втрата посмугованості, просвітлення цитоплазми. Ці зміни оцінювали як реакцію на регенерацію після денервації, хоча одночасно це є і ознакою гіпотрофії. Разом з цим, після застосування поліетиленгліколю гідрогелю на 60 добу збільшилась кількість гіпертрофованих волокон ($>100 \mu\text{m}$). Як порівняння, у групі ФК морфометрично виявлено гіпотрофовані та гіпертрофовані м'язові волокна. Зміни розподілу м'язових волокон за діаметром наведено на рис. А.3 дод. А. На основі проведених гістологічних досліджень дійшли висновку, що денеровані скелетні м'язи перебувають у динамічній перебудові, в них розвиваються процеси гіпотрофії та ремоделювання позаклітинного матриксу з одночасною активацією регенерації і гіпертрофією окремих м'язових одиниць. Травматичне ушкодження скелетних м'язів при відтворенні доступу до ушкодженого периферичного нерва позначається на змінах сполучної тканини і стані м'язових волокон. Відбувається гіпотрофія м'язових волокон, що реєструється на мікроскопічному рівні у виді значного зменшення товщини волокон, їх деформації, а в ушкоджених тканинах розвиваються рубцеві зміни. Сполучна тканина у цих ділянках потовщується, зростає щільність колагенових волокон, регенерують кровоносні мікросудини. Збільшення щільності сполучної тканини, очевидно, не обмежується тільки зоною травмування і може прогресувати на первинно неушкоджені ділянки м'язів.

5.2. Дослідження фіброзних змін у денерованих м'язах кінцівки щурів після травматичного ушкодження сідничого нерва та мікрохірургічного відновлення

На гістологічних зрізах, забарвлених сіріусом червоним, виявлено різницю щільності регіонів, які містять колагенові волокна (рис. 5.10, табл. 5.2).

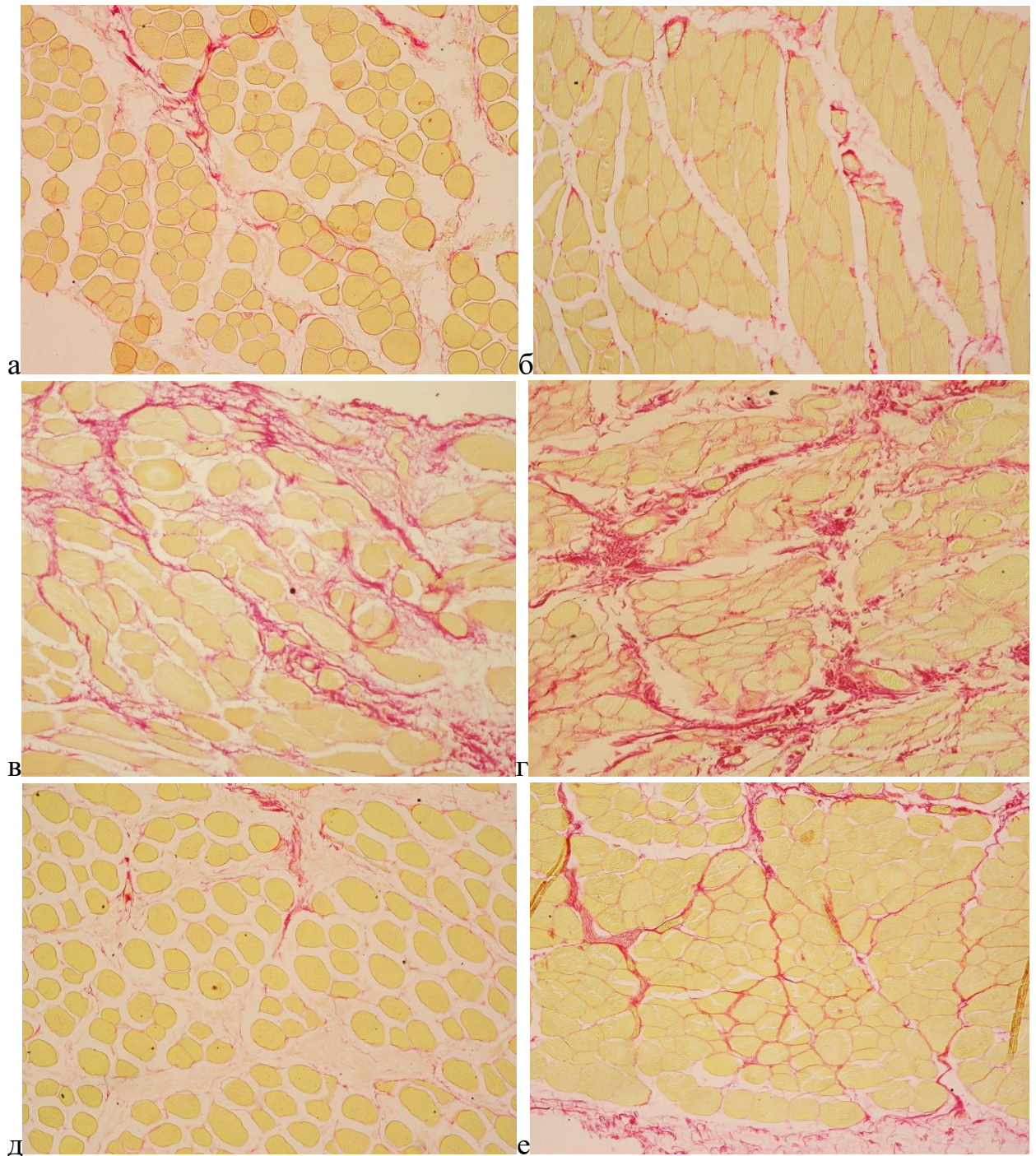


Рис. 5.10. Фіброз у денерованих м'язах литки після ушкодження та відновлення сідничого нерва. Примітка: а – НО; б – ПО; в – ПП; г – ЕШ; д – ПЕГ; е – ФК. Термін спостереження 60 доба. Пікросіріус червоний. Об. 10, ок. 10.

Результати денситометричної оцінки щільності колагенових волокон у м'язах литки щурів після мікрохірургічного відновлення нерва (%)

Група	Термін спостереження		
	14 доба	30 доба	60 доба
НО	3,70±0,39		
ПО	6,55±0,83	4,16±0,77	5,10±1,72
ПП	8,63±0,79*	9,59±1,60*!	11,03±2,05*!
ЕШ	12,88±0,58*!	12,74±1,01*!	11,19±0,71*
ПЕГ	4,89±0,51^	4,85±1,16^	7,64±0,75
ФК	8,40±0,99*^	6,60±1,12^	9,07±1,72*

Примітка. * P<0.05 достовірно до показника групи НО; ! P≤0.05 достовірно відносно значень групи ПО; ^ P<0.05 достовірно до показника групи ЕШ.

Встановлено спільну рису реакції сполучної тканини у всіх дослідних групах, яким здійснювали доступ до сідничого нерва. Щільність колагенових волокон збільшувалась від ділянки доступу у міофібрили первинно неушкоджених м'язів. Ці зміни відбувались головним чином по перимізії та вздовж судин, а щільність колагенових волокон між окремими м'язовими волокнами зростала при значній їх гіпотрофії. У групі ЕШ у всі терміни спостереження щільність колагенових волокон була достовірно більшою, ніж у групах НО і ПО, в середньому 10-14 %. Одержані дані не мали статистично значущої різниці щодо групи ПП. Після повного перетину збільшену щільність колагенових волокон реєстрували у всі три терміни спостереження, а значимої різниці між термінами не виявлено. При цьому різниця показника була достовірною щодо групи ПО на 30 і 60 добу. Це вказує на те, що саме після 30 доби реакції сполучної тканини у денервованих м'язах пов'язані у більшій мірі з наслідками ушкодження периферичного нерва, тоді як у ранній

термін спостереження зміни є наслідком безпосереднього втручання у м'язи кінцівки.

У групі ФК на 14 і 60 добу показник був більшим від контролю, а щодо значень у групі ПО не відрізнявся. У групі ПЕГ і ФК щільність регіонів з колагеном була меншою, ніж у групі ЕШ на 14 і 30 добу. На 60 добу в усіх трьох групах порівняння, яким моделювали ушкодження сідничого нерва і наступне мікрохірургічне відновлення, показник не відрізнявся. Тобто, тривала денервація викликала гіпотрофію з розвитком фіброзу і, незалежно від техніки відновлення ушкодженого нерва, щільність регіонів фіброзу зростала, хоча у групі ПЕГ мала місце тенденція до затримки цих змін у динаміці експериментів.

Таким чином, гіпотрофія задньої групи м'язів литки у щурів після повного перетину сідничого нерва виникає відносно швидко і поєднується із збільшенням кількості сполучної тканини після з'єднання кінців нерва епіневральними швами. Використання поліетиленгліколю гідрогелю та фібринового клею затримувало розвиток фіброзу на етапі реіннервації, а при застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю відбувалась гіпертрофія окремих м'язових волокон на 60 добу, що можна оцінювати як прояв активації ендогенних регенеративних процесів.

5.3. Дослідження колагенолітичної активності матричних металопротеїназ у денервованих скелетних м'язах

Матричні металопротеїнази (ММП) є ключовими регуляторними молекулами у формуванні, ремоделюванні та деградації компонентів позаклітинного матриксу (ПКМ) в інтактних та ушкоджених тканинах. У скелетних м'язах ММП відіграють важливу роль у гомеостазі та підтримці функціональної цілісності міофібрил, ремоделюючи ПКМ та регулюючи міграцію, диференціювання та регенерацію міобластів [31, 107].

У дослідженні висунуто припущення, що ефективність реіннервації скелетних м'язів після травматичного ушкодження нерва позначиться на процесах гіпотрофії м'язових волокон та змінах ПКМ, у яких залучені ММП. Використовуючи метод зимограми, було визначено наявність і рівень колагенолітичної активності ММП у задній групі м'язів гомілки щура після повного перетину сідничого нерва та мікрохірургічного відновлення різними способами. В результаті проведених експериментальних досліджень виявлено колагенолітичну активність подібну до дії ММП-9 (проактивна та активна форми ММП) у групах ПП, ЕШ та ФК (рис. 5.11), тоді як у групі ПЕГ – не виявлено.

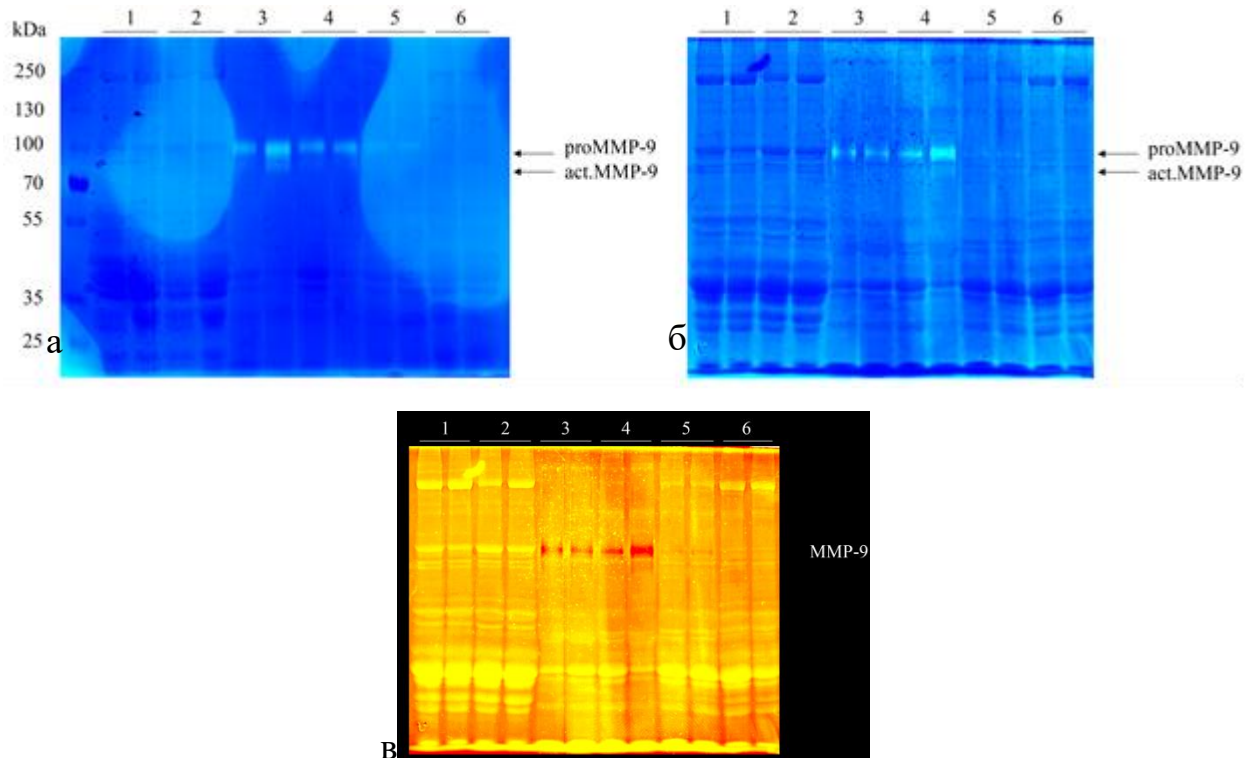


Рис. 5.11. Репрезентативна зимограма м'язових тканин через 2 місяці після операції. Примітка: 1 – НО; 2 – ПО; 3 – ПП; 4 – ЕШ; 5 – ФК; 6 – ПЕГ; а і б – гелі зимограми; в – гель зимограми у інвертованому виді.

Після використання фібринового клею активність проММП-9 була достовірно зниженою у порівнянні з групою ПП, значення 4,4 [2,4–7,8] у.о. проти 26,0 [2,4–7,8] у.о. ($P < 0,05$). Достовірне зниження активності проММП-9 спостерігали також після застосування фібринового клею у порівнянні з

групою ЕШ, значення 4,4 [2,4–7,8] у.о. проти 32,7 [26,5–36,8] у.о. ($P<0,05$). В той же час, при використанні поліетиленгліколю гідрогелю достовірно зниженою була активність як проММП-9, так і активної форми актММП-9 у порівнянні з групами ПП та ЕШ ($P<0,05$).

Більше того, як можна бачити на рис. 5.12, протеїновий профіль у щурів групи ПЕГ досить наблизений до контрольних показників, на відміну від інших груп порівняння (з ушкодженим сідничим нервом). Дані результати вказують на те, що ММП-9 задіяна у розвиток процесів гіпотрофії м'язових волокон. При цьому колагенолітичної активності ММП-2, яка також залучена до ремоделювання колагену в стромальних елементах органів, не виявлено, що може вказувати на деяку специфічність реакцій ММП у денервованих скелетних м'язах. Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників [176].

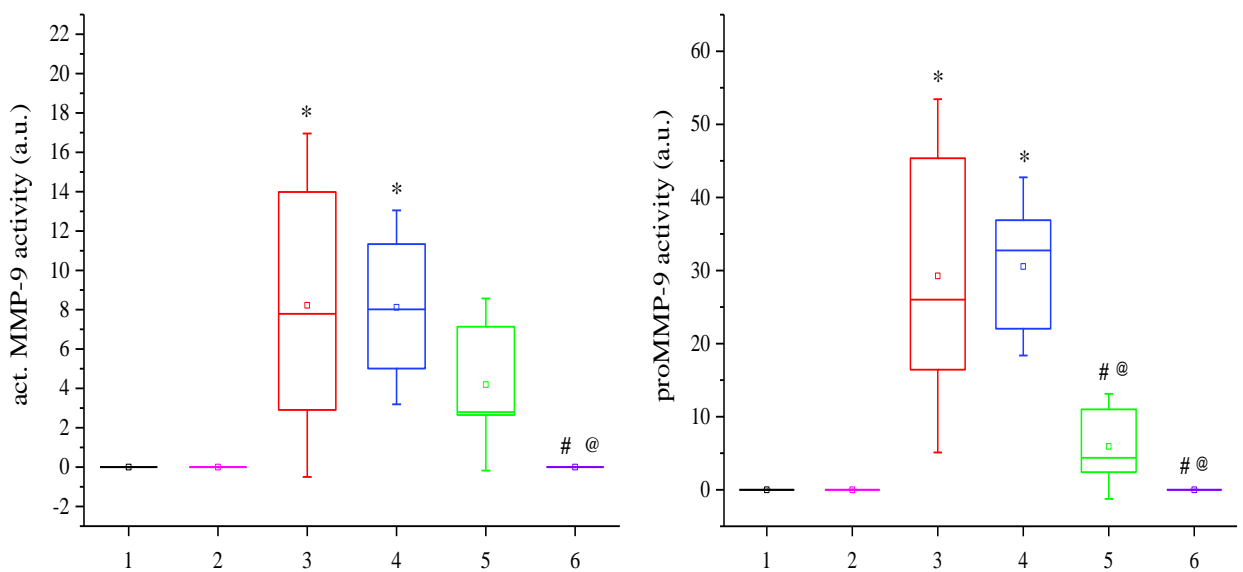


Рис. 5.12. Денситометричний аналіз зимограм, одержаних зі зразків скелетних м'язів через 2 місяці після операції. Примітка: 1 – НО; 2 – ПО; 3 – ПП; 4 – ЕШ; 5 – ФК; 6 – ПЕГ. * $P<0,05$ порівняно зі значеннями групи НО; # $P<0,05$ порівняно з показниками групи ПП; @ $P<0,05$ порівняно зі значеннями групи ЕШ.

За результатами кореляційного аналізу між рівнем ММП (проактивна і активна форми) і відотною кількістю колагену в скелетних м'язах виявлено позитивну залежність у дослідних групах. Так, у групі ПП встановлено пряму позитивну кореляцію між рівнем колагеногенезу та рівнем активної ММП ($r_s=0,99$; $P<0,01$), у групі ЕШ аналогічну залежність з рівнем активної ММП ($r_s=0,90$; $P=0,04$), а у групі ФК додатково щодо рівня проактивної форми ММП ($r_s=0,82$; $P<0,01$ та $r_s=0,67$; $P=0,03$). Результати значень коефіцієнта кореляції Спірмена наведено у табл. 5.3, а графіки лінійних позитивних залежностей – на рис. 5.13.

Таблиця 5.3

Результати досліджень кореляційних зв'язків між активністю ММП-9 та відотною щільністю колагенових волокон у денервованих м'язах (за коефіцієнтом рангової кореляції Спірмена, r_s)

Група		Рівень проММП-9	Рівень актММП-9
% колагену	ПП	$r_s=0,41$ $p=0,42$	$r_s=0,99$ $p<0,01$
	ЕШ	$r_s=0,60$ $p=0,28$	$r_s=0,90$ $p=0,04$
	ФК	$r_s=0,82$ $p<0,01$	$r_s=0,67$ $p=0,03$

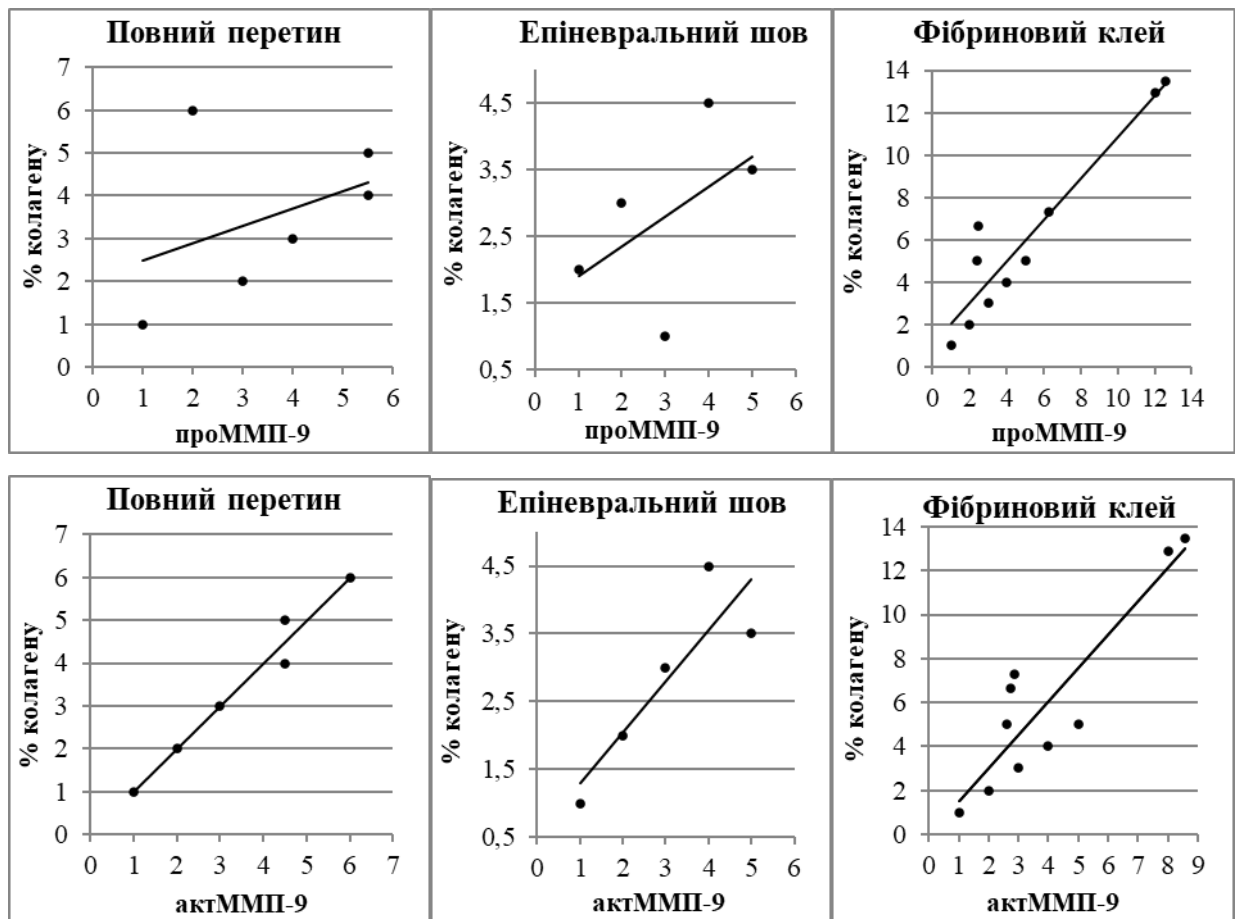


Рис. 5.13. Графіки кореляції Спірмена між рівнем колагену і активністю ММП-9 у скелетних м'язах дослідних груп, в яких виявлено активність ферменту.

Висновки до розділу 5

Мікрохірургічне відновлення ушкодженого нерва не завжди завершується вдалою реіннервацією м'язів і прогресуюча атрофія прискорюється фіброзними процесами. Фіброзні зміни полягають у збільшенні кількості волокнистої сполучної тканини, яка у здоровому м'язі зосереджена у більшій мірі у епімізії та перимізії. Як виявлено у наших дослідженнях, у денервованому м'язі збільшується щільність екстрацелюлярного матриксу, який представлений колагеновими волокнами і може бути кількісно оцінений при гістологічних дослідженнях. На сьогодні існує кілька рутинних методик, які надають можливість відрізнити колагенові волокна від м'язових волокон, такі як забарвлення за Массоном,

Ваг-Гізоном та червоним сіріусом, при цьому останній є найбільш специфічним щодо колагену [174] і його кількість можна виміряти у програмному забезпеченні [29]. Як показали результати власних досліджень, післятравматичний фіброз у денервованих м'язах литки розвинувся швидко і на 14 добу кількість колагенових волокон вже достовірно збільшилась і до кінця експерименту вже не змінювалась, тоді як при відновленні нерва з використанням поліетиленгліколю гідрогелю та фібринового клею динаміка фіброзу була затриманою, тільки на 60 добу показник досяг значень у групі ЕШ.

Результати молекулярно-біологічних досліджень по виявленню активності ММП-9 показали зв'язок активності ферменту з фактом денервації скелетних м'язів. З літературних даних відомо, що різні підгрупи ММП локалізуються в певних зонах ран, їх активація припадає на різні періоди процесу загоєння, а ізоформний спектр та кількісний вміст залежать від клітинного наповнення рани. З огляду на ключову роль, яку відіграють ММП у ремоделюванні ПКМ у локусі ушкодження, активність цих ензимів є молекулярним критерієм ефективності загоєння і фіброзу [187]. У власних дослідженнях виявлено, що активність ММП пов'язана з прогресуючим колагеногенезом в ушкодженому і денервованому м'язі, що пояснюється атрофією м'язових волокон і наступним фіброзом цих ділянок (не виключається прогресування фіброзних процесів у стромальних елементах м'язів від місця ушкодження). Колагеногенез у денервованих м'язах супроводжується збільшеною активністю ММП-9 як при повному перетині нерва без нейрорафії, так і після накладання епіневральних швів. В результаті проведених досліджень встановлено, що використання фібринового клею та поліетиленгліколю гідрогелю позначилось у меншому колагеногенезі, запобігало фіброзу у денервованих м'язах, при цьому через 8 тижнів після ушкодження і нанесення поліетиленгліколю гідрогелю металопротеїназної активності практично не виявлено. При цьому активність ММП-9 і фіброз після використання поліетиленгліколю гідрогелю були вірогідно меншими у

порівнянні із застосуванням епіневральних швів і фібринового клею. На основі отриманих даних зроблено висновок, що застосування біотехнологічних герметиків – поліетиленгліколю гідрогелю і фібринового клею – у коаптації кінців травмованих периферичних нервів дозволяє зменшити ушкодження параневрального оточення і тим самим зменшити (запобігти) прогресуючому розвитку сполучної тканини навколо неврони і у денервованих (ушкоджених) м'язах. Зрозуміло, що хірургічний доступ до нерва викликає реактивні зміни сполучної тканини і збільшення вмісту колагену в ПКМ, але при застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю і фібринового клею зменшилась роль механічного фактора у мікрохірургічному відновленні нерва, що позначилось у меншому ММП-опосередкованому ремоделюванні ПКМ.

При порівнянні трьох мікрохірургічних технік можна розглядати поліетиленгліколь гідрогель як потенційно найбільш ефективний спосіб відновлення нерва. На це вказують результати морфометрії м'язових волокон. На 60 добу збільшилась кількість м'язових волокон більшого діаметра, серед яких були гіпертрофовані волокна і волокна зі збільшеним числом міомер. У групі ФК також реєстрували збільшення кількості міомер у м'язових волокнах вже на 14 добу і у наступні терміни, що є морфологічною ознакою регенерації. Тому можна стверджувати не тільки про позитивну дію поліетиленгліколю гідрогелю та фібринового клею щодо регенерації ушкодженого нерва, а також затримки розвитку атрофії денервованих скелетних м'язів у період їх реіннервації.

Матеріали розділу висвітлені в наступних публікаціях:

1. Goncharuk O, Savosko S, Medvediev V, Tsymbaliuk V. Quantitative histological assessment of skeletal muscle hypotrophy after sciatic nerve neurotomy and repair in rat model. Georgian Med News. 2021 Apr;(313):169-72.

2. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Дослідження гіпотрофії скелетних м'язів при травмі сідничного нерва та різних способах його з'єднання. Укр. наук.-мед.

молодіж. журн. 2021; Спецвип 1, XII Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «спеціальні питання та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору; 2020 Берез 26-27):6-7.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Травматичне ушкодження периферичних нервів залишається актуальною клінічною та медико-соціальною проблемою, оскільки результат мікрохірургічного відновлення нерва часто залишається незадовільним, а наслідки ушкодження нерва мають сенсорні і моторні порушення [54]. Регенерація ушкодженого нерва є стадійним процесом і залежить від ряду факторів: рівня і об'єму ушкодження, часу від ушкодження до мікрохірургічного відновлення, способу мікрохірургічного втручання, реваскуляризації [188]. Ефективність регенерації і функціонального відновлення кінцівки визначається рівнем регенерації нервових волокон через ділянку шва, а якщо їх декілька, як у випадку трансплантанта, то число регенеруючих нервових волокон у дистальному кінці нерва зменшується. Grinsell та Keating зазначають, що на рівні одного шва втрачається близько 50 % нервових волокон, а після двох швів – 75 % [189]. Тому не завершуються пошуки нових і ефективних мікрохірургічних технік у відновленні периферичних нервів, які б дозволили зменшити роль травматичного чинника при виконанні шва та сприяли швидшій регенерації нерва. З'єднання нервів за допомогою епіневральних мікрошвів досі є золотим стандартом хірургічного лікування часткової та повної невротомії. Епіневральний шов є простим і безальтернативним способом у випадках, коли можна поєднати кінці нерва без створення натягу, у іншому випадку відновлення потребує застосування трансплантанта [198]. Проблеми, з якими пов'язана неможливість регенерації нерва, є неспроможність епіневрального шва і його розрив, що змушує повторно виконувати мікрохірургічні втручання.

У наукових колах постало питання покращення регенерації нерва шляхом нейрорафії інноваційними біодеградуєчими полімерами, які б забезпечили адгезію і достатню міцність поєднання кінців нерва. Для уникнення цього недоліку розглядається можливість використання

додаткових адгезивних субстратів навколо шва, наприклад, на основі поліетиленгліколю гідрогелю та фібрину [201]. Синтетичні та біодеградуючі речовини, які зараз використовуються, частково вирішили цю проблему. Тому наш науковий інтерес був зосереджений на порівняльному аналізі ефективності регенерації травмованого нерва і нервово-м'язового відновлення за умов трьох способів мікрохірургічного з'єднання нерва, а саме стандартного епіневрального шва і комбінованого способу з поліетиленгліколем гідрогелем та фібрином. Доцільність використання цих речовин у нейрохірургії травмованих нервів пояснюється їх біомеханічними характеристиками.

Поліетиленгліколь є водорозчинним полімером етиленоксиду, біосумісною напівадгезивною гелеподібною речовиною, яка може бути використана у відновленні тканин як субстрат для адгезії клітин. Покриття на основі поліетиленгліколю було розроблено для мінімізації поверхневої адгезії білків плазми на матеріали [202], пізніше розробили форми поліетиленгліколю для формування мікросередовища для клітин, хірургічних бар'єрів тощо [22]. Синтетичний аналог цієї сполуки у формі гідрогелю все частіше використовується в нейрохірургії [199].

Аутологічний фібриновий клей спершу був єдиним доступним і простим у створенні тканинним клеєм, але деякі технічні обставини його підготовки (центрифугування компонентів крові, додавання тромбіну) спонукали фахівців до розробки більш простої форми використання, яка б повністю усунула ці недоліки. Комерційний фібриновий клей став найбільш часто використовуваним герметиком у хірургії, наприклад, Tisseel [158]. Так, фібриновий клей розглядають як альтернативу мікросередовища у синтетичних трубках при тубулізації дефекту нерва [128, 203, 204]. Є дані, які свідчать за довшу біодеградацію поліетиленгліколю в ушкодженному нерві і його кращу адгезію і міцність у порівнянні з фібрином [23, 200].

На відміну від шовного матеріалу, запропоновані у нейрохірургії гідрогелі є менш травматичними, але міцність з'єднання нервів,

біодеградація та елімінація цих речовин залишається остаточно невстановленою [158, 195]. Різні гідрогелі у рівній мірі можуть поєднувати нерв, не перешкоджати регенерації нерва та не повинні викликати розвиток сполучної тканини, оскільки фіксація нерва з параневральними тканинами погіршує ефективність відновлення [23]. Саме тому порівняльний аналіз ефективності регенерації ушкодженого нерва після різних способів мікрохірургічного відновлення травмованого периферичного нерва є актуальним і прикладним завданням для нейрохірургічної практики.

У власних експериментальних дослідженнях проведено порівняння ефективності регенерації сідничого нерва після трьох способів мікрохірургічного відновлення. Зважаючи на той факт, що нанесення у ділянку перетину нерва гідрогелів не дозволяє досягти необхідного рівня фіксації проксимального і дистального кінців нерва, було виконано додатково два «фіксуючі» епіневральні шви і далі нанесено поліетиленгліколь гідрогель або фібриновий клей. Основною для порівняння була група з 4-6 епіневральними швами. Аналогічним шляхом пішли Lin та співавт. (2019) [25] та Ghergherehchi та співавт. (2019) [21], коли комбінували поліетиленгліколь з спастином або епіневральним швом. Саме через занепокоєння фахівців щодо міцності з'єднання кінців нерва гідрогелями все ще використовують кілька швів, що підвищує міцність гелевого з'єднання і зменшує травматизм нерва через меншу кількість швів [23]. Тому його використання у клінічній практиці обмежується лише в якості допоміжного засобу у мікрохірургічному виконанні швів.

В опублікованій літературі результати ефективності нервово-м'язового відновлення ґрунтуються на одному або кількох методах дослідження. Найчастіше це гістологічна або електронномікроскопічна оцінка регенерації нервових волокон у дистальному сегменті нерва, електрофізіологічні дослідження (наприклад, реєстрація М-відповіді) або функціональні тести на тваринах (SFI-показник). У власних експериментах був застосований системний підхід, який полягав у оцінці нервово-м'язового відновлення за

показників SFI, електрофізіологічних досліджень задньої групи м'язів литки (M-відповідь, ШПЗ, латентний період), регенерації нервових волокон у дистальний сегмент нерва (на основі гістологічних та електронномікроскопічних даних) та стану скелетних м'язів (гістологічні дослідження м'язів литки і визначення активності ММП-9).

Перший етап дослідження полягав у аналізі результатів функціональних проб за показником SFI. Встановлено, що перші ознаки функціонального відновлення кінцівки реєструються вже на 14 добу після мікрохірургічного відновлення сідничого нерва, тоді як без з'єднання кінців нерва будь-які ознаки відновлення моторної функції кінцівки були відсутні. У наступні терміни дослідження реєстрували покращення позитивної динаміки відновлення, яка завершувалась "виходом на плато" на 4 тижні експерименту. Аналіз цих результатів при застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю разом засвідчив позитивну динаміку до 5 тижня і у наступні 6-8 тижнів показник SFI був більшим щодо 4 тижня [177, 180, 181]. Одночасно з цим, після застосування фібринового клею динаміка функціонального відновлення була аналогічною щодо групи ЕШ, тобто можна стверджувати про однорідність результатів у цих групах порівняння. Результат відновлення функції кінцівки у дослідних щурів був достовірно кращим після з'єднання кінців нерва поліетиленгліколем гідрогелем.

Незважаючи на широке використання показника SFI у експериментальних дослідженнях, цей метод має деякі недоліки. Це пов'язано з тим, що лабораторні тварини у перші дні після ушкодження нерва адаптуються до втраченої функції кінцівки, що позначається на активності контралатеральної (протилежної, неушкодженої) кінцівки і деяких результатах вимірювань. Автори відмічають, що щури можуть швидко адаптуватись до травми кінцівки і це призводить до меншої різниці між вихідними даними і даними після операційного втручання. Так, Monte-Raso та співавт. (2008) [197] вважають, що результати SFI у перші 3 тижні після перетину сідничого нерва у силу низки обставин не відповідають реальному

рівню відновлення. Пізніше Jagannath (2018) описала несуттєву різницю між контрольними і дослідними результатами при вивченні дії поліетиленгліколю гідрогелю на регенерацію нерва через 42 доби, що можна оцінювати як достовірний ефект гідрогелю, так і як рівень адаптації і відновлення моторної активності [196]. Саме тому при аналізі власних результатів вимірювань висновок про міжгрупову різницю було зроблено на основі достовірної різниці між даними на 4 і 6-8 тижнях у ПЕГ, тобто динаміка відновлення в цій групі була більшою, ніж у групі ЕШ і ФК. Як правило, значення SFI корелює з морфометричними даними регенованого нерва, а також з результатами ЕНМГ [175]. У власних результатах також виявлено подібну залежність [180, 184]. Тому наступним етапом дослідження був аналіз електрофізіологічних параметрів М-відповіді задньої групи м'язів литки.

При електрофізіологічному дослідженні передбачалось, що ступінь регенерації сіничого нерва буде мати своє відображення у показниках ЕНМГ. Так, на 14 добу після мікрохірургічного відновлення сіничого нерва не виявлено жодної різниці в амплітуді М-відповіді між групами порівняння, а рівень М-відповіді був низьким (3-4 мВ щодо 18,5-20,5 мВ у контролі). На 30 добу реєстрували тенденцію до збільшення амплітуди, яка на 60 добу досягла статистично значущої різниці щодо показників у попередні терміни і навіть наблизилась до контрольних значень. Тільки у групі ФК амплітуда М-відповіді була меншою порівняно з іншими двома дослідними групами і групою НО.

Аналіз латентного періоду М-відповіді показав наступні дані. Показник у групі ЕШ і ФК був більшим від контрольних значень, а на 60 добу навіть збільшився майже в 1,4 рази ($P < 0,05$). Одночасно з цим, при застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю показник не має статистично значущої різниці щодо показників групи НО і ПО.

ШПЗ після повного перетину сіничого нерва і наступного мікрохірургічного відновлення була дещо зменшеною на 14 і 30 добу, але на

60 добу була достовірно меншою контрольного показника. Не виявлено різниці між дослідними групами порівняння. Зменшення ШПЗ і збільшення латентного періоду можна пов'язувати з двома чинниками. По-перше, продовжується регенерація нервових волокон, у тому числі слабкомієлінізованих, які реіннервують паретичний м'яз. По-друге, протягом 60 діб паретичний м'яз зазнає структурних змін і містить доволі гетерогенну групу рухових одиниць, з різними часовими характеристиками електричної збудливості, що розтягує у часі й ускладнює виявлення моменту початка інтегральної електричної відповіді м'яза – М-відповіді. За таких умов збільшення центральної частини М-відповіді – її амплітуди – на тлі зменшення ШПЗ може бути пов'язано з синхронізацією збудження структурно збережених м'язових волокон при успішній реіннервації [190] й охопленні множини м'язових волокон меншою кількістю мотонейронів. Реєстровані М-відповіді на ранніх етапах регенерації нерва часто є несинхронізованими, а вищу амплітуду і синхронізовані параметри ЕНМГ відмічають через 3 і 5 місяців після мікрочірургічного відновлення нерва [191]. Таким чином, результати ЕНМГ в оцінці безпосередніх результатів відновлення можна розглядати як інформативні на 30 і 60 добу, а ранні значення можуть мати низку артефактів. У цьому контексті, одержані результати вказують на достовірно кращий ступінь нервово-м'язового відновлення при застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю порівняно з фібриновим клеєм (за показниками латентного періоду і амплітуди М-відповіді) і не виявлено різниці щодо стандартних епіневральних швів [180, 181, 183, 184, 186].

Третій етап дослідження полягав у оцінці регенерації сідничого нерва. У всі терміни спостереження ресетрували відновлення анатомічної цілісності нерва, розривів ділянки шва не виявлено. Міцність з'єднання ушкодженого нерва є важливим показником ефективності відновлення нерва. Хоча у власних дослідженнях не проводили оцінку міцності мікрочірургічного з'єднання кінців нерва, деякі опубліковані роботи дозволяють зрозуміти

вплив гідрогелів на адгезію нерва. Так, Lin та співавт. (2010) [200] оцінювали міцність з'єднання нерва при різних техніках і дійшли висновку, що розриви нервів на рівні шва були більшими (частішими) після застосування фібрину, але не після шва та поліетиленгліколю гідрогелю. Kouлахouzidis та співавт. (2015) [193] не виявили різниці у коаптації і розриві нерва між епіневральним швом та фібриновим клеєм. При цьому, фібрин рівномірно покривав нерв до 6 тижнів [194], тоді як у власних дослідженнях ми реєстрували фібрин до 30 доби, а поліетиленгліколь – до 60 доби включно. Застосовані гідрогель і фібриновий клей піддавались елімінації і частковій деградації, окремі їх фрагменти були інкапсульовані сполучною тканиною. Їх локалізація була обмежена сполучною тканиною епіневрію та параневральними тканинами. Можна припустити, що ці засоби можуть створити тимчасовий обмежуючий біодеградуєчий бар'єр навколо ушкодженого нерва, ділянки шва від параневрального оточення, що може зменшити розвиток рубцевих процесів після ушкодження. Isaacs та співавт. (2009) частково підтверджують це: товщина параневральної рубцевої тканини у поздовжній проекції нервів на рівні шва була меншою після застосування поліетиленгліколю гідрогелю порівняно з фібриновим клеєм [195]. У цьому ж контексті фібрин формує навколо нерва фібринову капсулу, стимулює інфільтрацію рубцевої тканини, що перешкоджає регенерації нервів, а сприяє регенерації нервів у непористих трубках (non-porous conduits) [194]. Тому поліетиленгліколь і фібрин у формі гідрогелю і клею мають деякі переваги щодо епіневрального шва і тому є перспективними засобом у мікрохірургічному відновленні ушкоджених нервів.

Розвиток сполучної тканини виявлено навколо швів, у регенераційній невромі реєстрували реорганізацію позаклітинного матриксу (невпорядковано орієнтовані колагенові волокна) [177]. Формування таких ділянок на рівні шва погіршує регенерацію нервових волокон у дистальний сегмент нерва, оскільки зони колагеногенезу стають фізичним бар'єром на шляху колб росту. Як доказ цього були виявлені поодинокі рекурентні

нервові волокна та так звані «спіралі Перрончіто», тобто нервові волокна з порушеним напрямом регенерації. У ділянці шва регенерація відбувалась нерівномірно, волокна просторостили окремими групами, щільність яких з терміном зростала. На 14 і 30 добу ще реєстрували овоїди дегенерації. Своєчасна елімінація у нерві дериватів розпаду мієлінових оболонки є окремим фактором, який впливає на відновлення, оскільки є продуктом деструкції ушкоджених нервових волокон, які затримують темпи регенерації. Ми не проводили аналіз елімінації овоїдів, оскільки вважаємо, що відносний рівень регенерації нервових волокон, їх щільність і ремієлінізація є головними показниками ефективності відновлення травмованого нерва. Тому науковий інтерес був сфокусований на дослідженні дистального сегмента нерва.

За результатами гістологічних та електронномікроскопічних досліджень встановлено, що з'єднання ушкодженого сідничого нерва трьома використаними способами у рівній мірі є достатнім для формування регенераційної неврони і регенерації нервових волокон у дистальній сегмент нерва. Важливо, що фасцикулярна будова нерва і ендоневральні «трубки» у дистальному сегменті нерва залишались збереженими, і не виявлено різниці морфології дистального сегмента нерва між групами порівняння. Збереження ендоневральних трубок важливо для регенерації нерва, оскільки регенеруючі нервові волокна мають адгезію до колагену і фібробластів ендоневрію, а також інших білків позаклітинного матриксу. Важливо відмітити, що збережену загальноморфологічну організацію нервових стовбурів виявлено і у задній групі м'язів литки. Збережені стромальні елементи у дистальних терміналях травмованих нервів слід також розглядати як потенційно сприятливий фактор для майбутньої регенерації та реіннервації м'язів. Відсутність ушкоджуючого впливу на нерв поліетиленгліколю гідрогелю і фібринового клею не перешкоджає регенерації нерва, а навіть сприяє відновним процесам. Останнє, ймовірно, пов'язано з меншим числом швів у

травмованому нерві і, відповідно, меншому впливу травматичного чинника на структуру кінців нерва.

У дистальному сегменті сідничого нерва найбільш значним було збільшення щільності нервових волокон на термін 30 доби, а суттєвої різниці в особливостях регенерації нервових волокон між групами порівняння не встановлено. На 60 добу їх щільність достовірно зростала. Відмічено тенденцію проростання осьових циліндрів більшого діаметра у групах з комбінованою мікрохірургічною технікою. Ці відмінності вказують на їх ранішу регенерацію порівняно з групою, де використано стандартний епіневральний шов. Цікаво відмітити, що у групі ПЕГ встановлено більшу щільність волокон з високим темпом ремієлінізації (статистично підтверджено на основі показника товщини мієлінової оболонки). Але, разом з тим, у наступні терміни вже не реєстрували міжгрупової різниці за цим показником, що пояснюється додатковою регенерацією тонких нервових волокон і перерозподілом морфометричних вимірювань при статистичній оцінці. За результатами морфометрії, щільність мієлінових нервових волокон у дистальному сегменті нерва зростала при застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю та фібринового клею на 30 і 60 добу порівняно з епіневральним швом. На кінцевий термін рівень регенерації у дистальному сегменті нерва був рівним 21,5 %, 29,2 % та 32,1 % від значень в інтактному нерві. Ремієлінізація і регенерація нервових волокон великого калібру відбувається при застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю, а статистично значимої різниці за цим показником між запропонованими засобами не встановлено. Тобто, в кінцевому рахунку, три застосовані техніки мікрохірургічного відновлення травмованого периферичного нерва були ефективними. За використання поліетиленгліколю гідрогелю і фібриновго клею у рівній мірі збільшується щільність регенерації нервових волокон, але тільки за умов застосування поліетиленгліколю гідрогелю ремієлінізація нервових волокон пришвидшувалась.

Одержані власні результати досліджень [177, 180, 185] частково узгоджуються з даними іншими авторів. Так, Sexton та співавт. (2012) виявили збільшення числа нервових волокон на 15 % у трансплантанті та дистальному сегменті нерва після застосування поліетиленгліколю гідрогелю [201]. Lin та співавт. (2010) не виявили різниці у регенерації нерва і електрофізіологічних показниках після з'єднання кінців нерва епіневральним швом і поліетиленгліколем, натомість останній дав кращі результати порівняно з фібриновим клеєм [200]. Але за рахунок інтеграції сполучної тканини навколо швів і поліетиленгліколю збільшилась товщина нерва, чого не відбувалось або виявлено у меншій мірі після застосування фібринового клею. Крім того, поліетиленгліколь гідрогель мав більші адгезивні характеристики порівняно з фібриновим клеєм, тому в останньому автори відмітили діастази. У пізніших публікаціях автори описали збільшення регенерації мієлінових волокон та їх ремієлінізації після використання поліетиленгліколю гідрогелю [192]. Аналогічні результати були одержані й у власних дослідженнях. Більш того, автори передбачили, що пришвидшення регенерації периферичного нерва після застосування поліетиленгліколю запобігає атрофії литкового м'яза [192]. У зв'язку з цим, дослідження структурних змін у денервованих скелетних м'язах стало наступним завданням нашої дисертаційної роботи.

На жаль, мікрохірургічне відновлення ушкодженого периферичного нерва не завжди завершується вдалою реіннервацією м'язів. Скелетні м'язи зазнають прогресуючої атрофії, яка на морфологічному рівні полягає у послідовному зменшенні товщини і кількості м'язових волокон та збільшенні щільності сполучнотканинних елементів у м'язах, розвитку фіброзних процесів. Фіброзні зміни полягають у збільшенні кількості волокнистої сполучної тканини, яка в інтактному м'язі зосереджена у більшій мірі в епімізії та перимізії. Додаткові травматичні ушкодження збільшують регенеративні реакції сполучної тканини, що яскраво реєструється у ділянках швів як периферичного нерва, так і м'язів. Атрофію скелетних м'язів після

ушкодження периферичного нерва описано у багатьох експериментальних дослідженнях [205, 207]. Результати цих робіт обмежуються констатацією змін м'язових волокон, дослідженням клітинних реакцій внаслідок активації або пригнічення експерсії деяких ферментів (наприклад, ацетилхолінестерази) [206]. У нашому дослідженні ми поставили завдання виявити і за можливості морфометрично оцінити рівень утворення колагену, який є основним білком екстрацелюлярного матриксу. Про збільшення кількості колагену у *m. gastrocnemius* вже повідомлялось при атрофії м'язів [208, 209]. Відомо, що фіброзні зміни у денерованих м'язах погіршують результати функціонального відновлення. Тому дослідження цих процесів і можливості впливу на них є актуальними.

За результатами власних досліджень, у задній групі денерованих м'язах литки збільшується щільність колагену. На 14 добу вже було виявлено збільшення щільності колагену і у наступні терміни щільність позитивно забарвлених регіонів (після забарвлення сіріусом червоним) не змінювалась або зростала недостовірно. За результатами статистичної оцінки, різниці між цими змінами у денерованих м'язах і після нейрорафії сідничого нерва не виявлено, що вказує на зв'язок розвитку колагеногенезу з денервацією і травматичним ушкодженням нерва і м'язів кінцівки. Аналіз морфометричних даних у групах з використанням поліетиленгліколю гідрогелю та фібриновго клею вказує на деяку зміну цієї динаміки. Результати на 14 і 30 добу вказують на затримку колагеногенезу у денерованих м'язах щодо групи з епіневральним швом, хоча у порівнянні з групою без відновлення нерва дані були у межах статистичної похибки. Але на кінцевий термін досліджень не виявлено різниці між дослідними групами. На основі цих даних, порівняльного аналізу міжгрупової різниці, висунуто гіпотезу про затримку гіпотрофії у м'язах на тлі запропонованих комбінованих способів з'єднання кінців нерва. Збереження м'язових волокон і, очевидно, реіннервація позначилась у затримці структурної реорганізації позаклітинного матриксу і синтезу колагену.

Структурні зміни м'язових волокон у скелетних м'язах є характерною ознакою гіпотрофії та атрофії. Відбувається динамічне зменшення товщини м'язових волокон, навіть до їх повної деструкції та елімінації. Такі ділянки заміщуються сполучною тканиною, яка містить значну кількість колагенових волокон. При цьому в денервованих м'язах реєструється збільшення щільності міоядер у цитоплазмі м'язових волокон. Такі цитологічні реакції виявлено і у власних дослідженнях. Ці зміни дослідники оцінюють як реакцію компенсації та регенерації. В якості доказів наводять появу і проліферацію клітин-сателітів, які за деяких умов можуть інтегруватись до м'язових волокон або формувати нові одиниці [210]. Тобто, при денервації відбувається активація цих клітин та ініціюється їх участь у регенеративних процесах.

За результатами власних гістологічних досліджень, у всіх дослідних групах з травматично ушкодженим сідничим нервом встановлено достовірне зменшення товщини м'язових волокон у задній групі м'язів литки. Зроблено заключення, що виявлені зміни є наслідком денервації [179]. При цьому наявність додаткового травматичного чинника, як на рівні нижньої третини стегна, погіршує структурні зміни. На морфологічному рівні це виявлено у значній атрофії м'язових волокон і значному фіброзі ушкодженої м'язової тканини у ділянках швів. У м'язових волокнах денервованих м'язів виявлено зменшення або часткову втрату поперечної посмугованості, деформацію контуру окремих волокон, збільшення розмірів і, у деяких випадках, кількості міоядер. Так, появу додаткових міоядер реєстрували у групі ПЕГ на 30 добу, у групі ФК – у всі терміни досліджень. Враховуючи сучасні уявлення про молекулярні основи регенерації м'язової тканини, виявлені зміни оцінено як прояв активації відновного процесу. Крім того, у групі ФК на 14 добу і ПЕГ на 60 добу реєстрували м'язові волокна, які оцінені як гіпертрофовані (діаметр більше 120 мкм, 14,1 і 11,5 % проти 4,1 % у контролі). Враховуючи виявлені клітинні реакції та морфометричні зміни м'язових волокон, можна стверджувати про затримку розвитку атрофії

денервованих скелетних м'язів у період їх реіннервації після з'єднання кінців травмованого сідничого нерва за участю поліетиленгліколю гідрогелю та фібринового клею. При цьому, ознаки гіпотрофії м'язів кінцівки з'являються відносно швидко, динаміка змін м'язів суттєво не змінюється після стандартного епіневрального шва, а за умов використання комбінованих технік виявлено часткову затримку і, ймовірно, компенсаторну гіпертрофію поодиноких м'язових волокон.

Наступним розділом дисертаційної роботи було дослідження участі ензимів позаклітинного матриксу в його ремоделюванні в денервованих скелетних м'язах. Рубцеві зміни тканин мають певну динаміку синтезу і накопичення білків ПКМ. У скелетних м'язах головним волокнистим білком є колаген, кількість якого зростає при травмуванні та денервації м'язів. Одним з найбільш досліджених ферментів, які задіяні у змінах колагену ПКМ, є матриксні металопротеїнази [211, 212]. Також ці ферменти відіграють важливу роль у регуляції міграції, диференціації та регенерації клітин м'язової тканини [31, 32]. За даними літератури, синтез матриксних металопротеїназ активується після ушкодження центральної та периферичної нервової систем [216], регенерації м'язових волокон, запальних реакціях та міграції міогенних клітин-сателітів [213]. ММП-2 та ММП-9 виявлено в нервово-м'язових закінченнях, нейроремоцитах і периневрії денервованих м'язових волокон після травми сідничого нерва [214]. Вони здатні руйнувати основний білок мієліну, тобто задіяні у валерівській дегенерації [215], ремоделюють ПКМ для ангиогенезу, і в сукупності ці дані дозволяють припустити, що ММП приймають участь не тільки у запальних реакціях, але й у реконструкції ПКМ при регенерації та атрофії скелетних м'язів. Враховуючи відомі факти про роль ММП в ушкодженні тканин, було досліджено активність цих ферментів у денервованих м'язах литки щурів з травматично ушкодженим сідничим нервом.

Біохімічні дослідження дозволили виявити активну та проактивну форми ММП-9 у досліджуваних зразках. По-перше, виявлено високу

активність двох форм ферменту в групі з повним перетином сідничого нерва без нейрорафії. По-друге, не зафіксовано достовірної різниці між виявленими змінами при повному перетині і мікрохірургічному відновленні нерва епіневральним швом. По-третє, при застосуванні фібринового клею достовірно меншою була активність проактивної форми ММП-9. По-четверте, при застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю рівень ферменту не відрізнявся від контролю. На основі статистичних досліджень і кореляційного аналізу зроблено заключення про участь ММП-9 у гіпотрофії та розвитку фіброзу в денервованих скелетних м'язах, а застосування менш травматичних комбінованих способів мікрохірургічного з'єднання кінців перетнутого периферичного нерва позначається у меншій активації цього ферменту. Власні результати досліджень узгоджуються з іншими дослідниками [176] і дозволяють зрозуміти зв'язок колагеногенезу в скелетних м'язах з реконструкцією ушкодженого периферичного нерва. ПКМ відіграє важливу роль у регенерації як ушкодженого нерва, так і реіннервації скелетних м'язів. Успіх нервово-м'язового відновлення залежить від збереженості колагенових волокон в ушкодженому нерві, а саме ендоневрії, та базальної мембрани м'язових волокон, які містять колаген і ламінін. Ростучі аксони (колби росту) адгезуються до колагенових ендоневральних трубок і так відбувається направлений ріст до денервованих м'язів. Але в ушкодженому нерві та м'язі власний ПКМ ушкоджується, в тому числі за участі ММП. Роль ММП у цих змінах оцінюють по-різному. Розглядається їх участь у змінах щільності ПКМ у перші 6 діб після травмування тканин [216]. Висунуто гіпотезу про позитивну участь ММП-2 і ММП-9 у регенерації нерва, оскільки пришвидшена деградація протеогліканів та інших дериватів білків ПКМ полегшує проростання нервових волокон [217], у проліферації і міграції клітин-сателітів у місці ураження, де вони зливаються один з одним або з ушкодженими міофібрилами, забезпечують регенерацію м'язів [218]. Спершу активність ММП-9 пов'язували з демієлінізацією і деградацією мієліну в ушкодженому

нерві в додаток до ремоделювання ПКМ, але далі повторне збільшення рівня ММП через 28 днів вже вказує на ремоделюванням ПКМ, яке пов'язане з некрозом і фіброзом [219]. Тому роль ММП у нервово-м'язовому відновленні залишається дискусійною, що пов'язано з участю ферментів у різних тканинних процесах, які послідовно пов'язані. Але, зважаючи на власні результати досліджень та дані, які описано Remacle та співавт. (2018) [219], рівень ММП-9 пов'язаний з процесами колагеногенезу і гіпотрофії у денервованих скелетних м'язах.

У власних дослідженнях виявлено, що активність ММП-9 пов'язана з прогресуючим колагеногенезом в ушкодженому і денервованому м'язі, що пояснюється атрофією м'язових волокон і наступним фіброзом цих ділянок, хоча ми не виключаємо прогресування фіброзних процесів у стромальних елементах м'язів від місця ушкодження. Колагеногенез у денервованих м'язах супроводжується збільшеною активністю ММП-9 як при повному перетині нерва без нейрорафії, так і після епіневрального шва. При цьому використання фібринового клею та поліетиленгліколю гідрогелю запобігає фіброзу у денервованих м'язах.

Таким чином, в якості узагальнюючого заключення можна стверджувати про перспективність застосування адгезивних клеїв на основі поліетиленгліколю гідрогелю та фібрину з метою мікрохірургічного відновлення ушкодженого нерва. Зменшується травматичність виконання шва нерва, відбувається пришвидшення регенеративних процесів у нерві і нервово-м'язове відновлення, що пригнічує процеси, які пов'язані з гіпотрофією та фіброзними змінами у денервоаних скелетних м'язах.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено особливості відновлення травмованого периферичного нерва та нервово-м'язового відновлення після мікрохірургічного з'єднання кінців нерва шляхом накладання епіневральних швів і комбінованого застосування епіневральних швів і адгезивних клеїв на основі поліетиленгліколю гідрогелю і фібринового клею.

1. Модифікований спосіб мікрохірургічного відновлення травмованого нерва шляхом комбінації поліетиленгліколю гідрогелю з фіксуючими епіневральними швами сприяє нервово-м'язовому відновленню із статистично значущою динамікою збільшення моторної функції кінцівки до 6-8 тижнів порівняно з комбінацією епіневральних швів та фібринового клею до 4 тижнів.

2. Параметри М-відповіді задньої групи м'язів литки не відрізняються після з'єднання кінців нерва епіневральними швами та з використанням поліетиленгліколю гідрогелю. На 60 добу після застосування фібринового клею достовірно меншою у порівнянні з поліетиленгліколем гідрогелем були амплітуда ($11,2 \pm 2,29$ мВ проти $15,0 \pm 3,05$ мВ) і латентний період М-відповіді ($1,28 \pm 0,18$ мс проти $0,83 \pm 0,03$ мс), а швидкість проведення збудження не відрізнялась після трьох способів нейрорафії (ЕШ – $25,4 \pm 1,79$ мм/мс, ПЕГ – $30,0 \pm 0,98$ мм/мс, ФК – $31,1 \pm 3,22$ мм/мс). Динаміка параметрів М-відповіді після використання поліетиленгліколю гідрогелю свідчить про потенційно краще нервово-м'язове відновлення порівняно з показниками в групах епіневрального шва і фібринового клею.

3. Застосування поліетиленгліколю гідрогелю і фібринового клею з епіневральними швами не перешкоджає регенерації травмованого сідничого нерва на рівні неврони і сприяє проростанню нервових волокон у дистальний сегмент нерва. Комбіновані техніки мікрохірургічного відновлення нерва забезпечують більший рівень регенерації нерва, про що свідчить достовірне збільшення щільності регенерації мієлінових нервових волокон на 30 і 60

добу (на 28,5 і 36,2 % та 48,7 і 50,3 %, відповідно), а при застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю додатково активується ремієлінізація нервових волокон на 30 добу (збільшення товщини мієлінової оболонки після ПЕГ на 65,3 %, ФК – на 23,4 %) і на 60 добу рівень ремієлінізації не відрізняється між групами порівняння.

4. Структурні зміни денервованої задньої групи м'язів литки на 14, 30 і 60 добу характеризуються розвитком гіпотрофії і фіброзу, про що свідчить статистично значуща динаміка зменшення діаметра м'язових волокон (на 20,7, 31,1 і 33,8 %) і збільшення щільності колагену (у 1,7, 2,5 і 2,9 рази) у позаклітинному матриксі епімізію та перимізію м'язів. Морфологічні та морфометричні ознаки гіпотрофії виявляються з 14 доби і поєднуються з пригніченням колагеногенезу і появою гіпертрофованих м'язових волокон при застосуванні поліетиленгліколю гідрогелю на 60 добу після відновлення сідничого нерва (середнє збільшення діаметра м'язових волокон на 44,6 % щодо ЕШ, на 66,5 % щодо ПП).

5. У денервованих м'язах литки після повного перетину сідничого нерва та після епіневрального шва, застосування фібринового клею активується протеїназна активність ММП-9, що корелює з фіброзними змінами у скелетних м'язах ($r_s=0,99$, $p<0,01$). Рівень ММП-9 на 60 добу після мікрохірургічного відновлення сідничого нерва із застосуванням фібринового клею є достовірно меншим порівняно з показниками у групі ЕШ майже у 6 разів, а у випадку застосування поліетиленгліколю гідрогелю статистично значуще не відрізняється від значень у контролі, що свідчить про менший рівень ремоделювання позаклітинного матриксу і фіброзних процесів в ушкоджених скелетних м'язах.

6. Подальша розробка мікрохірургічних технік шляхом використання гідрогелів на основі поліетиленгліколю та фібрину створює теоретичне підґрунтя для застосування інноваційних адгезивних клеїв у клінічній нейрохірургії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Castillo-Galván ML, Martínez-Ruiz FM, De la Garza-Castro O, Elizondo-Omaña RE, Guzmán-López S. [Study of peripheral nerve injury in trauma patients]. *Gac Med Mex.* 2014 Nov-Dec;150(6):527-32. Spanish.
2. Вишне夫斯基 ВА. Причины, диагностические ошибки при повреждениях периферических нервов конечностей. *Запорож. мед. журн.* 2014;(4):50-5.
3. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma.* 1998 Jul;45(1):116-22. doi: 10.1097/00005373-199807000-00025.
4. Novak CB, Anastakis DJ, Beaton DE, Mackinnon SE, Katz J. Biomedical and psychosocial factors associated with disability after peripheral nerve injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2011 May 18;93(10):929-36. doi: 10.2106/JBJS.J.00110.
5. Страфун СС, Гайович ВВ, Гайко ОГ. Оцінка результатів лікування хворих із застарілими ушкодженнями периферичних нервів нижньої кінцівки. *Вісн. ортопедії, травматології та протезування.* 2017;(2):4-9.
6. Страфун СС, Борзих НО, Гайко ОГ, Борзих ОВ, Гайович ВВ, Цимбалюк ЯВ. Пріоритетні напрями хірургічного лікування поранених з ушкодженням периферичних нервів верхньої кінцівки при поліструктурних травмах. *Травма.* 2018;19(3):75-80.
7. Povlsen B. A new fibrin seal in primary repair of peripheral nerves. *J Hand Surg Br.* 1994 Feb;19(1):43-7. doi: 10.1016/0266-7681(94)90048-5.
8. Ovais H, Adil H, Mukhtar B, Rashid A. Peripheral nerve injuries- an analysis of 75 cases. *Pulsus J Surg Res.* 2018 Apr;2(1):34-9.
9. Eroglu U, Yakar F, Bozkurt M, Kahilogullari G, Shukriyev B, Ugur HC, Unlu A. Surgical results of the use of expanded polytetrafluor ethylene as an adhesion inhibitory membrane in anastomosis surgery for total peripheral nerve cut. *Indian J Surg.* 2020 Aug;(82):592-7. doi.org/10.1007/s12262-020-02068-3.

10. Kuffler DP, Foy C. Restoration of neurological function following peripheral nerve trauma. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 6;21(5):1808. doi: 10.3390/ijms21051808.
11. Цымбалюк ВИ, Могила ВВ, Николас ЖИ. Принципы хирургического лечения при травматических повреждениях срединного нерва на разных уровнях. *Укр. мед. часоп.* 2005;3(47):64-8.
12. Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JP. Overall assessment of regeneration in peripheral nerve lesion repair using fibrin glue, suture, or a combination of the 2 techniques in a rat model. Which is the ideal choice? *Surg Neurol.* 2005;64 Suppl 1:S1:10-6. doi: 10.1016/j.surneu.2005.04.022.
13. Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Godoy BO, Plese JP. Electrophysiologic assessment of regeneration in rat sciatic nerve repair using suture, fibrin glue or a combination of both techniques. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005 Sep;63(3A):601-4. doi: 10.1590/s0004-282x2005000400009..
14. Félix SP, Pereira Lopes FR, Marques SA, Martinez AM. Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. *Microsurgery.* 2013 Sep;33(6):468-77. doi: 10.1002/micr.22109.
15. Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M, Schalch P, Esperante S, Infante PL, et al. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation - Part I. Wave amplitude, conduction velocity, and plantar-length factors. *J Reconstr Microsurg.* 2006 Feb;22(2):119-22. doi: 10.1055/s-2006-932506..
16. Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M, Schalch P, Esperante S, Infante RL, et al. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part II. Nerve regeneration and histomorphometric assessment. *J Reconstr Microsurg.* 2006 Feb;22(2):123-8. doi: 10.1055/s-2006-932507.
17. Dunn CJ, Goa KL. Fibrin sealant: a review of its use in surgery and endoscopy. *Drugs.* 1999 Nov;58(5):863-86. doi: 10.2165/00003495-199958050-00010.
18. Radosevich M, Goubran HI, Burnouf T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang.* 1997;72(3):133-43. doi: 10.1046/j.1423-0410.1997.7230133.x.

- 19.Sames M, Blahos J, Rokyta R, Benes V. Comparison of microsurgical suture with fibrin glue connection of the sciatic nerve in rabbits. *Physiol Res.* 1997;46(4):303-6.
- 20.Menovsky T, Beek JF. Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological, and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg.* 2001 Oct;95(4):694-9. doi: 10.3171/jns.2001.95.4.0694.
- 21.Ghergherehchi CL, Mikesh M, Sengelaub DR, Jackson DM, Smith T, Nguyen J, et al. Polyethylene glycol (PEG) and other bioactive solutions with neuroorrhaphy for rapid and dramatic repair of peripheral nerve lesions by PEG-fusion. *J Neurosci Methods.* 2019 Feb 15;314:1-12. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.12.015.
- 22.Puttaswamy SV, Bandla A, Fishlock SJ, Lee S, Lee C, McLaughlin J. Hydrogel as a nerve guide and biocompatible glue for neural applications. In: 2018 IEEE. 18th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO); 2018 July 23-26; Cork, Ireland. Cork; 2018. p. 1-4. doi: 10.1109/NANO.2018.8626329.
- 23.Tse R, Ko JH. Nerve glue for upper extremity reconstruction. *Hand Clin.* 2012 Nov;28(4):529-40. doi: 10.1016/j.hcl.2012.08.006.
- 24.Preul MC, Bichard WD, Spetzler RF. Toward optimal tissue sealants for neurosurgery: use of a novel hydrogel sealant in a canine durotomy repair model. *Neurosurgery.* 2003 Nov;53(5):1189-98; discussion 1198-9. doi: 10.1227/01.neu.0000089481.87226.f7.
- 25.Lin YF, Xie Z, Zhou J, Chen HH, Shao WW, Lin HD. Effect of exogenous spastin combined with polyethylene glycol on sciatic nerve injury. *Neural Regen Res.* 2019 Jul;14(7):1271-9. doi: 10.4103/1673-5374.251336.
- 26.Khalifeh JM, Dibble CF, Dy CJ, Ray WZ. Cost-effectiveness analysis of combined dual motor nerve transfers versus alternative surgical and nonsurgical management strategies to restore shoulder function following upper brachial plexus injury. *Neurosurgery.* 2019 Feb 1;84(2):362-77. doi: 10.1093/neuros/nyy015.
- 27.Nishimura MT, Mazzer N, Barbieri CH, Moro CA. Mechanical resistance of peripheral nerve repair with biological glue and with conventional suture at

- different postoperative times. *J Reconstr Microsurg.* 2008 Jul;24(5):327-32. doi: 10.1055/s-2008-1080535.
- 28.Langer HT, Afzal S, Kempa S, Spuler S. Nerve damage induced skeletal muscle atrophy is associated with increased accumulation of intramuscular glucose and polyol pathway intermediates. *Sci Rep.* 2020 Feb 5;10(1):1908. doi: 10.1038/s41598-020-58213-1.
- 29.Narola J, Pandey SN, Glick A, Chen YW. Conditional expression of TGF- β 1 in skeletal muscles causes endomysial fibrosis and myofibers atrophy. *PLoS One.* 2013 Nov 14;8(11):e79356. doi: 10.1371/journal.pone.0079356.
- 30.Langer HT, Senden JMG, Gijzen AP, Kempa S, Van Loon LJC, Spuler S. Muscle atrophy due to nerve damage is accompanied by elevated myofibrillar protein synthesis rates. *Front Physiol.* 2018 Aug 31;9:1220. doi: 10.3389/fphys.2018.01220.
- 31.Chen X, Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr.* 2009 Oct-Dec;3(4):337-41. doi: 10.4161/cam.3.4.9338.
- 32.Gargioli C, Coletta M, De Grandis F, Cannata SM, Cossu G. PlGF-MMP-9-expressing cells restore microcirculation and efficacy of cell therapy in aged dystrophic muscle. *Nat Med.* 2008 Sep;14(9):973-8. doi: 10.1038/nm.1852. Epub 2008 Jul 27.
- 33.Kamble N, Shukla D, Bhat D. Peripheral nerve injuries: electrophysiology for the neurosurgeon. *Neurol India.* 2019 Nov-Dec;67(6):1419-22. doi: 10.4103/0028-3886.273626.
- 34.Robinson LR. How electrodiagnosis predicts clinical outcome of focal peripheral nerve lesions. *Muscle Nerve.* 2015 Sep;52(3):321-33. doi: 10.1002/mus.24709.
- 35.Fonseca MCR, Elui VMC, Lalone E, Da Silva NC, Barbosa RI, Marcolino AM, et al. Functional, motor, and sensory assessment instruments upon nerve repair in adult hands: systematic review of psychometric properties. *Syst Rev.* 2018 Oct 27;7(1):175. doi: 10.1186/s13643-018-0836-0.

36. Waller A. Experiments on the section of the glosso-pharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Edinb Med Surg J.* 1851 Oct 1;76(189):369-76.
37. Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. *J Bone Joint Surg Am.* 2013 Dec 4;95(23):2144-51. doi: 10.2106/JBJS.L.00704.
38. Wagstaff LJ, Gomez-Sanchez JA, Fazal SV, Otto GW, Kilpatrick AM, et al. Failures of nerve regeneration caused by aging or chronic denervation are rescued by restoring Schwann cell c-Jun. *Elife.* 2021 Jan 21;10:e62232. doi: 10.7554/eLife.62232.
39. Hansen C, Dinis TM, Vidal G, Ben-Mansour K, Bresson D, Egles C, et al. In-vivo analysis of nerve regeneration after sciatic nerve injury in a rat model. *International Biomechanics.* 2016;3(1):57-65. doi: 10.1080/23335432.2016.1233077.
40. Fairbairn NG, Meppelink AM, Ng-Glazier J, Randolph MA, Winograd JM. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World J Stem Cells.* 2015 Jan 26;7(1):11-26. doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.11.
41. Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, Reid AJ. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Mar;82-83:160-7. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.010.
42. Цимбалюк ВІ, Страфун СС, Гайко ОГ, Гайович ВВ. Концепція відновлення функції кінцівки при травматичному ушкодженні периферичних нервів. *Укр. нейрохірург. журн.* 2016;(3):48-54.
43. Цимбалюк ВІ, Третяк ІБ, Гацький ОО. Дослідження ефективності комбінованої пластики сідничного нерва за його великого дефекту шляхом кількісної оцінки ступеня функціонального відновлення в експерименті у щурів. *Укр. нейрохірург. журн.* 2012;(3):48-51.
44. Цимбалюк ВІ, Третяк ІБ, Гацький ОО, Вернигородський СВ. Гістоморфометрична оцінка ефективності комбінованої пластики сідничного

нерва при його великому дефекті у щурів в експерименті. Укр. нейрохірург. журн. 2013;(1):32-9.

45.Lee B, Cho Y. Experimental model systems for understanding human axonal injury responses. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 6;22(2):474. doi: 10.3390/ijms22020474.

46.Sebben AD, Lichtenfels M, Da Silva JL. Peripheral nerve regeneration: cell therapy and neurotrophic factors. *Rev Bras Ortop.* 2015 Nov 16;46(6):643-9. doi: 10.1016/S2255-4971(15)30319-0.

47.Seidel MF, Wise BL, Lane NE. Nerve growth factor: an update on the science and therapy. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Sep;21(9):1223-8. doi: 10.1016/j.joca.2013.06.004.

48.Gómez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr Top Behav Neurosci.* 2013;15:117-36. doi: 10.1007/7854_2012_231.

49.Kanamori A, Catrinescu MM, Belisle JM, Costantino S, Levin LA. Retrograde and Wallerian axonal degeneration occur synchronously after retinal ganglion cell axotomy. *Am J Pathol.* 2012 Jul;181(1):62-73. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.030.

50.Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 2011 Aug 30;8:110. doi: 10.1186/1742-2094-8-110.

51.Nocera G, Jacob C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Oct;77(20):3977-89. doi: 10.1007/s00018-020-03516-9.

52.Liu P, Peng J, Han GH, Ding X, Wei S, Gao G, et al. Role of macrophages in peripheral nerve injury and repair. *Neural Regen Res.* 2019 Aug;14(8):1335-1342. doi: 10.4103/1673-5374.253510.

53.Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol.* 2015 Nov;130(5):605-18. doi: 10.1007/s00401-015-1482-4.

54.Gordon T. Peripheral nerve regeneration and muscle reinnervation. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 17;21(22):8652. doi: 10.3390/ijms21228652..

- 55.Huang CW, Hsueh YY, Huang WC, Patel S, Li S. Multipotent vascular stem cells contribute to neurovascular regeneration of peripheral nerve. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Aug 3;10(1):234. doi: 10.1186/s13287-019-1317-7.
- 56.Panzer KV, Burrell JC, Helm KVT, Purvis EM, Zhang Q, Le AD, et al. Tissue engineered bands of büngner for accelerated motor and sensory axonal outgrowth. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Nov 20;8:580654. doi: 10.3389/fbioe.2020.580654.
- 57.Chuang MH, Ho LH, Kuo TF, Sheu SY, Liu YH, Lin PC, et al. Regenerative potential of platelet-rich fibrin releasate combined with adipose tissue-derived stem cells in a rat sciatic nerve injury model. *Cell Transplant.* 2020 Jan-Dec;29:963689720919438. doi: 10.1177/0963689720919438.
- 58.McGregor C, Sabatier M, English A. Early regeneration of axons following peripheral nerve injury is enhanced if p75NTR is eliminated from the surrounding pathway. *Eur J Neurosci.* 2021 Jan;53(2):663-72. doi: 10.1111/ejn.14943.
- 59.Bhandari PS. Management of peripheral nerve injury. *J Clin Orthop Trauma.* 2019 Sep-Oct;10(5):862-6. doi: 10.1016/j.jcot.2019.08.003.
- 60.Dehdashtian A, Bratley JV, Svientek SR, Kung TA, Awan TM, Cederna PS, et al. Autologous fat grafting for nerve regeneration and neuropathic pain: current state from bench-to-bedside. *Regen Med.* 2020 Oct;15(10):2209-28. doi: 10.2217/rme-2020-0103.
- 61.Wood RL, Karlinsey KS, Thompson AD, Rigby MN, Boatright GD, Pitt WG, et al. Baseline effects of lysophosphatidylcholine and nerve growth factor in a rat model of sciatic nerve regeneration after crush injury. *Neural Regen Res.* 2018 May;13(5):846-53. doi: 10.4103/1673-5374.232479.
- 62.Godinho MJ, Teh L, Pollett MA, Goodman D, Hodgetts SI, Sweetman I, et al. Immunohistochemical, ultrastructural and functional analysis of axonal regeneration through peripheral nerve grafts containing Schwann cells expressing BDNF, CNTF or NT3. *PLoS One.* 2013 Aug 9;8(8):e69987. doi: 10.1371/journal.pone.0069987.
- 63.Zhang Y, Zhang H, Katiella K, Huang W. Chemically extracted acellular allogeneic nerve graft combined with ciliary neurotrophic factor promotes sciatic

- nerve repair. *Neural Regen Res.* 2014 Jul 15;9(14):1358-64. doi: 10.4103/1673-5374.137588.
- 64.McGregor CE, English AW. The role of BDNF in peripheral nerve regeneration: activity-dependent treatments and Val66Met. *Front Cell Neurosci.* 2019 Jan 11;12:522. doi: 10.3389/fncel.2018.00522.
- 65.Funa K, Sasahara M. The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2014 Mar;9(2):168-81. doi: 10.1007/s11481-013-9479-z.
- 66.Ramburrun P, Kumar P, Choonara YE, Bijukumar D, Du Toit LC, Pillay V. A review of bioactive release from nerve conduits as a neurotherapeutic strategy for neuronal growth in peripheral nerve injury. *Biomed Res Int.* 2014;2014:132350. doi: 10.1155/2014/132350.
- 67.Keefe KM, Sheikh IS, Smith GM. Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 3;18(3):548. doi: 10.3390/ijms18030548.
- 68.Godinho MJ, Staal JL, Krishnan VS, Hodgetts SI, Pollett MA, Goodman DP, et al. Regeneration of adult rat sensory and motor neuron axons through chimeric peroneal nerve grafts containing donor Schwann cells engineered to express different neurotrophic factors. *Exp Neurol.* 2020 Aug;330:113355. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113355.
- 69.Kelleher MO, Myles LM, Al-Abri RK, Glasby MA. The use of ciliary neurotrophic factor to promote recovery after peripheral nerve injury by delivering it at the site of the cell body. *Acta Neurochir (Wien).* 2006 Jan;148(1):55-60; discussion 60-1. doi: 10.1007/s00701-005-0631-2.
- 70.Liu B, Xin W, Tan JR, Zhu RP, Li T, Wang D, et al. Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Oct 29;116(44):22347-52. doi: 10.1073/pnas.1910292116.
- 71.Fan L, Xiong Y, Fu Z, Xu D, Wang L, Chen Y, et al. Polyaniline promotes peripheral nerve regeneration by enhancement of the brain-derived neurotrophic

factor and ciliary neurotrophic factor expression and activation of the ERK1/2/MAPK signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2017 Nov;16(5):7534-40. doi: 10.3892/mmr.2017.7534.

72.Mafi P, Hindocha S, Dhital M, Saleh M. Advances of peripheral nerve repair techniques to improve hand function: a systematic review of literature. *Open Orthop J.* 2012;6:60-8. doi: 10.2174/1874325001206010060.

73.Carvalho CR, Oliveira JM, Reis RL. Modern trends for peripheral nerve repair and regeneration: beyond the hollow nerve guidance conduit. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 Nov 22;7:337. doi: 10.3389/fbioe.2019.00337.

74.Hsu SH, Kuo WC, Chen YT, Yen CT, Chen YF, Chen KS, et al. New nerve regeneration strategy combining laminin-coated chitosan conduits and stem cell therapy. *Acta Biomater.* 2013 May;9(5):6606-15. doi: 10.1016/j.actbio.2013.01.025.

75.Oliveira JT, Almeida FM, Biancalana A, Baptista AF, Tomaz MA, Melo PA, et al. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit enhance median-nerve regeneration, prevent decrease of creatine phosphokinase levels in muscle, and improve functional recovery in mice. *Neuroscience.* 2010 Nov 10;170(4):1295-303. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.042.

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

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

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

79.Paczkowska E, Kaczyńska K, Pius-Sadowska E, Rogińska D, Kawa M, Ustianowski P, et al. Humoral activity of cord blood-derived stem/progenitor cells:

- implications for stem cell-based adjuvant therapy of neurodegenerative disorders. *PLoS One*. 2013 Dec 31;8(12):e83833. doi: 10.1371/journal.pone.0083833.
- 80.Miranda GE, Torres RY. Epidemiology of traumatic peripheral nerve injuries evaluated with electrodiagnostic studies in a tertiary care hospital clinic. *P R Health Sci J*. 2016 Jun;35(2):76-80.
- 81.Rasulić L, Puzović V, Rotim K, Jovanović M, Samardžić M, Živković B, et al. The epidemiology of forearm nerve injuries - a retrospective study. *Acta Clin Croat*. 2015 Mar;54(1):19-24.
- 82.Wang EW, Zhang J, Huang JH. Repairing peripheral nerve injury using tissue engineering techniques. *Neural Regen Res*. 2015 Sep;10(9):1393-4. doi: 10.4103/1673-5374.165501.
- 83.Rbia N, Shin AY. The role of nerve graft substitutes in motor and mixed motor/sensory peripheral nerve injuries. *J Hand Surg Am*. 2017 May;42(5):367-77. doi: 10.1016/j.jhsa.2017.02.017.
- 84.Lui H, Vaquette C, Bindra R. Tissue engineering in hand surgery: a technology update. *J Hand Surg Am*. 2017 Sep;42(9):727-35. doi: 10.1016/j.jhsa.2017.06.014.
- 85.Gao Y, Wang YL, Kong D, Qu B, Su XJ, Li H, et al. Nerve autografts and tissue-engineered materials for the repair of peripheral nerve injuries: a 5-year bibliometric analysis. *Neural Regen Res*. 2015 Jun;10(6):1003-8. doi: 10.4103/1673-5374.158369.
- 86.Jones S, Eisenberg HM, Jia X. Advances and future applications of augmented peripheral nerve regeneration. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 7;17(9):1494. doi: 10.3390/ijms17091494.
- 87.Jiang L, Jones S, Jia X. Stem cell transplantation for peripheral nerve regeneration: current options and opportunities. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 5;18(1):94. doi: 10.3390/ijms18010094.
- 88.Sullivan R, Dailey T, Duncan K, Abel N, Borlongan CV. Peripheral nerve injury: stem cell therapy and peripheral nerve transfer. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 14;17(12):2101. doi: 10.3390/ijms17122101.

89. Walsh S, Midha R. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus*. 2009 Feb;26(2):E2. doi: 10.3171/FOC.2009.26.2.E2..
90. Culme-Seymour EJ, Davies JL, Hitchcock J, Mason J, Carpenter MK, Mason C. Cell therapy regulatory toolkit: an online regulatory resource. *Regen Med*. 2015;10(5):531-4. doi: 10.2217/rme.15.33.
91. Hundepool CA, Nijhuis TH, Mohseny B, Selles RW, Hovius SE. The effect of stem cells in bridging peripheral nerve defects: a meta-analysis. *J Neurosurg*. 2014 Jul;121(1):195-209. doi: 10.3171/2014.4.JNS131260.
92. Nijhuis TH, Bodar CW, Van Neck JW, Walbeehm ET, Siemionow M, Madajka M, et al. Natural conduits for bridging a 15-mm nerve defect: comparison of the vein supported by muscle and bone marrow stromal cells with a nerve autograft. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013 Feb;66(2):251-9. doi: 10.1016/j.bjps.2012.09.011.
93. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ЮВ, Кліменко ПП, Васильєв РГ, та ін. Ранні результати відновлення морфологічної структури сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину в експерименті. *Травма*. 2018;2(19):5-12.
94. Wang Y, Zhang Z, Chi Y, Zhang Q, Xu F, Yang Z, et al. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death Dis*. 2013 Dec 5;4(12):e950. doi: 10.1038/cddis.2013.480.
95. Dąbrowska AM, Skopiński P. Stem cells in regenerative medicine - from laboratory to clinical application - the eye. *Cent Eur J Immunol*. 2017;42(2):173-80. doi: 10.5114/ceji.2017.69360.
96. Sverdlov ED, Mineev K. Mutation rate in stem cells: an underestimated barrier on the way to therapy. *Trends Mol Med*. 2013 May;19(5):273-80. doi: 10.1016/j.molmed.2013.01.004.

97. Chen J, Zhang D, Li Q, Yang D, Fan Z, Ma D, et al. Effect of different cell sheet ECM microenvironment on the formation of vascular network. *Tissue Cell*. 2016 Oct;48(5):442-51. doi: 10.1016/j.tice.2016.08.002.
98. Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One*. 2011 Mar 14;6(3):e17899. doi: 10.1371/journal.pone.0017899.
99. Jia H, Wang Y, Tong XJ, Liu GB, Li Q, Zhang LX, et al. Sciatic nerve repair by acellular nerve xenografts implanted with BMSCs in rats xenograft combined with BMSCs. *Synapse*. 2012 Mar;66(3):256-69. doi: 10.1002/syn.21508.
100. Mohammadi R, Azizi S, Delirez N, Hobbenaghi R, Amini K, Malekhetabi P. The use of undifferentiated bone marrow stromal cells for sciatic nerve regeneration in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 May;41(5):650-6. doi: 10.1016/j.ijom.2011.10.028.
101. Nijhuis TH, Brzezicki G, Klimczak A, Siemionow M. Isogenic venous graft supported with bone marrow stromal cells as a natural conduit for bridging a 20 mm nerve gap. *Microsurgery*. 2010 Nov;30(8):639-45. doi: 10.1002/micr.20818.
102. Salomone R, Bento RF, Costa HJ, Azzi-Nogueira D, Ovando PC, Da-Silva CF, et al. Bone marrow stem cells in facial nerve regeneration from isolated stumps. *Muscle Nerve*. 2013 Sep;48(3):423-9. doi: 10.1002/mus.23768.
103. Петрова ЕС. Применение стволовых клеток для стимуляции регенерации поврежденного нерва. *Цитология*. 2012;54(7):525-40.
104. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 25;18(9):1852. doi: 10.3390/ijms18091852.
105. Petrova ES, Isaeva EN, Korzhevskii DE. Differentiation of dissociated rat embryonic brain after allotransplantation into damaged nerve. *Bull Exp Biol Med*. 2013 Nov;156(1):136-8. doi: 10.1007/s10517-013-2296-9.

106. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
107. Li Y, Wang R, Qiao N, Peng G, Zhang K, Tang K, et al. Transcriptome analysis reveals determinant stages controlling human embryonic stem cell commitment to neuronal cells. *J Biol Chem*. 2017 Dec 1;292(48):19590-604. doi: 10.1074/jbc.M117.796383.
108. Alić I, Kosi N, Kapuralin K, Gorup D, Gajović S, Pochet R, et al. Neural stem cells from mouse strain Thy1 YFP-16 are a valuable tool to monitor and evaluate neuronal differentiation and morphology. *Neurosci Lett*. 2016 Nov 10;634:32-41. doi: 10.1016/j.neulet.2016.10.001..
109. Johnson TS, O'Neill AC, Motarjem PM, Nazzal J, Randolph M, Winograd JM. Tumor formation following murine neural precursor cell transplantation in a rat peripheral nerve injury model. *J Reconstr Microsurg*. 2008 Nov;24(8):545-50. doi: 10.1055/s-0028-1088228.
110. Kabiri M, Oraee-Yazdani S, Shafiee A, Hanaee-Ahvaz H, Dodel M, Vaseei M, et al. Neuroregenerative effects of olfactory ensheathing cells transplanted in a multi-layered conductive nanofibrous conduit in peripheral nerve repair in rats. *J Biomed Sci*. 2015 May 20;22(1):35. doi: 10.1186/s12929-015-0144-0.
111. Guérout N, Duclos C, Drouot L, Abramovici O, Bon-Mardion N, Lacoume Y, et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration and functional recovery of peripheral nerve lesion in rats. *Muscle Nerve*. 2011 Apr;43(4):543-51. doi: 10.1002/mus.21907.
112. Guo J, Guo S, Wang Y, Yu Y. Promoting potential of adipose derived stem cells on peripheral nerve regeneration. *Mol Med Rep*. 2017 Nov;16(5):7297-304. doi: 10.3892/mmr.2017.7570.
113. Achilleos A, Trainor PA. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res*. 2012 Feb;22(2):288-304. doi: 10.1038/cr.2012.11.
114. Mii S, Duong J, Tome Y, Uchugonova A, Liu F, Amoh Y, et al. Nestin-expressing hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells promote whisker

sensory-nerve growth in long-term 3D-Gelfoam® histoculture. *Methods Mol Biol.* 2016;1453:39-47. doi: 10.1007/978-1-4939-3786-8_6.

115. Цымбалюк ВИ, Медведев ВВ. Нейрогенные стволовые клетки. Киев: Коваль; 2005. 596 с.

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

117. Najafzadeh N, Esmailzade B, Dastan Imcheh M. Hair follicle stem cells: in vitro and in vivo neural differentiation. *World J Stem Cells.* 2015 Jun 26;7(5):866-72. doi: 10.4252/wjsc.v7.i5.866.

118. Amoh Y, Hoffman RM. Hair follicle-associated-pluripotent (HAP) stem cells. *Cell Cycle.* 2017;16(22):2169-75. doi: 10.1080/15384101.2017.1356513.

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

120. Amoh Y, Aki R, Hamada Y, Niiyama S, Eshima K, Kawahara K, et al. Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury. *J Dermatol.* 2012 Jan;39(1):33-8. doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01413.x.

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

122. Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Hamada Y, Kawahara K, Sato Y, et al. Human hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote regeneration of peripheral-nerve injury: an advantageous alternative to ES and iPS cells. *J Cell Biochem.* 2009 Aug 1;107(5):1016-20. doi: 10.1002/jcb.22204.

123. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 6;102(49):17734-8. doi: 10.1073/pnas.0508440102.

124. Lin H, Liu F, Zhang C, Zhang Z, Guo J, Ren C, et al. Pluripotent hair follicle neural crest stem-cell-derived neurons and schwann cells functionally repair sciatic nerves in rats. *Mol Neurobiol*. 2009 Dec;40(3):216-23. doi: 10.1007/s12035-009-8082-z.
125. Yamazaki A, Obara K, Tohgi N, Shirai K, Mii S, Hamada Y, et al. Implanted hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells encapsulated in polyvinylidene fluoride membrane cylinders promote effective recovery of peripheral nerve injury. *Cell Cycle*. 2017 Oct 18;16(20):1927-32. doi: 10.1080/15384101.2017.1363941.
126. Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res*. 2004 Mar;26(2):151-60. doi: 10.1179/016164104225013798.
127. Brooks DN, Weber RV, Chao JD, Rinker BD, Zoldos J, Robichaux MR, et al. Processed nerve allografts for peripheral nerve reconstruction: a multicenter study of utilization and outcomes in sensory, mixed, and motor nerve reconstructions. *Microsurgery*. 2012 Jan;32(1):1-14. doi: 10.1002/micr.20975.
128. Pabari A, Yang SY, Seifalian AM, Mosahebi A. Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 Dec;63(12):1941-8. doi: 10.1016/j.bjps.2009.12.010.
129. Золотов АС, Пак ОИ. К вопросу об истории хирургических операций при ранениях периферических нервов. *Травматология и ортопедия России*. 2013;(3):162-6.
130. Daoutis NK, Gerostathopoulos NE, Efstathopoulos DG, Misitizis DP, Bouchlis GN, Anagnostou SK. Microsurgical reconstruction of large nerve defects using autologous nerve grafts. *Microsurgery*. 1994;15(7):502-5. doi: 10.1002/micr.1920150713.
131. Ruijs AC, Jaquet JB, Kalmijn S, Giele H, Hovius SE. Median and ulnar nerve injuries: a meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair. *Plast Reconstr Surg*. 2005 Aug;116(2):484-94. doi: 10.1097/01.prs.0000172896.86594.07.

132. Safa B, Buncke G. Autograft substitutes: conduits and processed nerve allografts. *Hand Clin.* 2016 May;32(2):127-40. doi: 10.1016/j.hcl.2015.12.012.
133. Birch R. Nerve Repair. In: Wolfe S, Pederson W, Kozin SH. *Green's Operative Hand Surgery*. 6th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2011. p. 1035-74.
134. Birch R. *Surgical disorders of the peripheral nerves*. 2nd ed. London: Springer-Verlag; 2011. 645 p. doi: 10.1007/978-1-84882-108-8.
135. Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury.* 2012 May;43(5):553-72. doi: 10.1016/j.injury.2010.12.030.
136. Neubauer D, Graham JB, Muir D. Chondroitinase treatment increases the effective length of acellular nerve grafts. *Exp Neurol.* 2007 Sep;207(1):163-70. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.06.006.
137. Karabekmez FE, Duymaz A, Moran SL. Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. *Hand (N Y).* 2009 Sep;4(3):245-9. doi: 10.1007/s11552-009-9195-6.
138. Braga Silva J, Marchese GM, Cauduro CG, Debiasi M. Nerve conduits for treating peripheral nerve injuries: A systematic literature review. *Hand Surg Rehabil.* 2017 Apr;36(2):71-85. doi: 10.1016/j.hansur.2016.10.212.
139. Mackinnon SE, Dellon AL. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconstr Surg.* 1990 Mar;85(3):419-24. doi: 10.1097/00006534-199003000-00015.
140. Mackinnon SE, Dellon AL. Nerve repair and nerve grafts. In: Mackinnon SE, ed. *Surgery of the Peripheral Nerve*. New York: Thieme; 1988. p. 89-129.
141. Krarup C, Archibald SJ, Madison RD. Factors that influence peripheral nerve regeneration: an electrophysiological study of the monkey median nerve. *Ann Neurol.* 2002 Jan;51(1):69-81. doi: 10.1002/ana.10054.
142. Benga A, Zor F, Korkmaz A, Marinescu B, Gorantla V. The neurochemistry of peripheral nerve regeneration. *Indian J Plast Surg.* 2017 Jan-Apr;50(1):5-15. doi: 10.4103/ijps.IJPS_14_17.

143. Rodríguez FJ, Verdú E, Ceballos D, Navarro X. Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2000 Feb;161(2):571-84. doi: 10.1006/exnr.1999.7315.
144. Fox IK, Brenner MJ, Johnson PJ, Hunter DA, Mackinnon SE. Axonal regeneration and motor neuron survival after microsurgical nerve reconstruction. *Microsurgery*. 2012 Oct;32(7):552-62. doi: 10.1002/micr.22036.
145. Muratori L, Ronchi G, Raimondo S, Giacobini-Robecchi MG, Fornaro M, Geuna S. Can regenerated nerve fibers return to normal size? A long-term post-traumatic study of the rat median nerve crush injury model. *Microsurgery*. 2012 Jul;32(5):383-7. doi: 10.1002/micr.21969.
146. Webber C, Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Exp Neurol*. 2010 May;223(1):51-9. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.05.037.
147. Udina E, Puigdemasa A, Navarro X. Passive and active exercise improve regeneration and muscle reinnervation after peripheral nerve injury in the rat. *Muscle Nerve*. 2011 Apr;43(4):500-9. doi: 10.1002/mus.21912.
148. McDonald DS, Bell MS. Peripheral nerve gap repair facilitated by a dynamic tension device. *Can J Plast Surg*. 2010 Spring;18(1):e17-9.
149. Chimutengwende-Gordon M, Khan W. Recent advances and developments in neural repair and regeneration for hand surgery. *Open Orthop J*. 2012;6:103-7. doi: 10.2174/1874325001206010103.
150. Barm pitsioti A, Konofaos P, Ignatiadis I, Papalois A, Zoubos AB, Soucacos PN. Nerve growth factor combined with an epineural conduit for bridging a short nerve gap (10 mm). A study in rabbits. *Microsurgery*. 2011 Oct;31(7):545-50. doi: 10.1002/micr.20925.
151. Lohmeyer JA, Siemers F, Machens HG, Mailänder P. The clinical use of artificial nerve conduits for digital nerve repair: a prospective cohort study and literature review. *J Reconstr Microsurg*. 2009 Jan;25(1):55-61. doi: 10.1055/s-0028-1103505.

152. Wood MD, Moore AM, Hunter DA, Tuffaha S, Borschel GH, Mackinnon SE, et al. Affinity-based release of glial-derived neurotrophic factor from fibrin matrices enhances sciatic nerve regeneration. *Acta Biomater.* 2009 May;5(4):959-68. doi: 10.1016/j.actbio.2008.11.008.
153. Tos P, Battiston B, Ciclamini D, Geuna S, Artiaco S. Primary repair of crush nerve injuries by means of biological tubulization with muscle-vein-combined grafts. *Microsurgery.* 2012 Jul;32(5):358-63. doi: 10.1002/micr.21957.
154. Dornseifer U, Fichter AM, Leichtle S, Wilson A, Rupp A, Rodenacker K, et al. Peripheral nerve reconstruction with collagen tubes filled with denatured autologous muscle tissue in the rat model. *Microsurgery.* 2011 Nov;31(8):632-41. doi: 10.1002/micr.20926.
155. Pereira Lopes FR, Frattini F, Marques SA, Almeida FM, De Moura Campos LC, Langone F, et al. Transplantation of bone-marrow-derived cells into a nerve guide resulted in transdifferentiation into Schwann cells and effective regeneration of transected mouse sciatic nerve. *Micron.* 2010 Oct;41(7):783-90. doi: 10.1016/j.micron.2010.05.010.
156. Sameem M, Wood TJ, Bain JR. A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. *Plast Reconstr Surg.* 2011 Jun;127(6):2381-90. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182131cf5..
157. Boedts D. A comparative experimental study on nerve repair. *Arch Otorhinolaryngol.* 1987;244(1):1-6. doi: 10.1007/BF00453481.
158. Isaacs JE, McDaniel CO, Owen JR, Wayne JS. Comparative analysis of biomechanical performance of available "nerve glues". *J Hand Surg Am.* 2008 Jul-Aug;33(6):893-9. doi: 10.1016/j.jhsa.2008.02.009.
159. Povlsen B. A new fibrin seal: functional evaluation of sensory regeneration following primary repair of peripheral nerves. *J Hand Surg Br.* 1994 Apr;19(2):250-4. doi: 10.1016/0266-7681(94)90179-1.
160. Inalöz SS, Ak HE, Vayla V, Akin M, Aslan A, Sari I, et al. Comparison of microsuturing to the use of tissue adhesives in anastomosing sciatic nerve cuts in rats. *Neurosurg Rev.* 1997;20(4):250-8. doi: 10.1007/BF01105896.

161. Cruz NI, Debs N, Fiol RE. Evaluation of fibrin glue in rat sciatic nerve repairs. *Plast Reconstr Surg.* 1986 Sep;78(3):369-73. doi: 10.1097/00006534-198609000-00015. PMID: 3526370.
162. Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E, Siemionow M. Conventional versus epineural sleeve neuroorrhaphy technique: functional and histomorphometric analysis. *Ann Plast Surg.* 2002 Oct;49(4):397-403. doi: 10.1097/00000637-200210000-00011.
163. Temple CL, Ross DC, Dunning CE, Johnson JA. Resistance to disruption and gapping of peripheral nerve repairs: an in vitro biomechanical assessment of techniques. *J Reconstr Microsurg.* 2004 Nov;20(8):645-50. doi: 10.1055/s-2004-861525.
164. Цимбалюк ВІ, Молотковець ВЮ, Медведєв ВВ, Лузан БМ, Петрів ПІ. Ефективність зварного з'єднання ушкодженого периферичного нерва щура за даними оцінки функціонального індексу сідничного нерва. *Укр.. неврол. журн.* 2017;(2):63-8.
165. Wang T, Ito A, Aoyama T, Nakahara R, Nakahata A, Ji X, et al. Functional evaluation outcomes correlate with histomorphometric changes in the rat sciatic nerve crush injury model: A comparison between sciatic functional index and kinematic analysis. *PLoS One.* 2018 Dec 12;13(12):e0208985. doi: 10.1371/journal.pone.0208985..
166. Коломійцев АК, Чайковский ЮБ, Терещенко ТЛ. Быстрый метод импрегнации азотнокислым серебром элементов периферической нервной системы, пригодный для парафиновых и целлоидиновых срезов. *Арх. анатомии.* 1981;81(8):93-6.
167. Уикли БС. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир; 1975. 324 с.
168. Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. 4th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2000. 564 p.

169. Oliver GW, Stettler-Stevenson WG, Kleiner DE. Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, eds. Handbook of proteolytic enzymes. Berlin, Heidelberg.; 1999. p. 61-76.
170. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
171. Wegner KA, Keikhosravi A, Eliceiri KW, Vezina CM. Fluorescence of picosirius red multiplexed with immunohistochemistry for the quantitative assessment of collagen in tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 2017 Aug;65(8):479-90. doi: 10.1369/0022155417718541.
172. Hadlock TA, Kim SW, Weinberg JS, Knox CJ, Hohman MH, Heaton JT. Quantitative analysis of muscle histologic method in rodent facial nerve injury. *JAMA Facial Plast Surg.* 2013 Mar 1;15(2):141-6. doi: 10.1001/jamafacial.2013.430.
173. Dahlin LB, Wiberg M. Nerve injuries of the upper extremity and hand. *EFORT Open Rev.* 2017 May 11;2(5):158-70. doi: 10.1302/2058-5241.2.160071.
174. Gadd VL. Combining immunodetection with histochemical techniques: the effect of heat-induced antigen retrieval on picro-Sirius red staining. *J Histochem Cytochem.* 2014 Dec;62(12):902-6. doi: 10.1369/0022155414553667.
175. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Іванчов ПВ, Молотковець ВЮ, Чайковський ЮБ, Корсак АВ. Електрозварна технологія у відновленні цілісності травмованого периферичного нерва: огляд літератури і власних експериментальних даних. *Ukr Neurosurg J.* 2020;26(2):24-33. doi: 10.25305/unj.199507.
176. Kumar A, Bhatnagar S, Kumar A. Matrix metalloproteinase inhibitor batimastat alleviates pathology and improves skeletal muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. *Am J Pathol.* 2010 Jul;177(1):248-60. doi: 10.2353/ajpath.2010.091176.
177. Goncharuk O, Savosko S, Petriv T, Tatarchuk M, Medvediev V, Tsymbaliuk V. Epineurial sutures, polyethylene glycol hydrogel and fibrin glue in the sciatic

nerve repair in rats: functional and morphological assessments in experiment. Georgian Med News. 2020 Dec;(309):124-31.

178. Goncharuk OO, Savosko SI, Petriv TI, Medvediev VV, Tsymbaliuk VI. Morphometric study of rat sciatic nerve recovery after three nerve repair techniques: epineural suture, polyethylene glycol hydrogel and fibrin sealant. Int J Morphol. 2021;39(3):677-82.

179. Goncharuk O, Savosko S, Medvediev V, Tsymbaliuk V. Quantitative histological assessment of skeletal muscle hypotrophy after sciatic nerve neurotomy and repair in rat model. Georgian Med News. 2021 Apr;(313):169-72.

180. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Кореляційний аналіз параметрів електронейроміографії, функціонального тесту з рівнем регенерації травмованого сідничного нерва. Укр.. нейрохірург. журн. 2021;27(2):34-40. doi: 10.25305/unj.227615.

181. Цимбалюк ВІ, Гончарук ОО, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Лузан БМ. Оцінка функціонального відновлення нервово-м'язового апарату у ранні терміни за умов різних видів з'єднань сідничного нерва при його травматичному ушкодженні в експерименті. В: Збірник наукових праць XVIII з'їзду ортопедів-травматологів України; 2019 Жовт 9-11; Івано-Франківськ. Івано-Франківськ; 2019. с. 197.

182. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Дослідження гіпотрофії скелетних м'язів при травмі сідничного нерва та різних способах його з'єднання. Укр. наук.-мед. молодіж. журн. 2021; Спецвип 1, XII Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «спеціальні питання та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору; 2020 Берез 26-27):6-7.

183. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Цимбалюк ВІ. Порівняльний аналіз ефективності мікрохірургічного відновлення сідничного нерва за використання трьох технік: епіневрального шва, гідрогелю

поліетиленгліколю та фібринового клею. In: Abstracts VI Ukrainian Winter Neurosurgical Ski Meeting; 2021 Берез 1-3; Bukovel, Ukraine; 2021. с, 54.

184. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Показники електронейроміографії литкового м'язу корелюють з рівнем регенерації сідничого нерва за різних способів мікрохірургічного відновлення. Укр. наук.-мед. молодіж. журн. 2021;(Спецвип 1, XIII Міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених Спеціальні питання та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору; 2021 Берез 18-19; Київ):30.

185. Goncharuk OO, Savosko SI, Petriv TI, Medvediev VV, Tymbaliuk VI. Comparative analysis of the use of epineural suture, hydrogel DuraSeal and fibrin sealant Tisseel in the restoration of damaged sciatic nerve. Wiad Lek. 2021;74(3 cz 2, International scientific and practical conference, dedicated to the World health day, 2021 April 02; Kyiv):795. doi: 10.36740/WLek202103242.

186. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук М.М., Цимбалюк ВІ. Аналіз ефективності мікрохірургічного з'єднання кінців нерва епіневральним швом, DuraSeal та Tisseel. В: Тези доп. VII з'їзду нейрохірургів України з міжнар. участю; 2021 Трав 11-18; Сиде, Туреччина. с. 34-5.

187. Соловьева НИ, Рыжакова ОС. Методы определения активности матриксных металлопротеиназ. Клини. и лаб. диагностика. 2010;(2):17-21.

188. Caillaud M, Richard L, Vallat JM, Desmoulière A, Billet F. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. Neural Regen Res. 2019 Jan;14(1):24-33. doi: 10.4103/1673-5374.243699.

189. Grinsell D, Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. Biomed Res Int. 2014;2014:698256. doi: 10.1155/2014/698256.

190. Sobolev VI, Trush VV, Litvyak KA, Morozova IN. Frequency dependence of parameters of the M response of the rat m. tibialis in the norm and in experimental hyperthyroidism and hypercorticoidism. Neurophysiology. 2015 June;47(1):53-60. <https://doi.org/10.1007/s11062-015-9497-y>.

191. Molotkovets VY, Medvediev VV, Korsak AV, Chaikovsky YuB, Marynsky GS, Tsymbaliuk VI. Restoration of the integrity of a transected peripheral nerve with the use of an electric welding technology. *Neurophysiology*. 2020 June;52(1):31-42. <https://doi.org/10.1007/s11062-020-09848-3>.
192. Mikes M, Ghergherehchi CL, Rahesh S, Jagannath K, Ali A, Sengelaub DR, et al. Polyethylene glycol treated allografts not tissue matched nor immunosuppressed rapidly repair sciatic nerve gaps, maintain neuromuscular functions, and restore voluntary behaviors in female rats. *J Neurosci Res*. 2018 Jul;96(7):1243-64. doi: 10.1002/jnr.24227.
193. Kouloxouzidis G, Reim G, Witzel C. Fibrin glue repair leads to enhanced axonal elongation during early peripheral nerve regeneration in an in vivo mouse model. *Neural Regen Res*. 2015 Jul;10(7):1166-71. doi: 10.4103/1673-5374.156992.
194. Bhatnagar D, Bushman JS, Murthy NS, Merolli A, Kaplan HM, Kohn J. Fibrin glue as a stabilization strategy in peripheral nerve repair when using porous nerve guidance conduits. *J Mater Sci Mater Med*. 2017 May;28(5):79. doi: 10.1007/s10856-017-5889-4.
195. Isaacs J, Klumb I, McDaniel C. Preliminary investigation of a polyethylene glycol hydrogel "nerve glue". *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2009 Sep 15;4:16. doi: 10.1186/1749-7221-4-16.
196. Jagannath K. An examination of walking track analysis footprints of right-side unoperated limbs in rats prior to and following peripheral nerve injury and PEG fusion repair. 2018 [Internet]. [updated 2020 June 5; cited 2021 June 25]. Available from: <https://repositories.lib.utexas.edu/handle/2152/65186>.
197. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *J Neurosci Methods*. 2008 May 30;170(2):255-61. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.022.
198. Kornfeld T, Vogt PM, Radtke C. Nerve grafting for peripheral nerve injuries with extended defect sizes. *Wien Med Wochenschr*. 2019 Jun;169(9-10):240-51. doi: 10.1007/s10354-018-0675-6.

199. Lee SH, Park CW, Lee SG, Kim WK. Postoperative cervical cord compression induced by hydrogel dural sealant (DuraSeal®). *Korean J Spine*. 2013 Mar;10(1):44-6. doi: 10.14245/kjs.2013.10.1.44.
200. Lin KL, Yang DY, Chu IM, Cheng FC, Chen CJ, Ho SP, et al. DuraSeal as a ligature in the anastomosis of rat sciatic nerve gap injury. *J Surg Res*. 2010 Jun 1;161(1):101-10. doi: 10.1016/j.jss.2008.10.020.
201. Sexton KW, Pollins AC, Cardwell NL, Del Corral GA, Bittner GD, et al. Hydrophilic polymers enhance early functional outcomes after nerve autografting. *J Surg Res*. 2012 Oct;177(2):392-400. doi: 10.1016/j.jss.2012.03.049.
202. Kim P, Kim DH, Kim B, Choi SK, Lee SH, Khademhosseini A, et al. Fabrication of nanostructures of polyethylene glycol for applications to protein adsorption and cell adhesion. *Nanotechnology*. 2005 Oct;16(10):2420-6. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/072.
203. Di Summa PG, Kalbermatten DF, Pralong E, Raffoul W, Kingham PJ, Terenghi G. Long-term in vivo regeneration of peripheral nerves through bioengineered nerve grafts. *Neuroscience*. 2011 May 5;181:278-91. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.02.052.
204. Longo MV, Marques de Faria JC, Isaac C, Nepomuceno AC, Teixeira NH, Gemperli R. Comparisons of the results of peripheral nerve defect repair with fibrin conduit and autologous nerve graft: An experimental study in rats. *Microsurgery*. 2016 Jan;36(1):59-65. doi: 10.1002/micr.22413.
205. Carraro U, Boncompagni S, Gobbo V, Rossini K, Zampieri S, Mosole S, et al. Persistent muscle fiber regeneration in long term denervation. Past, Present, Future. *Eur J Transl Myol*. 2015 Mar 11;25(2):4832. doi: 10.4081/ejtm.2015.4832.
206. Wu R, Yan Y, Yao J, Liu Y, Zhao J, Liu M. Calpain 3 expression pattern during gastrocnemius muscle atrophy and regeneration following sciatic nerve injury in rats. *Int J Mol Sci*. 2015 Nov 11;16(11):26927-35. doi: 10.3390/ijms161126003.
207. Zhao L, Lv G, Jiang S, Yan Z, Sun J, Wang L, et al. Morphological differences in skeletal muscle atrophy of rats with motor nerve and/or sensory

- nerve injury. *Neural Regen Res.* 2012 Nov 15;7(32):2507-15. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.32.004.
208. Liu Y, Dong R, Zhang C, Yang Y, Xu Y, Wang H, et al. Therapeutic effects of nerve leachate-treated adipose-derived mesenchymal stem cells on rat sciatic nerve injury. *Exp Ther Med.* 2020 Jan;19(1):223-31. doi: 10.3892/etm.2019.8203. Epub 2019 Nov 15.
209. Wang X, Zhao H, Ni J, Pan J, Hua H, Wang Y. Identification of suitable reference genes for gene expression studies in rat skeletal muscle following sciatic nerve crush injury. *Mol Med Rep.* 2019 May;19(5):4377-87. doi: 10.3892/mmr.2019.10102.
210. Xing HY, Liu N, Zhou MW. Satellite cell proliferation and myofiber cross-section area increase after electrical stimulation following sciatic nerve crush injury in rats. *Chin Med J.* 2020 Aug 20;133(16):1952-60. doi: 10.1097/CM9.0000000000000822.
211. Kurzepa J, El-Demerdash FM, Castellazzi M. Matrix metalloproteinases as a pleiotropic biomarker in medicine and biology. *Dis Markers.* 2016;2016:9275204. doi: 10.1155/2016/9275204.
212. Wang J, Liu Y, Zhang L, Ji J, Wang B, Jin W, et al. Effects of increased matrix metalloproteinase-9 expression on skeletal muscle fibrosis in prolonged alcoholic myopathies of rats. *Mol Med Rep.* 2012 Jan;5(1):60-5. doi: 10.3892/mmr.2011.592.
213. Kim J, Lee J. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase responses to muscle damage after eccentric exercise. *J Exerc Rehabil.* 2016 Aug 31;12(4):260-5. doi: 10.12965/jer.1632640.320.
214. Kherif S, Dehaupas M, Lafuma C, Fardeau M, Alameddine HS. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998 Aug;24(4):309-19. doi: 10.1046/j.1365-2990.1998.00118.x.
215. Cuzner ML, Opdenakker G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory

- demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 1999 Feb 1;94(1-2):1-14. doi: 10.1016/s0165-5728(98)00241-0.
216. Siebert H, Dippel N, Mäder M, Weber F, Brück W. Matrix metalloproteinase expression and inhibition after sciatic nerve axotomy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Jan;60(1):85-93. doi: 10.1093/jnen/60.1.85.
217. Krekoski CA, Neubauer D, Graham JB, Muir D. Metalloproteinase-dependent predegeneration in vitro enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve grafts. *J Neurosci.* 2002 Dec 1;22(23):10408-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-23-10408.2002.
218. Yamada M, Sankoda Y, Tatsumi R, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Sunagawa K, et al. Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells in a nitric oxide-dependent manner. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(10):2183-91. doi: 10.1016/j.biocel.2008.02.017.
219. Remacle AG, Hullugundi SK, Dolkas J, Angert M, Chernov AV, Strongin AY, et al. Acute- and late-phase matrix metalloproteinase (MMP)-9 activity is comparable in female and male rats after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 2018 Mar 20;15(1):89. doi: 10.1186/s12974-018-1123-7.

ДОДАТКИ

Додаток А

Результати статистичних досліджень по вивченню регенерації сідничого нерва та структурних змін задньої групи м'язів литки

Результати оцінки ймовірності відновлення функції кінцівки у щурів після повного перетину та з'єднання кінців нерва різними способами (на основі даних SFI у групах порівняння)

Таблиця А.1

Результати статистичної ймовірності функціонального відновлення за SFI у групі ІІІ і ЕШ

Тиждень / значення ймовірності	2	3	4	5	6	7	8
1	0,02	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
2		0,13	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
3			0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
4				0,79	0,89	0,82	0,59
5					1,0	1,0	1,0
6						1,0	1,0
7							1,0

Примітка. Результати статистичної оцінки за Н-тестом Крускала-Уоліса та однофакторного дисперсійного аналізу (one way ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test).

Таблиця А.2

Результати статистичної ймовірності функціонального відновлення за SFI у групі ПП і ПЕГ

Тиждень / значення ймовірності	2	3	4	5	6	7	8
1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
2		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
3			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
4				0,40	0,06	0,01	0,01
5					1,0	1,0	1,0
6						1,0	1,0
7							1,0

Таблиця А.3

Результати статистичної ймовірності функціонального відновлення за SFI у групі з ПП і ФК

Тиждень / значення ймовірності	2	3	4	5	6	7	8
1	1,0	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
2		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
3			<0,001	<0,001	0,01	<0,001	<0,001
4				1,0	1,0	0,53	1,0
5					1,0	1,0	1,0
6						1,0	1,0
7							1,0

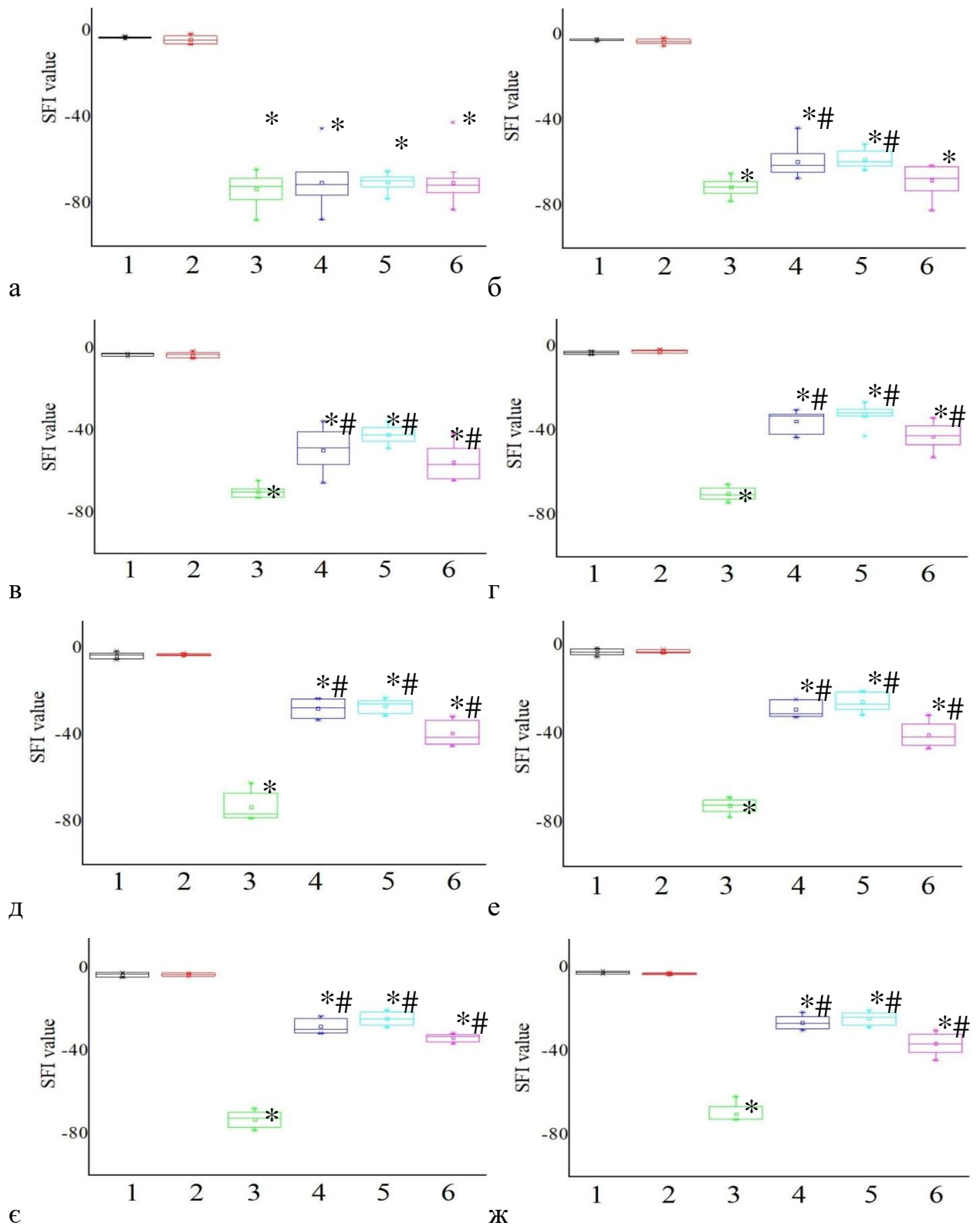


Рис. А.1. Графіки змін SFI-індексу в дослідних групах тварин відповідно до термінів спостереження. Примітка: а – 1 тиждень; б – 2 тиждень; в – 3 тиждень; г – 4 тиждень; д – 5 тиждень; е – 6 тиждень; ж – 8 тиждень; по абсцис: 1 – НО; 2 – ПО; 3 – ПП; 4 – ЕШ; 5 – ПЕГ; 6 – ФК; * – $P < 0,05$ до показників групи НО і ПО; # – $P < 0,05$ до показників групи ПП.

Таблиця А.4

Морфометричні дані сідничого нерва щурів на 14, 30 та 60 день після мікрохірургічного відновлення ($M \pm m$)

Параметр	Доба	НО	ПО	ЕШ	ПЕГ	ФК
Товщина нерва у ділянці невроми (мкм)	14			1534,1 \pm 222,6	1560,1 \pm 148,9	1598,9 \pm 179,3
	30	-	-	1943,7 \pm 63,1	1619,3 \pm 102,2	1542,2 \pm 133,3
	60			2260,8 \pm 165,2@	2261,5 \pm 101,9	1997,0 \pm 80,8
Товщина нерва у ділянці дистального сегмента (мкм)	14		1122,8 \pm 53,3	986,9 \pm 68,4	1006,8 \pm 45,4	1001,4 \pm 52,1
	30	1139,7 \pm 96,8	1142,8 \pm 32,8	992,7 \pm 27,0	1017,8 \pm 87,1	1208,1 \pm 172,2
	60		1150,2 \pm 63,0	1024,1 \pm 85,2	1101,0 \pm 75,4	985,4 \pm 57,6
Число фасцикулів у дистальному сегменті	14		2,6 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2	2,8 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2
	30	2,8 \pm 0,3	3,0 \pm 0,3	2,8 \pm 0,2	2,4 \pm 0,2	3,0 \pm 0,3
	60		2,8 \pm 0,2	2,8 \pm 0,4	3,0 \pm 0,4	2,8 \pm 0,2
Кількість мієлінових нервових волокон у тест-зоні	14		202,8 \pm 12,06	25,29 \pm 1,77*	30,4 \pm 1,45*	31,7 \pm 1,47*
	30	200,0 \pm 13,14	197,4 \pm 10,71	38,5 \pm 2,40*	48,5 \pm 2,78*^	56,8 \pm 4,39*^
	60		199,5 \pm 10,76	43,15 \pm 2,04*	58,5 \pm 2,66*^@**	64,2 \pm 2,20*^@**
Щільність мієлінових нервових волокон (од/мм ²)	14		5643,4 \pm 209,4	720,6 \pm 48,5*	868,1 \pm 39,7*	905,4 \pm 40,2*
	30	5703,6 \pm 256,0	5734,4 \pm 211,4	1076,8 \pm 61,7*	1384,7 \pm 77,6*^@	1618,8 \pm 121,7*^@
	60		5445,7 \pm 177,3	1229,8 \pm 55,8*@	1675,9 \pm 72,8*^@	1829,8 \pm 60,1*^@
Середній діаметр мієлінових нервових волокон (мкм)	14		15,16 \pm 0,37	4,75 \pm 0,06*	5,20 \pm 0,15*^	5,54 \pm 0,18*^
	30	15,28 \pm 0,36	15,81 \pm 0,35	4,82 \pm 0,05*	8,58 \pm 0,18*^	5,23 \pm 0,06*
	60		16,24 \pm 0,34	6,20 \pm 0,12*	6,50 \pm 0,12*	5,74 \pm 0,27*,***
Середня товщина мієлінової оболонки (мкм)	14		3,71 \pm 0,13	0,74 \pm 0,02*	0,81 \pm 0,02*	0,82 \pm 0,02*
	30	3,74 \pm 0,12	3,72 \pm 0,18	0,98 \pm 0,10*@***	1,65 \pm 0,10*@	1,21 \pm 0,02*@***
	60		3,78 \pm 0,15	1,27 \pm 0,04*@**	1,34 \pm 0,04*@**	1,32 \pm 0,05*@

Примітка. * $P < 0,05$ достовірно відносно показників НО і ПО групи; ^ $P < 0,05$ достовірно до показників групи ЕШ; @ $P < 0,05$ достовірно у термін спостереження 14 днів (у межах кожної групи); ** $P < 0,05$ достовірно у термін спостереження 30 днів (у межах кожної групи); *** $P < 0,05$ достовірно до показника групи ПЕГ.

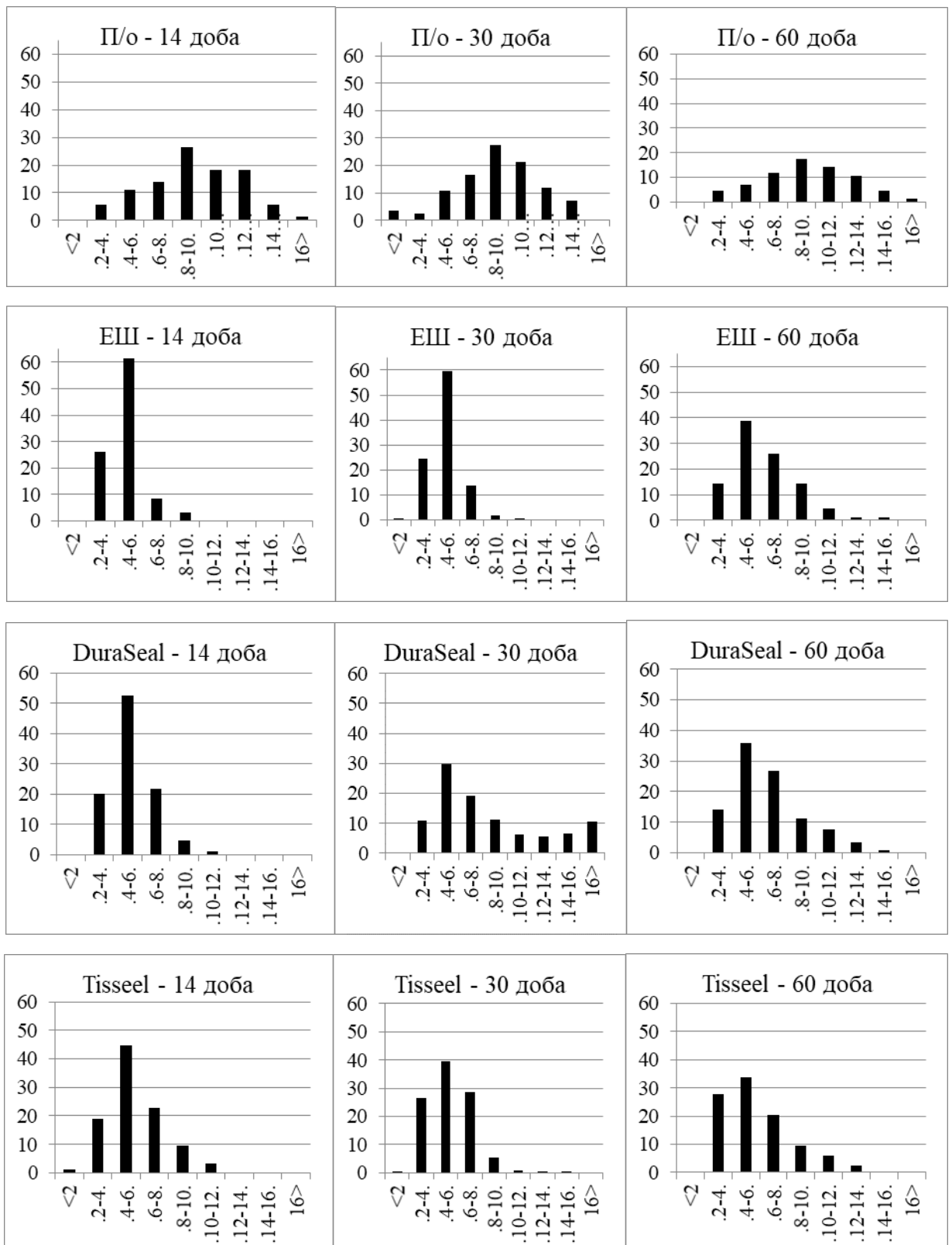


Рис. А.2. Діаграми розподілу середнього діаметра мієлінових нервових волокон у дистальному сегменті сідничого нерва в залежності від техніки мікрохірургічного з'єднання кінців нерва. Примітка: ПО – псевдооперована група; ЕШ – епіневральний шов. По осі абсцис – діаметр (мкм); по осі ординат – відсоток (%).

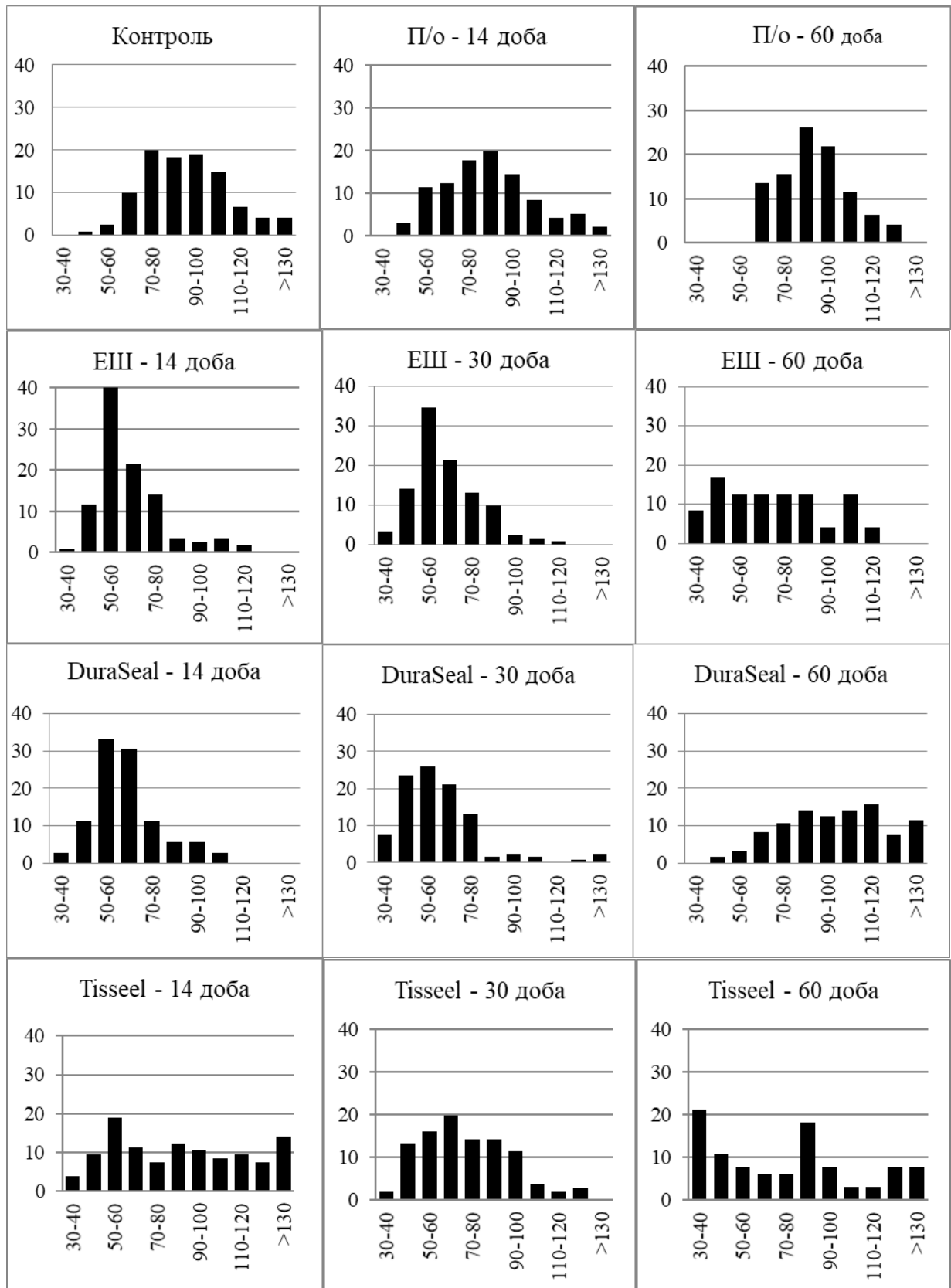


Рис. А.3. Діаграми розподілу середнього діаметра м'язових волокон у задній групі м'язів литки в залежності від техніки мікрохірургічного з'єднання кінців нерва. Примітка: ПО – псевдооперована група; ЕШ – епіневральний шов. По осі абсцис – діаметр; по осі ординат – відсоток (%).

Додаток Б**Перелік наукових публікацій здобувача**

1. Goncharuk O, Savosko S, Petriv T, Tatarchuk M, Medvediev V, Tsymbaliuk V. Epineurial sutures, polyethylene glycol hydrogel and fibrin glue in the sciatic nerve repair in rats: functional and morphological assessments in experiment. *Georgian Med News*. 2020 Dec;(309):124-31.

2. Goncharuk OO, Savosko SI, Petriv TI, Medvediev VV, Tsymbaliuk VI. Morphometric study of rat sciatic nerve recovery after three nerve repair techniques: epineural suture, polyethylene glycol hydrogel and fibrin sealant. *Int J Morphol*. 2021;39(3):677-82.

3. Goncharuk O, Savosko S, Medvediev V, Tsymbaliuk V. Quantitative histological assessment of skeletal muscle hypotrophy after sciatic nerve neurotomy and repair in rat model. *Georgian Med News*. 2021 Apr;(313):169-172.

4. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Кореляційний аналіз параметрів електронейроміографії, функціонального тесту з рівнем регенерації травмованого сідничного нерва. *Укр. нейрохірург. журн*. 2021;27(2):34-40. doi: 10.25305/unj.227615.

5. Цимбалюк ВІ, Гончарук ОО, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Лузан БМ. Оцінка функціонального відновлення нервово-м'язового апарату у ранні терміни за умов різних видів з'єднань сідничного нерва при його травматичному ушкодженні в експерименті. В: Зб. наук. праць XVIII з'їзду ортопедів-травматологів України; 2019 Жовт 9-11; Івано-Франківськ. Івано-Франківськ; 2019. с. 197.

6. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Дослідження гіпотрофії скелетних м'язів при травмі сідничного нерва та різних способах його з'єднання. *Укр. наук.-мед. молодіж. журн*. 2021; Спецвип 1, XII Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «спеціальні питання та лікування

захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору; 2020 Берез 26-27):6-7.

7. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Цимбалюк ВІ. Порівняльний аналіз ефективності мікрохірургічного відновлення сідничного нерва за використання трьох технік: епіневрального шва, гідрогелю поліетиленгліколю та фібринового клею. In: Abstracts VI Ukrainian Winter Neurosurgical Ski Meeting; 2021 Берез 1-3; Bukovel, Ukraine; 2021. с, 54.

8. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук ММ, Медведєв ВВ, Цимбалюк ВІ. Показники електронейроміографії литкового м'язу корелюють з рівнем регенерації сідничного нерва за різних способів мікрохірургічного відновлення. Укр. наук.-мед. молодіж. журн. 2021;(Спецвип 1, XIII Міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених Спеціальні питання та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору; 2021 Берез 18-19; Київ):30.

9. Goncharuk OO, Savosko SI, Petriv TI, Medvediev VV, Tsymbaliuk VI. Comparative analysis of the use of epineural suture, hydrogel DuraSeal and fibrin sealant Tisseel in the restoration of damaged sciatic nerve. Wiad Lek. 2021;74(3 cz 2, International scientific and practical conference, dedicated to the World health day, 2021 April 02; Kyiv):795. doi: 10.36740/WLek202103242.

10. Гончарук ОО, Савосько СІ, Петрів ТІ, Татарчук М.М., Цимбалюк ВІ. Аналіз ефективності мікрохірургічного з'єднання кінців нерва епіневральним швом, DuraSeal та Tisseel. В: Тези доп. VII з'їзду нейрохірургів України з міжнар. участю; 2021 Трав 11-18; Сиде, Туреччина. с. 34-5.

Додаток В

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційного дослідження доповідалися й обговорювалися на: XVIII з'їзді ортопедів-травматологів України (Івано-Франківськ, Україна, 9-11 жовтня 2019 р.), XII науково-практичній конференції з міжнародною участю "Спеціальні питання діагностики та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору" (Київ, Україна, 26-27 березня 2020 р.), VI з'їзді асоціації нейрохірургів України «VI Ukrainian Winter Neurosurgical Ski Meeting», (Буковель, Україна, 1-3 березня 2021 р.), XIII науково-практичній конференції з міжнародною участю "Спеціальні питання діагностики та лікування захворювань ЛОР-органів, краніофасіальної ділянки та органа зору" (Київ, Україна, 18-19 березня 2021 р.), науково-практичній конференції з міжнародною участю до Всесвітнього Дня Здоров'я (Варшава, Польща, 2 квітня 2021 р.), VII з'їзді нейрохірургів України з міжнародною участю (Сіде, Туреччина, 11-18 травня 2021 р.).