

## Оригінальна стаття = Original article = Оригинальная статья

DOI: <https://doi.org/10.25305/unj.113909>**Ефективність пластики дефекту периферичного нерва з використанням тканинно-інженерних провідників різних типів за даними електронейроміографії: експериментальне дослідження**Цимбалюк В.І.<sup>1,2</sup>, Петрів Т.І.<sup>1</sup>, Медведєв В.В.<sup>2</sup>, Татарчук М.М.<sup>1</sup>, Драгунцова Н.Г.<sup>3</sup>, Васильєв Р.Г.<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Відділ відновлювальної та функціональної нейрохірургії, відділення відновлювальної нейрохірургії з рентген операційною, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

<sup>2</sup> Кафедра нейрохірургії, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

<sup>3</sup> Відділ експериментальної нейрохірургії та клінічної фармакології, лабораторія експериментальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

<sup>4</sup> Лабораторія цитогенетики, Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ, Україна

<sup>5</sup> Медична компанія *ilaya*®, Біотехнологічна лабораторія *ilaya*. regeneration, Київ, Україна

Надійшла до редакції 04.11.2017.  
Прийнята до публікації 21.11.17.

**Адреса для листування:**

Петрів Тарас Ігорович, відділення відновлювальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії, вул. Платона Майбороди, 32, Київ, Україна, 04050, e-mail: [petrivtaras@gmail.com](mailto:petrivtaras@gmail.com)

**Мета.** Вивчити в експерименті вплив мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребеня (МСК-ПНГ) на відновлення функції периферичного нерва (ПН) за даними електронейроміографії (ЕНМГ).

**Матеріали і методи.** Експериментальні тварини: білі безпородні щурі-самці віком 5,5 міс, маса тіла (250±50) г, виварій Інституту нейрохірургії n=52); групи: група 1 – пересічення сідничого нерва (СН) невротомією (створення дефекту довжиною 1см) та негайна аутопластика (n=14); група 2 – невротомія та негайна пластика з використанням колагенової трубки, заповненої фібрином (n=15); група 3 – невротомія та негайна пластика з використанням колагенової трубки, заповненої фібриновим гелем з вмістом МСК-ПНГ (n=16); група 4 – несправжньо оперовані тварини (n=7). Визначення показників ЕНМГ шляхом прямої стимуляційної ЕНМГ на 4-му та 8-му тижнях експерименту.

**Результати.** Наприкінці 4-го тижня спостереження у групі 1 амплітуда М-відповіді ( $A_{\text{вм}}$ ) задньої паретичної кінцівки (ЗПК) статистично значущо ( $p=0,018$ ) поступалась такій задньої інтактної кінцівки (ЗІК) – відповідно (3,3±0,5) та (16,5±2,3) мВ. У групах 2 і 3 в ці строки відзначали статистично значуще ( $p=0,018$ ) переважання  $A_{\text{вм}}$  ЗІК – в інтактній кінцівці в групі 2 – (16,5±2,3) та (0,9±0,2) мВ, в групі 3 – (14,7±2,2) та (2,3±0,2) мВ. Через 8 тиж спостереження виявляли статистично значуще переважання  $A_{\text{вм}}$  ЗПК у тварин групи 1 – (4,1±0,7) мВ лише порівняно з показником в групі 2 – (1,4±0,3) мВ ( $p=0,007$ ).

**Висновки.** МСК-ПНГ справляють позитивний вплив на регенерацію ПН внаслідок стимуляції проростання більшої кількості нервових волокон, ніж при імплантації колагенового матрикса без МСК-ПНГ, що опосередковано відображали показники ЕНМГ.

**Ключові слова:** травма периферичного нерва; аутонейропластика; тканинна інженерія; колагеновий матрикс; мультипотентні стовбурові клітини-похідні нервового гребеня; експеримент.

Український нейрохірургічний журнал. 2017;(4):60-6.

**Efficiency of peripheral nerve gaps restoration by different types of tissue engineering constructs according to electromyography: experimental study**Vitaliy I. Tsymbaliuk<sup>1,2</sup>, Taras I. Petriv<sup>1</sup>, Volodymyr V. Medvediev<sup>2</sup>, Mikhail M. Tatarchuk<sup>1</sup>, Natalya G. Draguntsova<sup>3</sup>, Roman G. Vasyliiev<sup>4, 5</sup>

<sup>1</sup> Restorative Neurosurgery Department, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup> Department of Neurosurgery, Bogomoletz National Medical University, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup> Division of Experimental Neurosurgery and Clinical Pharmacology, Laboratory of Experimental Neurosurgery, Kyiv, Ukraine

<sup>4</sup> Laboratory of Cytogenetics, Institute of Genetic and Regenerative Medicine, Kyiv, Ukraine

<sup>5</sup> Biotechnology Laboratory *ilaya*. regeneration, Medical Company *ilaya*®, Kyiv, Ukraine

Received, November 04, 2017.  
Accepted, November 21, 2017.

**Address for correspondence:**

Taras I. Petriv, Restorative Neurosurgery Department, Romodanov Neurosurgery Institute, 32 Platona Mayborody St., Kyiv, Ukraine, 04050, e-mail: [petrivtatas@gmail.com](mailto:petrivtatas@gmail.com)

**Objective.** To investigate the effect of neural crest-derived multipotent stem cells (NC-MSCs) on the restoration of the peripheral nerve function according to the EMG.

**Materials and methods.** Experimental animals: white outbred male rats (5.5 months, 250±50 g, vivarium Romodanov Neurosurgery Institute n=52); groups: group 1 – nerve transection (with a 1 cm gap) and immediate autoplasty (n=14); group 2 – nerve transection and immediate plastic with collagen tube filled with fibrin gel (n=15); group 3 – nerve transection and immediate plastic with collagen tube filled with fibrin gel containing NC-MSCs (n=16); group 4 – sham operated animals (n=7). The key EMG parameters were determined using direct stimulation EMG at the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks of the experiment.

**Results.** As at the end of the 4<sup>th</sup> week of observation in group 1, the amplitude of the M-response of the experimental limb was significantly ( $p=0.018$ ) inferior to the value of the intact limb (3.3±0.5 mV versus 16.5±2.3 mV). In groups 2 and 3, statistically significant ( $p=0.018$ ) values of the intact limb were observed for the amplitude of the M-response (group 2 – 16.5±2.3 mV versus 0.9±0.2 mV, group 3 – 14.7±2.2 mV versus 2.3±0.2 mV,  $p=0.018$ ) and the conduction velocity (group 2 – 22.3±1.6 m/s versus 7.9±2.1 m/s ( $p=0.018$ ; Mann – Whitney U test); group 3 – 19.3±2.5 m/s versus 12.7±0.4 m/s ( $p=0.049$ ; Mann – Whitney U test). The value of the amplitude of the M-response in group 2 (0.9±0.2 mV) was significantly lower than that of group 1 (3.3±0.5 mV;  $p=0.006$ ), group 3 (2.3±0, 2 mV;  $p=0.002$ ) and group 4 (16.6±1.4 mV;  $p=0.006$ ). As at the 8<sup>th</sup> week of observation, there was a significant advantage of the M-response amplitude of the experimental limb

of animals in group 1 ( $4.1 \pm 0.7$  mV) only above the value in group 2 ( $1.4 \pm 0.3$  mV;  $p=0.007$ ).

**Conclusions.** NC-MSCs has a positive effect on the regeneration of PN due to stimulation of growth a greater number of nerve fibers than with implantation of a collagen matrix without NC-MSCs, which indirectly reflects key EMG indicators.

**Keywords:** *peripheral nerve injury; autoneuroplasty; tissue engineering; collagen matrix; neural crest derived multipotent stem cells; electromyography.*

Ukrainian Neurosurgical Journal. 2017;(4):60-6.

## Ефективність пластики дефекта периферического нерва при використанні тканин-інженерних провідників різних типів за даними електронейромиографії: експериментальне дослідження

Цымбалюк В.І.<sup>1,2</sup>, Петрив Т.І.<sup>1</sup>, Медведєв В.В.<sup>2</sup>, Татарчук М.М.<sup>1</sup>, Драгунцова Н.Г.<sup>3</sup> Васильєв Р.Г.<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Відділ відновлювальної та функціональної нейрохірургії, відділення відновлювальної нейрохірургії з рентгеноопераційною, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

<sup>2</sup> Кафедра нейрохірургії, Національний медичний університет імені А.А. Богомольця; Київ, Україна

<sup>3</sup> Відділ експериментальної нейрохірургії та клінічної фармакології, лабораторія експериментальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

<sup>4</sup> Лабораторія цитогенетики, Інститут генетическої та регенеративної медицини НАМН України, Київ, Україна

<sup>5</sup> Медическа компанія «ilaya®», Біотехнологіска лабораторія «ilaya.regeneration», Київ, Україна

Поступила в редакцію 04.11.2017.  
Прийнята к публікації 21.11.2017.

### Адрес для переписки:

Петрив Тарас Ігоревич, відділення відновлювальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії, ул. Платона Майбороди, 32, Київ, Україна, 04050, e-mail: petrivtaras@gmail.com

**Цель.** Изучить влияние МСК-ПНГ на восстановление функции периферического нерва по данным ЭНМГ.

**Материалы и методы.** Экспериментальные животные: Белые беспородные крысы-самцы, возраст 5,5 мес, масса тела ( $250 \pm 50$ ) г, виварий Института нейрохирургии ( $n=52$ ); группы: группа 1 - пересечение седалищного нерва, невротомия (длина дефекта 1 см) и немедленная аутопластика ( $n=14$ ); группа 2 - невротомия и немедленная пластика с применением коллагеновой трубки, заполненной фибрином ( $n=15$ ); группа 3 - невротомия и немедленная пластика с применением коллагеновой трубки, заполненной фибриновым гелем с содержанием МСК-ПНГ ( $n=16$ ); группа 4 - ложно оперированные животные ( $n=7$ ). Определение показателей ЭНМГ путем прямой стимуляционной ЭНМГ на 4-й и 8-й неделях эксперимента.

**Результаты.** По состоянию на конец 4-й недели наблюдения в группе 1 амплитуда М-ответа паретичной конечности статистически значимо ( $p=0,018$ ) уступала таковой в интактной конечности - ( $3,3 \pm 0,5$ ) и ( $16,5 \pm 2,3$ ) мВ. В группах 2 и 3 отмечено статистически значимое ( $p=0,018$ ) преимущество амплитуды М-ответа в интактной конечности, в группе 2 - ( $16,5 \pm 2,3$ ) и ( $0,9 \pm 0,2$ ) мВ; в группе 3 - ( $14,7 \pm 2,2$ ) и ( $2,3 \pm 0,2$ ) мВ ( $p=0,018$ ), а также скорости проведения возбуждения, в группе 2 - ( $22,3 \pm 1,6$ ) и ( $7,9 \pm 2,1$ ) м/с ( $p=0,018$ ; U-тест Мана-Уитни); в группе 3 - ( $19,3 \pm 2,5$ ) и ( $12,7 \pm 0,4$ ) м/с; ( $p=0,049$ ; U-тест Мана-Уитни). Через 8 нед наблюдения отмечали статистически значимое преимущество амплитуды М-ответа паретичной конечности животных группы 1 - ( $4,1 \pm 0,7$ ) мВ только по сравнению с показателем в группе 2 - ( $1,4 \pm 0,3$ ) мВ ( $p=0,007$ ).

**Выводы.** МСК-ПНГ оказывают положительное влияние на регенерацию ПН вследствие стимуляции прорастания большего количества нервных волокон, чем при имплантации коллагенового матрикса без МСК-ПНГ, что отражают показатели ЭНМГ.

**Ключевые слова:** *травма периферического нерва; аутонейропластика; тканевая инженерия; коллагеновый матрикс; мультипотентные стволовые клетки-производные нервного гребня; электронейромиография; эксперимент.*

Украинский нейрохирургический журнал. 2017;(4):60-6.

**Вступ.** Травма опорно-рухового апарату, навіть незначна, може супроводжуватися ушкодженням ПН та спричинити часткову чи повну втрату функції кінцівок. Кількість таких постраждалих кожного року збільшується у зв'язку з збільшенням частоти техногенних травм та складних поєднаних ушкодженнях опорно-рухового апарату [1]. Бурхлива урбанізація зумовлює збільшення загального нейротравматизму у середньому на 2% за рік [2].

В Україні кожного року травма виникає у 2,5–3 тис. потерпілих, з них у 60–75% встановлюють інвалідність [3]. У структурі травм опорно-рухового апарату, ушкодження ПН становить від 1,5 до 6%, з

них 90% — верхньої кінцівки [4]. Під час військових дій цей показник становить 12%, травму ПН спостерігають у 2,8–5% потерпілих при політравмі, вік таких пацієнтів у середньому від 18 до 44 років, що свідчить про значну соціально-економічну значущість проблеми [5].

Протягом останніх років досягнуті значні успіхи у відновленні ПН, зокрема, завдяки впровадженню мікрохірургічної техніки, операційного мікроскопа, електростимуляційних методик, покращенню можливостей для реабілітації [6]. Проте, навіть адекватно виконане реконструктивне втручання з використанням новітніх досягнень діагностики та лікування,

як правило, не забезпечує повноцінне відновлення функції кінцівки і проблема відновлення втрачених функцій при ушкодженні ПН не вирішена [1,2,5,6].

Сьогодні «золотим стандартом» відновлення ПН за їх великих дефектів вважають аутонейропластику. Великим є дефект, за якого шов кінець укінець та спонтанна регенерація нерва неможливі. На думку більшості авторів, це дефект довжиною 3 см і більше [6-10].

Проте, аутонейропластика має ряд недоліків. Для отримання аутоотрансплантата використовують в основному чутливі нерви, найчастіше як донор – литковий нерв *n. suralis* [11]. Використання чутливих нервів як аутоотрансплантата для пластики дефектів рухових нервів супроводжується морфологічною невідповідністю природного мікрооточення та різницею діаметра аксонів, що затримує проліферацію нейролемоцитів та їх здатність мієлінізувати нервові волокна [8, 10].

Крім цього, небажаними чинниками є додаткова операція для виділення трансплантата, функціональний дефіцит в автономній зоні нерва донора, утворення двох зон нейрорафії, утворення невром та рубців, що утруднює проростання аксонів [11].

Перспективною альтернативою аутонейропластиці є нейроінженерний підхід, що передбачає використання біосумісних біодеградуючих матриксів, стовбурових клітин та трофічних чинників [12].

Однією з вимог до перспективного у клінічному відношенні джерела стовбурових клітин є аутологічність та легка доступність, тобто, можливість нескладного отримання у пацієнта. З цієї точки зору оптимальними є постнатальні МСК-ПНГ (*neural crest-derived multipotent stem cells*).

При нейроонтогенезі під час змикання нервових валіків утворюється структура, названа нервовим гребнем. Клітини нервового гребеня мігрують у товщі сомітів, формуючи елементи периферичної нервової системи та значну кількість структур типової мезенхімальної генеалогії. Наявність серед клітин нервового гребеня ссавців стовбурових клітин встановлена нещодавно [13]. Стовбурові клітини нервового гребеня (СКНГ) дають початок численним клітинам нейрального фенотипу — нейронам та глії чутливих вузлів, більшості черепних нервів (за винятком зорового, нюхового, ймовірно, присінково-завиткового) [14], елементам периферійної частини смакового (за винятком сенсорних клітин [15]), нюхового [16] аналізаторів (проте, не слухового [17]), гангліям вегетативної нервової системи, нейролемоцитам ПН тощо. Клітини мезенхімального («ектомезенхімального») фенотипу та структур, що утворюються з СКНГ, включають фібробласти ПН, кістки черепа, гладенькі міоцити артерій голови та шиї, перичити судин мозку, мозкові оболонки, клітини пульпи зуба та одонтобласти, клітини періодонтальної зв'язки та зубного сосочка, адипоцити та клітини дерми обличчя, сполучнотканинні елементи залоз, м'язів та сухожиль голови, стромальні клітини рогівки, м'язи війчастого тіла. Окремо треба відзначити такі типи клітин, що утворюються з СКНГ: пігментоцити — меланоцити шкіри, пігментні клітини внутрішнього вуха та іншої локалізації; різноманітні гормон-продукуючі клітини: хромафінні клітини мозкової речовини надниркових залоз, хромафінні клітини каротидного тіла, кальцитонін-продукуючі

клітини прищитоподібних залоз тощо [14]. СКНГ дають початок нестин-позитивним стовбуровим клітинам строми кісткового мозку [18]. Зважаючи на нейрогенний, гліальний (нейролемоцити, що продукують ПН) потенціал СКНГ, їх використання у відновному лікуванні ушкоджених ПН є перспективним [19, 20]. З практичної точки зору доцільним є використання не власне СКНГ, що є в ембріона, а постнатальних МСК-ПНГ, що містяться у тканинах дорослого організму. Існування МСК-ПНГ у тканинах та органах постнатального організму ссавців було доведено в останні 20 років [14].

Одним з найперспективніших джерел МСК-ПНГ є волосяний мішечок. Він складається з концентрично розташованих циліндрів, що містять клітини, які продукують високоспеціалізовані протеїни, зокрема, кератин, основний компонент волосся і перебувають у постійному динамічному стані: фаза росту (анаген), перехідна фаза (катаген), фаза спокою (телоген). МСК-ПНГ розташовані у зоні потовщення піхви волосяного мішечка (*bulge of hair follicles*) у точці прикріплення к м'язу – підіймачу є волосина (*m. arrector pili*) [21].

Група вчених під керівництвом М. Sieber-Blum відкрили їх у 2004 р. і довели походження цих клітин з нервового гребеня [21]. Сьогодні доведено, що МСК-ПНГ, виділені з волосяного мішечка, можуть диференціюватися у нейрони, гліальні клітини, остеобласти, гладеньком'язові клітини, меланоцити *in vitro* [20, 23] та демонструють цей мультилінійний потенціал на клональному рівні [24]. Нестин-позитивні, кератин 15-негативні клітини можуть диференціюватися у нейрони при їх підшкірній імплантації білими мишам [22]. У дослідженнях морфофункціональних властивостей МСК-ПНГ *in vitro* доведено, що вони мають високий проліферативний потенціал, здатні до мультилінійного диференціювання, експресують антигени, характерні для клітин нервового гребеня (*Sox10*, *p75/CD271*), нейральних стовбурових клітин (*Sox2* та *nestin*), мезенхімальних МСК (*CD44*, *CD73*, *CD90* та інші) [21, 23]. В культурі *in vitro* МСК-ПНГ здатні до клонального росту та самовідновлення [23, 24]. Виділені з волосяних мішечків гризунів та людини МСК-ПНГ, залежно від умов культивування, перетворювалися у  $\beta$ -III-тубулін імунопозитивні нейрони та гліоцити, що експресували протеїн *S100 $\beta$* , основний білок мієліну (MBP), або гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP) [23, 24].

Одним з найпоширеніших методів дослідження функції ПН є ЕНМГ. Основними показниками ЕНМГ є амплітуда М-відповіді ( $A_{MB}$ ) та швидкість проведення збудження руховими волокнами нерва ( $Ш_{PB}$ ).  $A_{MB}$  опосередковано відображає кількість волокон, заданих під час скорочення м'яза, і є інтегральним електричним еквівалентом збудження м'яза у досліджуваній точці.  $Ш_{PB}$  відображає ступінь мієлінізації та діаметр рухових волокон нерва.

**Мета дослідження.** Провести порівняльну оцінку ефективності пластики дефекту ПН з використанням тканинно-інженерних провідників різного типу за даними ЕНМГ.

**Матеріали і методи.** Дослідження проведене на 52-х білих безпородних щурах-самцях, маса тіла ( $250 \pm 25$ ) г, вік 5-6 міс, яких утримували у стандартних умовах віварію, з дотриманням чинних норм біоетики

(Директива Ради ЄС 86/609/ЄЕС «Про наближення законів, підзаконних та адміністративних положень держав-членів про захист тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей», 1986; Європейська Конвенція про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей, 1986; Закон України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», 2006. Протокол дослідження схвалений Комітетом з біоетики Інституту нейрохірургії.

Тварини розподілені на 4 групи: **група 1** — формування дефекту СН довжиною 1 см, та негайна аутопластика (n=14); **група 2** — невротомія, негайна пластика з використанням комерційного провідника (NeuraGen®, Integra LifeSciences, США) — порожнистої трубки з колагену I типу (n=15); **група 3** — невротомія, негайна пластика з використанням тканинно-інженерного провідника на основі колагенового провідника NeuraGen®, заселеного син генними МСК-ПНГ (n=16); **група 4** — несправжньо оперовані тварини (n=7).

МСК-ПНГ виділені методом експлантатів [22] з регіону bulge волосяного мішечка вусів безпорідних дорослих щурів — самців (n=3) віварію Інституту нейрохірургії Інститут генетичної та регенеративної медицини.

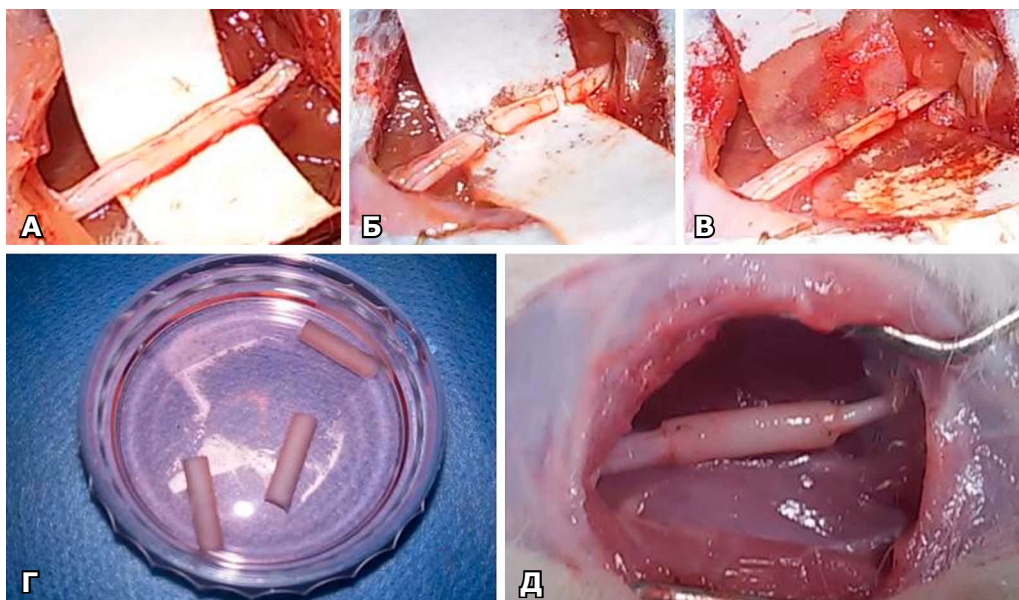
Капсулу мішечка розрізали вздовж, мішечок пересікали поперечно вище та нижче потовщення, яке виділяли з капсули та вміщували в чашку Петрі, вкриту колагеном. Після прикріплення протягом 1 год експлантати заливали середовищем росту:  $\alpha$ MEM («Sigma», США) з додаванням 5 % фетальної телячої сироватки («Sigma», США), 5 нг/мл основного фактору фібробластів («Sigma», США), 10 нг/мл епідермального фактору росту («Sigma», США), 1 % розчину вітамінів MEM («Sigma», США), 1% поживної добавки ITS («Gibco», США), 2 ммоль глутаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В. Культивування здійснювали в мультигазовому інкубаторі CB 210 ("BINDER", Німеччина) при температурі 37° С у газовій суміші такого складу: 90 % N<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>. Перший пасаж (П1) проводили на 10-ту добу в культуральний флакон 25 см<sup>2</sup>. Наступні пересіви клітин здійснювали при досягненні культуурою субконфлуентного стану. Засівна концентрація при пересівах становила 1000 клітин/см<sup>2</sup>. Пасажування проводили з використанням 0,05 % розчину трипсину в 0,53 ммоль розчині Na<sub>2</sub>EDTA («Sigma», США). В експерименті використовували клітини ПЗ-П5.

Тканинно-інженерний провідник для пластики дефекту ПН засівали МСК-ПНГ за двохетапну техніку. Першим етапом засівали 200 тис МСК-ПНГ на внутрішню поверхню колагенового провідника NeuraGen® довжиною 1,2 см. Для цього закривали один кінець трубки, вносили суспензію клітин у поживному середовищі, та закривали другий кінець. Для рівномірного розподілу клітин провідник вміщували у ролерну установку CellNest Roller D2 (SINO-BIOTOP, Китай), що знаходилась у мультигазовому інкубаторі, та культивували протягом 24 год з швидкістю 20 об. хв. Другим етапом на наступну добу засівали ще 800 тис МСК-ПНГ у порожнину провідника шляхом полімеризації фібринового гелю, виготовленого з крові щурів. Для виготовлення фібринового гелю у щурів

збирали кров: 1) у центрифужні пробірки без антикоагулянту для виготовлення сироватки, що містить тромбін; 2) у центрифужні пробірки з антикоагулянтом АСD-A ("Haemonetics", США) у співвідношенні 9:1 для отримання збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП). Кров без антикоагулянту інкубували у термостаті при температурі 37° С на протягом 1 год для її згортання. Центрифугували протягом 20 хв при температурі 4° С, 2300 g, відбирали супернатант (сироватка, що містить тромбін) та заморожували при температурі - 80° С до використання. Кров з антикоагулянтом центрифугували в два етапи: 1) 10 хв при температурі 4° С 800 g (седиментація еритроцитів та мононуклеарів крові, отримання плазми); 2) 20 хв при температурі 4° С, 2300 g для седиментації тромбоцитів та отримання ЗТП. ЗТП двічі заморожували-відтаювали, центрифугували 20 хв при температурі 4° С, 2300 g. Супернатант (кріолізат ЗТП) відбирали та зберігали при температурі - 80° С до використання. Для формування фібринового гелю клітини ресуспендували у 900 мкл кріолізату ЗТП, додавали 100 мкл сироватки з активованим тромбіном (суміш 750 мкл сироватки з тромбіном з 250 мкл 10 % розчину CaCl<sub>2</sub>) та заповнювали цим розчином порожнину закритого з одного боку колагенового провідника, закривали другий кінець провідника та інкубували 20 хв у мультигазовому інкубаторі при температурі 37° С до полімеризації фібринового гелю. Засіяний клітинами провідник вміщували у живильне середовище та культивували протягом 24 год до використання.

Хірургічні втручання (рис. 1) виконували під загальним знеболенням (внутрішньоочеревинне введення суміші розчинів ксилазину – Sedazin, Biowet, Польща, 15 мг/кг та кетаміну – Calipso, Gedeon Richter, Угорщина, 70 мг/кг маси тіла). Тварину фіксували на операційному столу черевцем донизу у середньому фізіологічному положенні. Дотримуючись правил асептики та антисептики, після оброблення операційного поля, виконували лінійний розріз шкіри по латеральній поверхні стегна у проекції СН зліва. За допомогою інструментів (затискач типу "moskit", пінцет хірургічний) тупо виділяли та мобілізували лівий СН. На відстані (20±1,5) мм від точки виходу СН з порожнини малого таза за допомогою леза висікали фрагмент довжиною (10±2) мм. У тварин **групи 1** висічений фрагмент повертали на 180° і фіксували до кукс нерва кінець в кінець шляхом епіневральної нейрорафії атравматичною голкою з монофіламентною поліамідною ниткою № 10/0 (ТОВ "ДЕВЦ "Олімп", Україна) з використанням операційного мікроскопа (збільшення×12). У тварин **групи 2** здійснювали пластику зони діастазу СН з використанням провідника (NeuraGen®, Integra LifeSciences, USA) шляхом епіневральної фіксації. У тварин **групи 3** діастаз між куксами СН усували аналогічним чином, проте, колагеновий провідник попередньо засівали МСК-ПНГ у кількості 1×10<sup>6</sup> клітин. У тварин **групи 4** після мобілізації СН невротомію не виконували.

Після ретельного гемостазу у тварин усіх груп операційну рану закривали одним рядом вузлових швів з використанням атравматичної голки з монофіламентною поліамідною ниткою № 4/0 (ТОВ "ДЕВЦ "Олімп", Україна). Для профілактики інфекційних ускладнень застосовували біцилін-5 (ОАО «Киевмедпрепарат»), підшкірно вводили суспензію у задню шийну ділянку,



**Рис. 1.** А – виділення СН; Б – формування дефекту СН; В – аутонейропластика; Г – провідники, підготовлені до імплантації; Д – пластика зони діастазу СН з використанням провідника.

1 млн. ОД на 1 кг маси тіла. Як протизапальну та протинабрякову терапію внутрішньоочеревинно вводили розчин дексаметазону (KRKA, Словенія, 6 мг/кг маси тіла). Тварини протягом 2–4 год утримували в приміщенні з підвищеною температурою повітря (30° С), у подальшому — у звичних умовах віварію.

ЕНМГ проводили тваринам усіх груп через 4 і 8 тиж після моделювання травми. Після глибокої анестезії тварину укладали черевцем донизу, вздовж хвоста фіксували електрод заземлення (металізована стрічка, змочена ізотонічним розчином натрію хлориду, шириною 20 мм, довжиною 100 мм), лівий та правий СН мобілізували у ділянці верхньої третини стегна, охоплювали платиновим гачкоподібним біполярним електродом (діаметр одного електрода 0,22 мм, відстань між електродами 5,5 мм), уникаючи контакту з навколишніми тканинами. Стимулюючий струм генерували на цифровому електронейроміографі «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 1 мА. Інтенсивність стимуляції підбирали індивідуально, виходячи з того рівня, за якого досягали  $A_{MB}$  (потенціал дії – ПД м'яза), вона становила у середньому (2,5±5) мА, (3,0±5) мВ. Збудження реєстрували на електронейроміографі за допомогою концентричного голкового електрода (довжина 25 мм, діаметр 0,3 мм, площа відведення 0,015 мм<sup>2</sup>) у руховій точці литкового м'яза. Відстань між стимулюючими та реєструючим електродами 30 мм. Після дослідження тварину у стані наркотичного сну виводили з експерименту методом дислокації шиї шляхом тракції за ростральний кінець.

Аналізували такі показники ЕНМГ: амплітуду М-відповіді (амплітуда ПД м'яза –  $A_{MB}$ ), латентний період М-відповіді (латенція ПД м'яза –  $LP_{MB}$ ); у подальшому аналізували індивідуальні значення, отримані за максимальної реєстрованої величини  $A_{MB}$  (у більшості спостережень — при силі стимулюючого струму 3 мА).

Статистична обробка цифрових даних здійснена за допомогою програмного пакета Statistica 10.0 на персональному комп'ютері. Усереднені величини представляли у вигляді ( $M \pm m$ ), де  $M$  — середнє значення величини,  $m$  — стандартна похибка середнього значення. Статистичну значущість різниці даних правої та лівої задніх кінцівок у межах кожної групи оцінювали за Уїлкоксоном (Wilcoxon Matched Pairs Test), гомолатеральних кінцівок у межах кожної групи у різні строки спостереження, а також між різними групами в однакові строки спостереження — за U-тестом Мана-Уїтні (Mann-Whitney U-test). Припущення щодо статистичної значущості отриманого результату вважали вірним, якщо ймовірність нульової гіпотези була менше ( $p < 0,05$ ).

**Результати та їх обговорення.** Наприкінці 4-го тижня спостереження у групі 1 з усіх показників ЕНМГ лише  $A_{MB}$  ЗПК була статистично значущою ( $p = 0,018$ ; U-тест Мана-Уїтні) менша, ніж ЗІК – відповідно (3,3±0,5) та (16,5±2,3) мВ. У групах 2 і 3 відзначали статистично значуще ( $p = 0,018$ , U-тест Мана-Уїтні) збільшення  $A_{MB}$  в ЗІК: в групі 2 — (16,5±2,3) і (0,9±0,2) мВ; в групі 3 — (14,7±2,2) та (2,3±0,2) мВ  $p = 0,018$ , U-тест Мана-Уїтні). Наприкінці 8-го тижня в групах 1 і 2 динаміка показників ЕНМГ в ЗІК та ЗПК аналогічна такій у попередні строки спостереження (**див. таблицю**).

Отже, колагеновий провідник, імплантований без клітинного компоненту, не мав стимулюючого впливу на ріст нервових волокон особливо тих, що забезпечують високу швидкість проведення імпульсу. Такі результати, ймовірно, свідчать про компенсаторне уповільнення рухів ЗІК відповідно до уповільненої рухової активності ЗПК, щоб не порушувати руховий патерн. Після аутонейропластики цього не спостерігали, оскільки немає вираженого уповільнення швидкості проведення збудження по нерву.

В досліджуваних групах наприкінці 4-го тижня статистично значущих відмінностей показників ЕНМГ

Результати ЕНМГ-дослідження у тварин експериментальних груп. Дані щодо статистичної значущості відмінностей представлені у тексті.

Групи тварин	Кінцівка	Величина показника у строки спостереження, тиж (M±m)			
		4		8	
		A, мВ	t, мс	A, мВ	t, мс
1	ЗПК	3,3±0,5	1,3±0,2	4,1±0,7	1,1±0,2
	ЗІК	16,5±2,3	1,1±0,2	20,3±3,0	1,3±0,1
2	ЗПК	0,9±0,2	4,1±2,0	1,4±0,3	2,5±0,6
	ЗІК	16,5±2,3	1,1±0,1	14,8±1,8	1,3±0,1
3	ЗПК	2,3±0,2	1,9±0,3	2,9±0,4	1,9±0,7
	ЗІК	14,7±2,2	1,2±0,1	14,8±1,8	1,2±0,1
4	ЗПК	16,6±1,4	1,4±0,2	22,4±2,2	1,1±0,3
	ЗІК	15,7±2,4	1,2±0,1	17,0±1,9	1,2±0,1

в ЗІК не були (рис. 2).  $A_{\text{мВ}}$  у групі 2 – (0,9±0,20 мВ статистично значущо менша, ніж в групі 1 – (3,3±0,50 мВ ( $p=0,006$ ); в групі 3 – (2,3±0,20 мВ ( $p=0,002$ ); в групі 4 – (16,6±1,4) мВ ( $p=0,006$   $A_{\text{мВ}}$  у групах 1 і 3 статистично значущо менша, ніж в групі 4 ( $p=0,004$ ).

Через 8 тиж (рис. 3) спостереження відзначено статистично значуще збільшення  $A_{\text{мВ}}$  ЗПК у тварин групи 1 до (4,1±0,7) мВ лише порівняно з таким в групі 2 (1,4±0,3) мВ ( $p=0,007$ ).  $A_{\text{мВ}}$  ЗПК в групах 1, 2 і 3 статистично значущо поступала такій в групі 4 – (22,4±2,2) мВ ( $p=0,006$ ,  $p=0,004$ ,  $p=0,004$  відповідно). Різниці показника в ЗІК не було.

Статистично значущі відмінності між показниками в ЗІК не виявлені.

Після аутонейропластики, попри низькі показники реіннервації м'яза, спектр регенеруючих волокон, що забезпечували реіннервацію, ймовірно, не відрізнявся від таких у контралатеральному нерві тієї самої тварини, проте, відрізнявся від спектру у псевдооперованих тварин наявністю волокон більшого діаметра. Після імплантації колагенового провідника у поєднанні з МСК-ПНГ наприкінці 1-го місяця спектр волокон суттєво відрізнявся від такого у контралатеральному нерві, проте, не відрізнявся від спектру волокон не-

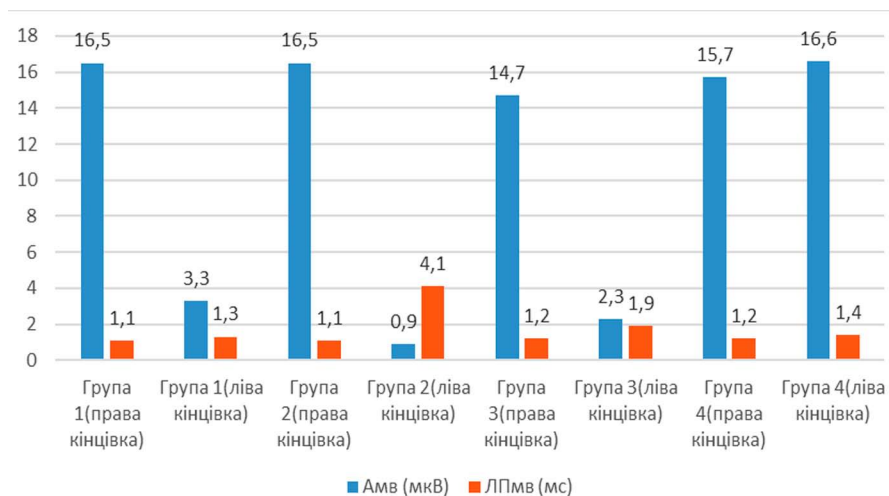


Рис. 2. Амплітуда  $A_{\text{мВ}}$ , ЛП $_{\text{мВ}}$  ЗІК та ЗПК через 4 тиж у тварин експериментальних груп порівняно з такими в контрольній групі (пояснення у тексті).

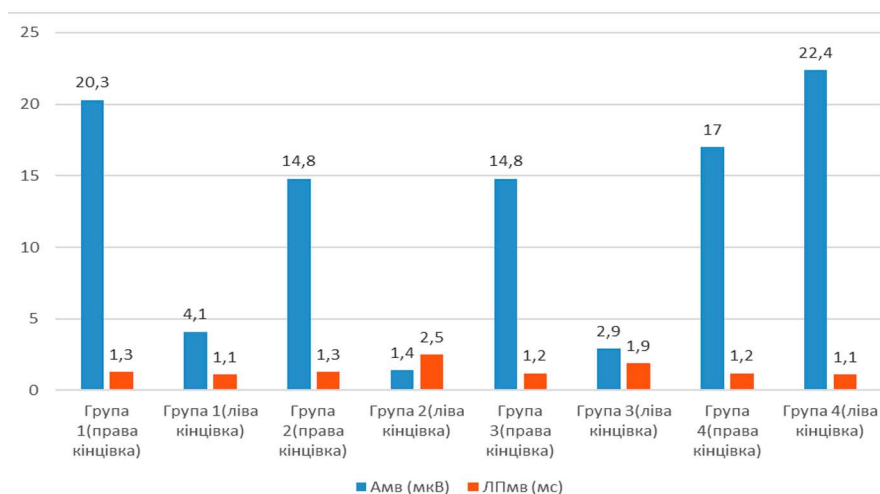


Рис. 3.  $A_{\text{мВ}}$ , ЛП $_{\text{мВ}}$  ЗІК та ЗПК через 8 тиж у тварин експериментальних груп порівняно з такими в контрольній групі (пояснення у тексті).

рва у псевдооперованих тварин. На 2-му місяці після імплантації колагенового матриксу, асоційованого з МСК-ПНГ, відзначали результативну реіннервацію м'яза волокнами великого діаметра, через 8 тиж швидкість проведення збудження не відрізнялася від такої в інтактній кінцівці. Отже, після аутонейропластики протягом 1-го місяця виявляли переважно проростання волокон великого діаметра, чого не спостерігали при імплантації колагенового провідника, та відзначали меншою мірою – при імплантації колагенового провідника, асоційованого з МСК-ПНГ. Протягом 2-го місяця після аутонейропластики реіннервації здійснювалася переважно волокнами меншого діаметра, при імплантації колагенового провідника, асоційованого з МСК-ПНГ – волокнами більшого діаметра.

Результат реіннервації після аутонейропластики та імплантації колагенового провідника у поєднанні з МСК-ПНГ за показниками ЕНМГ у цілому зіставний, відзначено статистично незначущу різницю електрофізіологічного спектру волокон, що реіннервували паретичний м'яз.

**Висновки.** 1. МСК-ПНГ справляють позитивний вплив на регенерацію ПН внаслідок стимуляції проростання більшої кількості нервових волокон, ніж при імплантації колагенового матрикса без МСК-ПНГ, про що опосередковано свідчить показники ЕНМГ.

2. Тканинно-інженерний підхід у пластиці дефекту ПН з використанням колагенових матриксів та МСК-ПНГ забезпечує результат, відповідний "золотому стандарту" – аутонейропластиці.

3. Доцільна розробка подальших шляхів удосконалення тканинно-інженерного підходу до відновлення ПН, оскільки аутонейропластику удосконалити неможливо.

## References

- Torres RY, Miranda GE. Epidemiology of Traumatic Peripheral Nerve Injuries Evaluated by Electrodiagnostic Studies in a Tertiary Care Hospital Clinic. *Bol Asoc Med P R*. 2015 Jul-Sep;107(3):79-84. PubMed PMID: 26742202.
- Puzović V, Samardžić M, Jovanović M, Živković B, Savić A, Rasulić L. Etiology and mechanisms of ulnar and median forearm nerve injuries. *Vojnosanitetski pregled*. 2015 Nov; 72(11):961-7. doi:10.2298/VSP140818106P. PubMed PMID: 26731969.
- Tsymbalyuk VI, Chebotaryova LL, Dubyna GI. Electrophysiological diagnostics of the closed injury brachial plexus in a combination with craniocerebral trauma. *Ukrainian Neurosurgical Journal*. 2004;(4):65-8. Ukrainian.
- Zozulya YuA, Tretyak IB, Tsymbalyuk YuV, Sapon NA. [Restorative surgery with invasive nerve stimulation in brachial plexus injuries]. *Ukrainian Neurosurgical Journal*. 2013;(2):19-22. Ukrainian. Available from: <http://theunj.org/article/view/51852>.
- Rasulić L, Puzović V, Rotim K, Jovanović M, Samardžić M, Živković B, Savić A. The epidemiology of forearm nerve injuries - a retrospective study. *Acta clinica Croatica*. 2015 Mar; 54(1):19-24. PubMed PMID: 26058238.
- Brooks DN, Weber RV, Chao JD, Rinker BD, Zoldos J, Robichaux MR, Ruggeri SB, Anderson KA, Bonatz EE, Wisotsky SM, Cho MS, Wilson C, Cooper EO, Ingari JV, Safa B, Parrett BM, Buncke GM. 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. Epub 2011 Nov 28. PubMed PMID: 22121093.
- Battiston B, Titolo P, Ciclamini D, Panero B. Peripheral Nerve Defects: Overviews of Practice in Europe. *Hand Clin*. 2017 Aug;33(3):545-550. doi: 10.1016/j.hcl.2017.04.005. Review. PubMed PMID: 28673630.
- Pabari A, Yang SY, Seifalian AM, Mosahebi A. Modern surgical management of peripheral nerve gap. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2010 Dec; 63(12): 1941-8. doi:10.1016/j.bjps.2009.12.010. Epub 2010 Jan 12. Review. PubMed PMID: 20061198.
- Korus L, Ross DC, Doherty CD, Miller TA. Nerve transfers and neurotization in peripheral nerve injury, from surgery to rehabilitation. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2016 Feb; 87(2): 188-197. doi: 10.1136/jnnp-2015-310420. Epub 2015 Jul. Review. PubMed PMID: 26134850.
- Safa B, Buncke G. Autograft Substitutes: Conduits and Processed Nerve Allografts. *Hand Clinics*. 2016 May; 32(2):127-40. doi: 10.1016/j.hcl.2015.12.012. doi: 10.1016/j.hcl.2015.12.012. Review. PubMed PMID: 27094886.
- Riedel O, Frey M. Anatomy of the sural nerve: cadaver study and literature review. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2013 Apr; 131(4): 802-10. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182818cd4. Review. PubMed PMID: 23542252.
- Sullivan R, Dailey T, Duncan K, Abel N, Borlongan CV. Peripheral nerve injury: Stem cell therapy and peripheral nerve transfer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016 Dec 14;17(12). pii: E2101. Review. PubMed PMID: 27983642; PubMed Central PMCID: PMC5187901.
- Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*. 1999 Mar 5; 96(5): 737-49. PubMed PMID: 10089888.
- Dupin E, Sommer L. Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Developmental Biology*. 2012 Jun 1; 366(1): 83-95. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.02.035. Epub 2012 Mar 8. Review. PubMed PMID: 22425619.
- Barlow LA. Progress and renewal in gustation: new insights into taste bud development. *Development*. 2015 Nov 1;142(21):3620-9. doi: 10.1242/dev.120394. Review. PubMed PMID: 26534983; PubMed Central PMCID: PMC4647210.
- Suzuki J, Osumi N. Neural crest and placode contributions to olfactory development. *Current Topics in Developmental Biology*. 2015; 111: 351-74. doi: 10.1016/bs.ctdb.2014.11.010. Epub 2015 Jan 20. Review. PubMed PMID: 25662265.
- Whitfield TT. Development of the inner ear. *Current Opinion in Genetic Development*. 2015 Jun; 32: 112-8. doi: 10.1016/j.gde.2015.02.006.
- Lindsay SL, Barnett SC. Are nestin-positive mesenchymal stromal cells a better source of cells for CNS repair? *Neurochemistry International*. 2017 Jun;106: 101-107. doi: 10.1016/j.neuint.2016.08.001. Epub 2016 Aug 3. PubMed PMID: 27498150; PubMed Central PMCID: PMC5455984.
- Neirinckx V, Cantinieux D, Coste C, Rogister B, Franzen R, Wislet-Gendebien S. Concise review: Spinal cord injuries: how could adult mesenchymal and neural crest stem cells take up the challenge? *Stem Cells*. 2014 Apr;32(4):829-43. doi: 10.1002/stem.1579. Review. PubMed PMID: 24155224.
- Vasylyev RG, Rodnichenko AE, Shamalo SN, Demidchouk AS, Labunets IF, Chaikovskii YB, Butenko GM. Effects of neural crest-derived multipotent stem cells on regeneration of an injured peripheral nerve in mice. *Neurophysiology*. 2015;47(1):80-83. doi: 10.1007/s11062-015-9501-6.
- Amoh Y, Aki R, Hamada Y, Niiyama S, Eshima K, Kawahara K, Sato Y, Tani Y, Hoffman RM, Katsuoka K. 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. Epub 2011 Nov 21. PubMed PMID: 22098554.
- Sieber-Blum M, Grim M, Hu Y, Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Developmental Dynamics*. 2004 Oct; 231(2):258-69. doi: 10.1002/dvdy.20129. PubMed PMID: 15366003.
- Najafzadeh N, Esmaeilzade B, Dastan Imchek M. Hair follicle stem cells: In vitro and in vivo neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*. 2015 Jun 26; 7(5) :866-72. doi: 10.4252/wjsc.v7.i5.866. Review. PubMed PMID: 26131317; PubMed Central PMCID: PMC4478633.
- 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. Review. PubMed PMID: 25621102; PubMed Central PMCID: PMC4300921.